
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Instituto de Química de Araraquara

Daniela Pereira dos Santos

Desenvolvimento de Eletrodos Modificados com
Poli Ácido Glutâmico e sua Aplicação na Análise
de Compostos Antioxidantes e Farmacêuticos

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

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

Araraquara

2007

Dedicatória

*A realização deste sonho não seria possível sem vocês que
incansavelmente me apóiam:*

*Meus pais Antônio e Diva, que me deram o dom mais precioso, a Vida,
revestida de amor, incentivo e dedicação.*

Meus irmãos, Gláucia e Evandro pelo apoio e carinho.

*Saibam que AMO muito vocês, desculpem-me pela ausência, mas tudo
foi para a realização deste sonho.*

MUITO OBRIGADA!!!

*Meu namorado Jefferson Ferrari por todo carinho, apoio, compreensão e
força em todos os momentos.*

Obrigada por estar ao meu lado...Te amo!!!

Agradecimentos

A DEUS que ilumina meu caminho, me dando forças em todos os momentos de minha vida.

O Meu Muito obrigada a Profª. Drª. Maria Valnice pela confiança depositada na realização deste trabalho, pelos ensinamentos profissionais e pessoais quando de posse ao “famoso banquinho”, a sua infinita dedicação e principalmente pela grande amizade.

Aos professores do grupo de Eletroanalítica: Hideko Yamanaka e Nelson Stradiotto pelo aprendizado, discussões e amizade adquirida durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Patrícia, Célia e Sandra da seção de pós-graduação pela simpatia, atenção e incansável ajuda durante toda esta etapa.

Por toda dedicação e eficiência prestada, a Marli e Rose do posto Fapesp.

A Valéria, Priscila e toda a equipe de funcionárias da biblioteca do Instituto de Química pelos serviços prestados.

Aos funcionários deste Instituto pela ajuda e convivência, em especial ao Ricardo (técnico).

A Rê meu muito obrigada por toda ajuda, discussões e grande amizade, e também pelos seus deliciosos chocolates... inesquecíveis!!!

Ao amigo André meu muito obrigada pela grande amizade, ajuda e discussões acompanhadas dos cafezinhos ao pé da escada. A você Márcio pela grande contribuição e amizade adquirida no desenvolvimento deste trabalho. Valeu mesmo, sentirei saudades de vocês e do “eeeeaaiii Dani”!!!

A amiga Mariana Cafêu pela amizade, apoio e paciência em todos os momentos vividos nesta etapa da minha vida.

A um amigo “muito pop”, grande Magno (Magnata) valeu pela amizade e grande ajuda.

A todos do grupo de eletroanalítica pela convivência e ajuda prestada durante esta etapa foi um grande aprendizado e muitas histórias vividas. Em especial a Antônio, Diana, Elaine, Fabiana, Juliana Piteli, Leandro, Marly, Michelle, Paula, Paulo Brasil e todos que por aqui já estiveram... obrigada pelo apoio e amizade.

A todos os amigos e amigas distantes que sempre torceram e me apoiaram para a realização deste sonho.

A Prof^a Dr^a Ana Maria O. Brett pela oportunidade, atenção e profissionalismo prestado durante meu estágio em Coimbra-Portugal. Meu muito obrigado a Oana, Ana, Tati, Carlos, Humberto, Przemek e Victor pela grande ajuda e maravilhosa convivência...foi tudo muito Fixe!!!

A FAPESP pela bolsa concedida e todo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, MUITO OBRIGADA a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”

Buda

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda a ciência e arte. O Homem que desconhece esse encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos”.

Albert Einstein

RESUMO

O Poli ácido glutâmico (PAG) é um poliaminoácido sintético formado por unidades repetitivas de glutamato, que apresentam grupos carboxilas ao longo de sua cadeia principal. A preparação de eletrodos de carbono vítreo modificados com filmes de PAG foi investigada utilizando-se três diferentes procedimentos: eletropolimerização do ácido glutâmico (MONO); deposição direta de poli ácido glutâmico (PAG) e poli ácido glutâmico:glutaraldeído (PAG:GLU) seguida de secagem a temperatura ambiente. Após secagem, o eletrodo modificado foi submetido a ciclos sucessivos entre -0,8 a +2,0 V sob velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. O ácido ascórbico foi usado como composto modelo para os eletrodos modificados, os quais apresentaram um efeito eletrocatalítico na oxidação do mesmo. Os eletrodos modificados foram caracterizados por microscopia de força atômica (AFM) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). O recobrimento sobre a superfície pela adição de PAG apresentou a melhor performance exibindo filmes nanoestruturados e uniformes com baixa resistência à transferência de carga. Os eletrodos modificados por filmes PAG foram usados para estudar a oxidação do flavonóide rutina. Os resultados mostraram um par de picos redox em +0,46/+0,43 V, usado para a pré-concentração da rutina. Uma curva analítica foi obtida no intervalo de 0,9 a 9,0 μmol L⁻¹ e o método proposto foi aplicado para análise do antioxidante em formulação farmacêutica. Os eletrodos modificados por filmes PAG foram também usados para determinação de ácido cafêico. Um par de pico redox reversível em +0,42/+0,45 V foi obtido para o ácido cafêico em tampão B-R pH 3,5. O método foi aplicado para a determinação de ácido cafêico em amostra de vinho tinto, detectando nível de concentração de 34,8 μg mL⁻¹ sem tratamento prévio da amostra. Os filmes de PAG:GLU foram também eficientes para pré-concentrar e determinar Amoxicilina (AMX) e Doxorrubicina (DXR) em amostra de urina humana. Gráficos de calibração linear foram obtidos no intervalo de 2,0 a 25,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ para a AMX e de 1,0 a 34,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ para a DXR, com limites de detecção de 9,2 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ e 4,5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, respectivamente. A metodologia proposta apresentou resultados compatíveis quando comparada com a análise espectrofotométrica utilizada para a validação do método.

Palavras-chaves: eletrodos modificados; poli ácido glutâmico; antioxidantes; fármacos.

ABSTRACT

The poly glutamic acid (PAG) is a syntetic poliamonacid composed by repetitive glutamate units that shows carboxylic groups in the long of the principal chain. Films of PAG on the glassy carbon electrode was investigated by three diferents procedures: glutamic acid eletropomelimerization (MONO), direct deposition of the poly glutamic acid (PAG) and poly glutamic acid:glutaraldehyde (PAG:GLU), followed by drying at room temperature. After solvent evaporation, the modified electrode was submitted by cycles sucessives from -0.8 to +2.0 V at scan rate of 100 mV s⁻¹. The ascorbic acid was used as a model compound in the modified electrodes, which presented an electrocatitic effect in the oxidation of the ascorbic acid. The modified electrodes were characterized by atomic force microscopy (AFM) and electrochemistry impedance spectroscopy (EIS). Coantings by poly glutamic acid onto the surface presented best performance by addition of PAG films that exhibits films nanostructured and uniforms with lower resistance to charge transfer. The modified electrode by PAG films were investigated to oxidation of rutin flavonoid. The results showed a redox pair of peaks at +0.46/+0.43 V, and linear analytical curve at 0.9 to 9.0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. The method proposed was successful applied for rutin determination in pharmaceutical formulation. The modified electrode by PAG films was also used to determine cafeic acid. A reversible redox peak pair at +0.42/+0.45 V was obtained for cafeic acid at B-R buffer pH 3,5. The method was applied for cafeic acid determination in the red wine, where the concentration of the 34,8 µg mL⁻¹ was obtained, without any pre-treatment of the sample. The PAG:GLU films onto the glass carbon electrode were also efficient to pre-concetrare and to determine amoxicilin (AMX) and doxorubicin (DXR) in human urine sample. Linear calibration graphs were obtained from 2,0 a 25,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ for AMX and from 1,0 a 34,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ for DXR, with detection limit of 9,2 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ and 4,5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, respectively. The proposed methodology showed compatible results when compared to the spectrophometric analysis.

Keywords: modified electrodes; poly glutamic acid; antioxidants; drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Unidades monoméricas do ácido glutâmico em função do pH.....	27
Figura 2 – Estrutura do poli ácido glutâmico.....	28
Figura 3 – Estrutura básica dos flavonóides.....	30
Figura 4 – Estrutura química da rutina.	31
Figura 5 – Estrutura química de alguns ácidos fenólicos: (a) ácido cafêico, (b) ácido clorogênico, (c) ácido sinápico, (d) ácido ferúlico, (e) ácido <i>p</i> -cumárico e (f) ácido ascórbico. 35	
Figura 6 - Estrutura do 6-aminopenicilânico (6-APA).....	37
Figura 7 - Estrutura química da amoxicilina.....	38
Figura 8 - Estrutura química básica das antraciclinas.	42
Figura 9 - Estrutura da Doxorrubicina.....	43
Figura 10 – Voltamogramas cíclicos do filme MONO obtidos pela eletropolimerização do ácido glutâmico em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0 sobre ECV. (a) 1 ^a ; (b) 2 ^a e (c) 10 ^a varredura. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	56
Figura 11 – Voltamogramas cíclicos obtidos da oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 6,0 no (1) ECV e após modificação por filmes: (2) PAG (3) PAG:GLU (87,5%:12,5%) e (4) MONO. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	58
Figura 12 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos da oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 6,0 no (1) ECV e após modificação por filmes (2) PAG; (3) PAG:GLU (87,5%:12,5%) e (4) MONO. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $t_p = 400 \text{ ms}$	60
Figura 13 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA sobre ECV modificado com filme PAG em diferentes tampões com valores de pH 1,2 (a); 2,0 (b); 3,4 (c), 4,3 (d); 5,4 (e), 6,0 (f); 6,9 (g); 8,0 (h). $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $t_p = 400 \text{ ms}$	63
Figura 14 – Dependência do pH no potencial (A) e na corrente de pico (B) do ECV modificado com filme PAG na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 6,0.	63
Figura 15 – Gráfico da I_{pa} vs. $v^{1/2}$ do ECV (A) antes e após modificação por filmes (B) MONO, (C) PAG e (D) PAG:GLU (87,5%:12,5 %).	65
Figura 16 – Voltamogramas cíclicos obtidos para oxidação do AA sobre ECV (A) e após modificação por filmes (B) MONO, (C) PAG e (D) PAG:GLU (87,5%:12,5%) em concentrações de 3,0; 7,0; 15,0; 31,0; 63,0; 127,0 e 255,0($\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	66
Figura 17 – Gráficos de calibração obtidos por VC para a determinação de AA no ECV antes e após modificação por filmes de PAG. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	67
Figura 18 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a oxidação do AA sobre ECV antes (A) e após modificação por filmes (B) MONO, (C) PAG (1% m/v) e PAG:GLU (87,5%:12,5%) (D) em concentrações de: (a)= 7,0; (b)= 15,0; (c)= 31,0; (d)= 63,0; (e)= 127,0 e (f)= 255,0 ($\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 6,0.....	68

Figura 19 - Gráficos de calibração obtidos por DPV para a determinação de AA no ECV antes e após modificação por filmes de PAG.	69
Figura 20 - Princípio da obtenção de imagens pela técnica de microscopia de força atômica (AFM) [Research Equipment and Services, 2006].	71
Figura 21 - Imagens topográficas de AFM da superfície do ECV antes (A) e após modificação por filmes (B) MONO, (C) PAG e (D) PAG:GLU (87,5%:12,5%).	72
Figura 22 - Imagem topográfica de AFM da superfície do HOPG.	73
Figura 23 - Imagens topográficas de AFM do HOPG modificado com filme PAG.	74
Figura 24 - (A) Gráficos de Nyquist dos espectros de impedância do ECV antes e após modificação por filmes MONO, PAG e PAG:GLU, imersos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 6,0 na presença de 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de AA. E = 0,02 V. (B) Circuito equivalente.	76
Figura 25 - Voltamogramas cíclicos para oxidação de 5,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de rutina sobre ECV em solução tampão B-R 0,04 mol L ⁻¹ pH 4,0. v = 50 mV s ⁻¹	79
Figura 26 - Voltamogramas cíclicos para oxidação de 5,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de rutina em solução tampão B-R 0,04 mol L ⁻¹ pH 4,0 sobre ECV (1) antes e (2) após modificação com filme PAG com tempo de imersão de 20 min. v = 50 mV s ⁻¹	80
Figura 27 - (A) Efeito do tempo de imersão nos voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV modificado com filme PAG em solução 5,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de rutina tampão B-R 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0. (a) = 0, (b) = 3, (c) = 10 e (d) = 20 min. v = 50 mV s ⁻¹ . (B) Gráfico de I _{pa} vs. tempo de imersão.	81
Figura 28 - Efeito da variação de pH sobre o potencial de oxidação de 5,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de rutina sobre o ECV antes e após modificação com filme PAG.	82
Figura 29 - Efeito da variação de pH na intensidade de corrente de pico correspondente a oxidação de 5,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de rutina sobre ECV antes e após modificação com filmes PAG. v = 50 mV s ⁻¹	83
Figura 30 - (A) Voltamogramas cíclicos da v em solução 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ tampão B-R 0,04 mol L ⁻¹ pH 4,0 sobre o eletrodo modificado. (B) Gráfico de I _{pa} vs. v.	84
Figura 31 - Voltamograma de onda quadrada de 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de rutina em tampão B-R 0,04 mol L ⁻¹ sobre ECV modificado com filme PAG após 20 minutos de imersão. f = 20 Hz, ΔE = 50 mV e ΔE _s = 2,0 mV.	85
Figura 32 - Influência da variação da frequência sobre o pico de oxidação de 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de rutina em tampão B-R 0,04 mol L ⁻¹ pH 4,0 no ECV modificado com filme PAG após 20 minutos de imersão. ΔE = 50 mV e ΔE _s = 2,0 mV.	86
Figura 33 - Influência da ΔE sobre o pico de oxidação de 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de rutina em tampão B-R 0,04 mol L ⁻¹ pH 4,0 no ECV modificado com filme PAG após 20 minutos de imersão. f = 40 Hz e ΔE _s = 2,0 mV.	87
Figura 34 - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para determinação de rutina em solução tampão B-R 0,04 mol L ⁻¹ pH 4,0 em diferentes concentrações: (a) = 0,94; (b) = 2,0; (c) = 4,0; (d) = 6,0; (e) = 8,0 e (f) = 10,0 (μmol L ⁻¹). (B) Curva analítica. f = 40 Hz, ΔE = 50 mV e ΔE _s = 2,0 mV.	88

Figura 35 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a rutina em: (1) amostra de Novarrutina [®] , adições do padrão: (2) 2,0; (3) 3,0 e (4) 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de rutina em solução tampão B-R 0,04 mol L^{-1} pH 4,0. (B) Curva da adição do padrão rutina. $f = 40$ Hz, $\Delta E = 50$ mV e $\Delta E_s = 2,0$ mV.	89
Figura 36 – (A) Espectros de absorção da rutina em solução tampão B-R 0,04 mol L^{-1} pH 4,0 em diferentes concentrações: (a) branco; (b) 2,0; (c) 4,0; (d) 8,0; (e) 12; (f) 16 e (g) 20 ($\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Curva analítica.....	90
Figura 37 – (A) Espectros de absorção da amostra de Novarrutina [®] e rutina padrão em diferentes concentrações em solução tampão B-R 0,04 mol L^{-1} pH 4,0. (a) branco; (b) 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da amostra de Novarrutina [®] ; adições de padrão: (c) 3,0; (d) 6,0 e (e) 9,0 ($\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Curva da adição do padrão rutina na amostra de Novarrutina [®]	91
Figura 38 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} do ácido cafêico no ECV em (A) pH = 3,5 e (B) pH 5,6 em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} . $v = 100$ mV s^{-1}	92
Figura 39 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} do ácido cafêico no ECV antes (1) e após (2) modificação com filme PAG solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 3,5. $v = 100$ mV s^{-1}	94
Figura 40 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} do ácido cafêico no ECV antes (1) e após (2) modificação com filme PAG solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,65. $v = 100$ mV s^{-1}	95
Figura 41 – Efeito da incorporação do ácido cafêico sobre ECV modificado com filme PAG em solução $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 3,5 por meio da (A) ciclagem sucessiva (10 ciclos) e (B) por circuito aberto em 1 e 10 minutos. $v = 100$ mV s^{-1}	96
Figura 42 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo da velocidade de varredura em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 3,5 sobre ECV modificado após incorporação eletroquímica do ácido cafêico. (B) Gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$	97
Figura 43 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo da velocidade de varredura em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 3,5 sobre ECV modificado após incorporação do ácido cafêico por circuito aberto. (B) Gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$	98
Figura 44 – Voltamograma de onda quadrada obtido para $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} de ácido cafêico incorporado no filme de PAG na superfície do ECV em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 3,5. $f = 30$ Hz, $\Delta E = 50$ mV e $\Delta E_s = 2,0$ mV.	99
Figura 45 – (A) Voltamogramas obtidos para determinação de ácido cafêico em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 3,5 em diferentes concentrações: (a) = 0,04; (b) = 0,08; (c) = 0,3; (d) = 0,5; (e) = 0,7 e (f) = 2,0 ($\times 10^{-4}$ mol L^{-1}). (B) Curva analítica. $f = 30$ Hz, $\Delta E = 50$ mV e $\Delta E_s = 2,0$ mV.	100
Figura 46 - Voltamogramas cíclicos obtidos para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} de ácido clorogênico em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 3,5 no ECV antes (1) e após (2) modificação com filme PAG. $v = 100$ mV s^{-1}	101
Figura 47 – Determinação da quantidade de ácido cafêico na amostra de vinho tinto obtida pelo método da adição de padrão.	103
Figura 48 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,2 na (1) ausência e na (2) presença de AMX em solução $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} . $v = 100$ mV s^{-1}	104

- Figura 49** – (A) Voltamogramas cíclicos da oxidação $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 sobre ECV em diferentes velocidades de varredura: (1) = 20; (2) = 50; (3) = 80 e (4) = 100 mV s⁻¹. (B) Gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$ 105
- Figura 50** - Voltamogramas cíclicos da oxidação de $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 sobre ECV modificado por filmes: (1) MONO; (2) PAG, (3) PAG:GLU (50%:50%). $v = 50$ mV s⁻¹. 106
- Figura 51** – Oxidação de $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 sobre ECV antes (1) e após (2) a modificação com filme PAG:GLU (50%:50%). $v = 50$ mV s⁻¹. 107
- Figura 52** – Voltamogramas cíclicos sucessivos obtidos para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 sobre ECV modificado por filme PAG:GLU (50%:50%). (1) 1^a e (2) 2^a varredura. $v = 100$ mV s⁻¹. 108
- Figura 53** - Efeito da variação de pH observado para a oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX sobre o ECV modificado com filme PAG:GLU (50%:50%) na primeira varredura de potencial sobre (A) E_{pla} e (B) I_{pla} . $v = 100$ mV s⁻¹. 110
- Figura 54** – Voltamogramas cíclicos sucessivos para oxidação da AMX em solução $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ sobre ECV modificado com filme PAG:GLU (50%:50%) no (1) eletrólito suporte; (2) 2^a varredura em solução de AMX em tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 5,0. $v = 100$ mV s⁻¹. 112
- Figura 55** – Voltamogramas de varredura linear sobre ECV modificado com PAG:GLU (50%:50%) obtidos para oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX pré-oxidada em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 sob +1,0 V em (1) $t = 0$ e (2) $t = 60$ s. $v = 100$ mV s⁻¹. 113
- Figura 56** – Influência do tempo de acúmulo sobre a resposta voltamétrica da AMX no eletrodo modificado com filme PAG:GLU (50%:50%) depois de submetido á oxidação prévia em +1,0 V. $v = 100$ mV s⁻¹. 114
- Figura 57** – (A) Influência da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do ECV modificado com filme PAG:GLU (50%:50%) em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 com $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX. Acúmulo de 60 s a + 1,0 V. (a) = 10; (b) = 25; (c) = 30; (d) = 50; (e) = 75; (f) = 85 e (g) = 100 mV s⁻¹. (B) Relação de I_{pIIa} vs. $v^{1/2}$ 115
- Figura 58** – Efeito da composição dos filmes de PAG:GLU na corrente de pico da oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de amoxicilina em tampão acetato pH 5,2 após acúmulo de 60s a + 1,0 V. $v = 100$ mV s⁻¹. 116
- Figura 59** – Curva analítica obtida para a AMX no eletrodo modificado com PAG:GLU (87,5%:12,5%) em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2. $v = 100$ mV s⁻¹. 117
- Figura 60** - Voltamograma de onda quadrada obtido para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 sobre ECV modificado com filme PAG:GLU (87,5%:12,5%) após acúmulo de 60s a + 1,0 V. $f = 10$ Hz, $\Delta E = 50$ mV e $\Delta E_s = 2,0$ mV. 118
- Figura 61** – Efeito da amplitude de pulso sobre os voltamogramas de onda quadrada registrados para o eletrodo de PAG:GLU (87,5%:12,5%) em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX sem (1) e após acúmulo de +1,0 V a 60s. $f = 25$ Hz e $\Delta E_s = 2,0$ mV. 118
- Figura 62** – Voltamogramas obtidos para o ECV modificado com filme PAG:GLU (87,50%:12,5%) em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX após acúmulo de +1,0 V a 60 s na variação da frequência: (a) =10; (b) =20; (c) =30; (d) = 50 e (e) = 75 Hz. $\Delta E = 50$ mV e $\Delta E_s = 2,0$ mV. 119

- Figura 63** – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a AMX no ECV modificado com filme PAG:GLU (87,5%:12,5%) em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 em diferentes concentrações: a = 4,0; b = 7,0; c = 11,0; d = 17,0; e = 25,0 e f = 37,0 (μmol L⁻¹). f = 20 Hz, ΔE = 50 mV e ΔE_s = 2,0 mV. (B) Curva analítica..... 120
- Figura 64** – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para (1) amostra de urina humana fortificada com 6,0 μmol L⁻¹ de AMX; adições de padrão: (2) 6,0; (3) 14,0 e (4) 24,0 mg L⁻¹ de AMX. (B) Curva da adição do padrão AMX. 121
- Figura 65** – A) Espectros de absorção da AMX em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,4 em diferentes concentrações: (a) 20; (b) 35; (c) 50; (d) 80; (e) 100; (f) 150 e (g) 200 (μ mol L⁻¹). B) Curva analítica. 122
- Figura 66** - Curva da adição do padrão AMX dos espectros obtidos de 10,0 μmol L⁻¹ de AMX em amostra de urina humana. Adições de AMX: 10,0; 20,0 e 30,0 μmol L⁻¹. 123
- Figura 67** – Voltamogramas cíclicos sobre ECV em solução tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 5,0 na ausência (1) e na presença (2) de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DXR. v = 50 mV s⁻¹ 124
- Figura 68** – Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DXR em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 sobre ECV (1) antes e (2) após modificação com filmes de PAG:GLU. v = 50 mV s⁻¹. 126
- Figura 69** - Efeito da variação de pH sobre o ECV (A) antes e (B) após modificação com filme PAG:GLU para a oxidação de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DXR nos potenciais de pico anódico. v = 50 mV s⁻¹. 128
- Figura 70** - Efeito da variação de pH observado para a oxidação de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DXR sobre ECV antes (1) e após (2) modificação com filmes de PAG:GLU na intensidade das correntes de pico anódica (I_{pa}). v = 50 mV s⁻¹. 129
- Figura 71** - Voltamogramas cíclicos obtidos do eletrodo de carbono vítreo modificado com filmes de PAG em 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DXR (1) tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 7,0 e (2) tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. v = 50 mV s⁻¹. 130
- Figura 72** – Gráfico de I_{pa} vs. v^{1/2} obtido em solução 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DXR tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 sobre ECV modificado com filme PAG:GLU..... 131
- Figura 73** – Voltamogramas cíclicos obtidos para ECV modificado com filme PAG:GLU em (1) solução 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DXR tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 após ciclagem de 20 ciclos e (2) no eletrólito suporte. v = 50 mV s⁻¹. 133
- Figura 74** – (A) Voltamogramas cíclicos da pré-concentração por ciclagem sucessiva (20 ciclos) de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 de DXR no ECV modificado com filme PAG:GLU. (1) = eletrólito suporte; (2) 3^o ciclo e (3) 20^o ciclo. (B) Gráfico %I_{pa} vs. n^o de ciclos v = 50 mV s⁻¹. 133
- Figura 75** – (A) Voltamogramas cíclicos do ECV modificado com filme PAG:GLU na pré-concentração por circuito aberto de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DXR em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. (1) no eletrólito suporte, (2) após 30 segundos e (3) após 3 minutos. (B) Gráfico de I_{pa} vs tempo de acúmulo. v = 50 mV s⁻¹. 134
- Figura 76** - Voltamogramas de onda quadrada de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DXR em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 no eletrodo modificado com PAG:GLU (87,5%:12,5%). f = 20 Hz, ΔE = 50 mV e ΔE_s = 2,0 mV. 135

- Figura 77** – Influência da variação da f sobre o pico de oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 no ECV modificado com filmes PAG:GLU. $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$ 136
- Figura 78** - Influência da variação da ΔE sobre o pico de oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 no ECV modificado com filme PAG:GLU (87,5%:12,5%). (a) = 10; (b) = 20; (c) = 30; (d) = 40; (e) = 50; (f) = 75 e (g) = 100 mV. $f = 10 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$ 137
- Figura 79** - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para determinação de DXR em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 em diferentes concentrações:(a) = 2,23; (b) = 9,16; (c) = 17,9; (d) = 34,0; (e) = 37,5 e (f) = 44,5 ($\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Curva analítica. $f = 10 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$ 138
- Figura 80** – Curva da adição do padrão para a determinação de DXR em amostra de urina humana fortificada com $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DXR. 139
- Figura 81** – Espectro de absorção em Uv-vis para (a) água e (b) solução de $2,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR em água. 140
- Figura 82** – (A) Espectros de absorção da DXR em solução aquosa em diferentes concentrações: (a) 20; (b) 40; (c) 60; (d) 80; (e) 100 e (f) 120 ($\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Curva analítica. 140
- Figura 83** – (A) Espectros de absorção da DXR. (a) branco; (b) $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DXR na amostra de urina; adições de padrão: (c) 20; (d) 40 e (e) 60 ($\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Método da adição de padrão da DXR. 141

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores obtidos da curva analítica por VC para a oxidação do AA sobre ECV antes e após modificação por filmes de PAG. 67
- Tabela 2** – Valores obtidos da curva analítica por DPV para a oxidação do AA sobre ECV antes e após modificação por filmes de PAG. 69
- Tabela 3** - Resultados para (R_{ct}) e (C_{dl}) obtidos após ajuste dos espectros de impedância eletroquímica com o circuito equivalente. 77
- Tabela 4** - Efeito do pH para a oxidação de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de rutina sobre ECV modificado com filme PAG em solução tampão B-R 0,04 mol L⁻¹. 82
- Tabela 5** – Resultados obtidos para a determinação de rutina em amostra de Novarrutina® 91
- Tabela 6** - Efeito do pH em tampão acetato 0,01 mol L⁻¹ para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido cafêico sobre ECV. 93
- Tabela 7** - Efeito do pH em tampão acetato para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido cafêico sobre ECV com filme PAG. 95
- Tabela 8** - Resultados obtidos para a determinação de ácido cafêico sobre ECV modificado com filme PAG na presença de possíveis interferentes. 102
- Tabela 9** - Parâmetros voltamétricos obtidos de voltamogramas cíclicos em diferentes valores de pH na oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX em tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ sobre ECV modificado com filmes de PAG:GLU. 111
- Tabela 10** - Resultados obtidos para a determinação de AMX em amostra de urina. 123
- Tabela 11** - Efeito da variação de pH sobre a oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR em solução tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ sobre ECV. $v = 50$ mV s⁻¹. 125
- Tabela 12** – Efeito da variação de pH em tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ para a oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR sobre ECV modificado com filmes PAG:GLU. 127
- Tabela 13** – Parâmetros voltamétricos obtidos de voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades para oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 sobre ECV modificado com filmes PAG:GLU. 132
- Tabela 14** - Resultados obtidos para a determinação de DXR em amostra de urina. 142

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Formação do filme PAG sobre a superfície do ECV.....	50
Esquema 2 – Formação do filme PAG:GLU sobre a superfície do ECV.....	51
Esquema 3 – Processo de modificação do ECV com filme MONO (ZHANG; LIN, 2001a).	56
Esquema 4 – Oxidação eletroquímica do ácido ascórbico (I) para o ácido dehidroascórbico (II) (MATOS, et al., 2000).	58
Esquema 5 – Modelo mecanístico para filmes de polieletrólitos na superfície eletródica em uma solução contendo eletrólito C^+X^- não eletroativo e um par eletroativo Z^-/Z^{2-} [ANSON; SAVEANT; SHIGEHARA, 1983].....	61
Esquema 6 – Mecanismo proposto para a oxidação do ácido caféico sobre eletrodo de carbono vítreo (HOTTA, et al., 2002).....	93
Esquema 7 – Mecanismo para oxidação da DXR sobre ECV em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5. [BRETT, et al. 2002].....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Ácido Ascórbico
- AFM – Microscopia de Força Atômica
- Ag/AgCl – Eletrodo de Prata-Cloreto de Prata Saturado
- AMX – Amoxicilina
- C_{dl} – Capacitância da dupla camada elétrica
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DPV – Voltametria de Pulso Diferencial
- DXR – Doxorrubicina
- EC – Eletroforese Capilar
- ECS – Eletrodo de Calomelano Saturado
- ECV – Eletrodo de Carbono Vítreo
- EIS – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
- EQM – Eletrodo Quimicamente Modificado
- HMDE – Eletrodo de Gota Pendente de Mercúrio
- HOPG – Eletrodo de Grafite Pirolíticamente Altamente Orientado
- MONO – eletropolimerização
- PAG – Adição direta de PAG
- PAG:GLU – Adição de PAG e Glutaraldeído
- PAG – Poli Ácido Glutâmico
- PH – Poli Histidina
- PLL – Poli-L-Lisina
- R_{ct} – Resistência à transferência de carga
- R_s – Resistência ôhmica da solução
- UV-vis – Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta e visível
- Z' – Componente real da impedância
- Z'' – Componente imaginária da impedância
- Z_w – Impedância de Warburg

LISTA DE SÍMBOLOS

v	Velocidade de varredura
$v^{1/2}$	Raiz quadrada da velocidade de varredura
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
ΔE_p	Variação do potencial de pico
t_p	Tempo de pulso
ΔE	Amplitude de pulso
ΔE_s	Incremento de potencial
f	Frequência
Hz	Hertz
V	Volts
mV	Milivolts
μ	Mícron
A	Ampère
Abs	Absorbância
λ	Comprimento de Onda
ϵ	Absortividade molar
b	Caminho óptico
C	Concentração
Ω	Ohmic

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS (EQM).....	22
1.2. ELETRODOS MODIFICADOS COM POLIAMINOÁCIDOS.....	24
1.3. ELETRODOS MODIFICADOS COM POLI ÁCIDO GLUTÂMICO (PAG) 	27
1.4. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	29
1.4.1. FLAVONÓIDES.....	30
1.4.2. ÁCIDOS FENÓLICOS.....	34
1.5. COMPOSTOS FARMACÊUTICOS	37
1.5.1. AMOXICILINA (AMX)	37
1.5.2. DOXORRUBICINA (DXR)	41
2. OBJETIVOS	46
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	47
3.1. EQUIPAMENTOS	47
3.2. REAGENTES	48
3.3. METODOLOGIA.....	49
3.3.1. PREPARAÇÃO DE FILMES DE POLI ÁCIDO GLUTÂMICO.....	49
3.3.1.1. ELETROPOLIMERIZAÇÃO (MONO)	49
3.3.1.2. ADIÇÃO DIRETA DE PAG (PAG)	50
3.3.1.3. ADIÇÃO DE PAG E GLUTARALDEÍDO (PAG:GLU)	50
3.4. PROCEDIMENTO	52
3.4.1. TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS	52
3.4.2. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFÊICO EM VINHO TINTO SOBRE ECV MODIFICADO POR FILME PAG	52
3.4.3. DETERMINAÇÃO DE RUTINA EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA SOBRE ECV MODIFICADO POR FILME PAG	53
3.4.4. DETERMINAÇÃO DE AMX E DXR EM AMOSTRA DE URINA HUMANA SOBRE ECV MODIFICADO POR FILME PAG:GLU	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1. CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA DOS ECV MODIFICADO POR FILMES DE PAG.....	55
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PAG POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	70
4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PAG POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA	75

4.4. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	78
4.4.1. RUTINA	78
4.4.1.1. OXIDAÇÃO DA RUTINA SOBRE ECV	78
4.4.1.2. OXIDAÇÃO DA RUTINA SOBRE ECV MODIFICADO COM FILME PAG	79
4.4.1.2.1. PRÉ-CONCENTRAÇÃO DA RUTINA SOBRE ECV MODIFICADO COM FILME PAG	81
4.4.1.2.2. CURVA ANALÍTICA PARA RUTINA	87
4.4.1.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRA DE NOVARRUTINA®	88
4.4.1.4. COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO POR ESPECTROFOTOMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DE RUTINA EM AMOSTRA DE NOVARRUTINA®	90
4.4.2. ÁCIDO CAFÊICO	92
4.4.2.1. OXIDAÇÃO DO ÁCIDO CAFÊICO SOBRE ECV	92
4.4.2.2. OXIDAÇÃO DO ÁCIDO CAFÊICO SOBRE ECV MODIFICADO COM FILME PAG	94
4.4.2.3. INTERFERÊNCIA DE OUTROS ÁCIDOS FENÓLICOS NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFÊICO	100
4.4.2.4. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFÊICO EM VINHO TINTO	103
4.5. COMPOSTOS FARMACÊUTICOS	104
4.5.1. AMOXICILINA (AMX)	104
4.5.1.1. OXIDAÇÃO DA AMX SOBRE ECV	104
4.5.1.2. OXIDAÇÃO DA AMX SOBRE ECV MODIFICADO POR FILMES DE PAG	106
4.5.1.2.1. INFLUÊNCIA DO pH	109
4.5.1.2.2. ANÁLISE INDIRETA DE AMX SOBRE ECV MODIFICADO COM FILME PAG:GLU	113
4.5.1.2.3. INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARREDURA	114
4.5.1.2.4. INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DOS FILMES DE PAG:GLU NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE AMX	115
4.5.1.2.5. CURVA ANALÍTICA PARA A AMX	116
4.5.1.2.5.1. VARREDURA LINEAR	116
4.5.1.2.5.2. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	117
4.5.1.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRA DE URINA	120
4.5.1.4. COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO POR ESPECTROFOTOMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DE AMX EM AMOSTRA DE URINA	122
4.5.2. DOXORRUBICINA (DXR)	124
4.5.2.1. OXIDAÇÃO DA DXR SOBRE ECV	124
4.5.2.2. OXIDAÇÃO DA DXR SOBRE ECV MODIFICADO COM FILMES DE PAG:GLU	126
4.5.2.2.1. INFLUÊNCIA DO ELETRÓLITO SUPORTE	130
4.5.2.2.2. INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARREDURA (v)	131
4.5.2.2.3. ESTABILIDADE DO FILME PAG:GLU	132
4.5.2.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRA DE URINA	138
4.5.2.4. COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO POR ESPECTROFOTOMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DE DXR EM AMOSTRA DE URINA	139
5. CONCLUSÕES	143
REFERÊNCIAS	145

1. INTRODUÇÃO

1.1. ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS (EQM)

No início da década de 70, Moses, Wier e Murray (1975) utilizaram o termo EQM para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas adequadamente imobilizadas em suas superfícies, conferindo ao sistema o controle das propriedades físico-químicas da interface eletrodo-solução. A imobilização destas espécies sobre superfícies eletródicas favorece o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações.

Desde então, o desenvolvimento de EQM tem obtido grandes avanços nas diversas áreas de atuação, com os trabalhos pioneiros de Lane e Hubbard (1973a, 1973b), nos quais verificou-se a capacidade de adsorção de olefinas na superfície de eletrodos de platina e seu controle na seletividade.

Essa modificação pode ocorrer por meio de reações químicas, adsorção química e física, formação de compósitos ou recobrimentos poliméricos (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002; SOUZA, 1997). Dentre essas inúmeras formas de modificação, o recobrimento da superfície eletródica por filmes poliméricos tem merecido destaque (MURRAY, 1984). Uma vez realizada a imobilização na superfície eletródica, a mesma apresenta inúmeras possibilidades de interação com a espécie de interesse, em muitos casos essas interações estão combinadas de tal forma, que o EQM ganha sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, estabilidade e aplicabilidade superiores àquelas do eletrodo convencional sem prévia modificação.

Como exemplo deste tipo de eletrodo podemos relatar o trabalho de Golabi, Zare e Hamzehloo (2001) que reporta a detecção electrocatalítica de hidrazina em eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado electroquimicamente com Violeta de Pirocatecol. A determinação realizada no modo amperométrico permite detecção de até $4,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de hidrazina. A oxidação electrocatalítica da hidrazina também é monitorada sobre ECV modificado com compostos fenólicos como o ácido cafêico e o ácido clorogênico (GOLABI; ZARE, 1999a, 1999b). Outros autores mostram que é possível a determinação de íons metálicos através da interação com superfícies eletródicas modificadas. Labuda e Plaskon (1990) usaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com difenilcarbazona para determinar mercúrio em solução

aquosa. A forte afinidade dos polissacarídeos iônicos com os íons metálicos foi relatada por Wang, Taha e Naser (1991) que através de um eletrodo de pasta de carbono modificado pela mistura de dois polissacarídeos torna possível a determinação de cobre e chumbo.

A utilização de um eletrodo modificado é muitas vezes limitada devido à perda gradual da superfície ativa, que é consequência principalmente da adsorção dos produtos da própria reação de óxido-redução utilizada na detecção, ou ainda, dos subprodutos destas reações que podem formar compostos poliméricos depositando-se sobre a superfície do eletrodo (ROSATTO, et al., 2001). Além disso, a detecção de muitos analitos importantes pode ser prejudicada em função da cinética de transferência de elétrons ser excessivamente lenta entre o substrato e o material eletródico. Desta forma, a interação específica entre as características da camada polimérica sobre o eletrodo com uma determinada espécie eletroativa ou classe de composto de interesse, influencia diretamente no sucesso do método analítico.

Dentre inúmeros modificadores que podem ser utilizados no recobrimento da superfície eletródica, a utilização dos polímeros derivados de aminoácidos tem recebido notoriedade, devido à facilidade e rapidez na preparação dos eletrodos modificados. Analiticamente, a rápida pré-concentração e simultânea detecção eletroquímica de um analito sobre o eletrodo modificado, têm oferecido inúmeras vantagens na área de eletroanalítica (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002; STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

Polímeros derivados de aminoácidos podem ser usados com sucesso no desenvolvimento de sensores eletroquímicos usando métodos simples de preparação tais como: a adição direta do polímero sobre o eletrodo ou por eletropolimerização do monômero. Estas modificações tornam possível monitorar inúmeras interações do poliaminoácido por meio de grupos funcionais específicos (amino, carboxílicos, dentre outros), capazes de agirem como nucleófilos (ou eletrofilos) ou centros reativos com a espécie de interesse.

A seguir será relatada uma breve compilação de trabalhos registrados na literatura sobre o desenvolvimento de sensores eletroquímicos utilizando diferentes aminoácidos e poliaminoácidos.

1.2. ELETRODOS MODIFICADOS COM POLIAMINOÁCIDOS

O trabalho pioneiro nesta área de EQM com poliaminoácidos foi reportado por Anson, Saveant e Shigehara (1983) que investigaram a modificação de eletrodo de carbono pirolítico com o poliaminoácido poli-L-lisina (PLL). Depósito de PLL sobre a superfície de carbono pirolítico, permitiu a construção de um EQM usado na investigação do mecanismo de transporte de carga do sistema $\text{Fe}^{\text{III/II}}/\text{EDTA}$ e $\text{CO}(\text{C}_2\text{O}_4)_3^{3-}$ (ANSON; OHSAKA; SAVEANT, 1983).

Bianco, Haladjian e Derocles (1994) investigaram a capacidade de troca iônica da PLL sobre eletrodo de carbono pirolítico na incorporação do ânion hexacianoferrato (III) por interação eletrostática. O método foi aplicado na determinação das proteínas ferredoxin e hidrogenase (HALADJIAN; THIERRYCHEF; BIANCO, 1996).

A imobilização da mesma sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) foi utilizada para pré-concentração de ceftazidime (FERREIRA; ZANONI; FOGG, 1999), nedocromil e nitroprussiato de sódio (PIRZAD, et al., 1994a/1994b) e hexacianoferrato (III) (MOREIRA; FOGG, 1990) utilizando a técnica de redissolução catódica. Substratos de carbono vítreo, platina e carbono impresso tiveram suas superfícies modificadas com poli lisina através da adição de alíquotas do polímero, seguida da evaporação do solvente à temperatura de 80°C por 2 minutos. Fogg et al. (1995) observaram facilidade na redução e re-oxidação do hexacianoferrato nestes substratos. Comparações entre o ECV na presença e na ausência do polímero mostraram melhoramento na reversibilidade do sistema. A lavagem dos filmes PLL sobre eletrodos de carbono vítreo e platina com água deteriorou os mesmos, removendo assim o filme da superfície. O eletrodo de carbono impresso permitiu maior aderência do filme devido à rugosidade da superfície.

Como descrito por Pereira, Fogg e Zanoni (2003), eletrodo de carbono pirolítico modificado com filmes de PLL pode ser regenerado em solução de hidróxido de sódio 3,0 mol L⁻¹ após o uso na determinação do ânion cromoglicato. O intervalo de concentração obtido para análise do fármaco foi 0,1-1,5 µg mL⁻¹ com um limite de detecção de 10 ng mL⁻¹.

A modificação de ECV com PLL também é reportada por Pereira et al. (2004) usando a reação cruzada da PLL com glutaraldeído. O produto desta reação possibilita maior aderência do filme na superfície eletródica, o qual foi caracterizado voltametricamente em solução aquosa de hexacianoferrato (III). Este mesmo filme foi usado na investigação do comportamento eletroquímico de iodeto de potássio. A aplicação do método foi realizada em formulações farmacêuticas de xaropes de iodeto e também na determinação de idoxuridine em amostra de urina (PEREIRA, et al., 2005).

Filmes de PLL obtidos por reação cruzada com glutaraldeído sobre ECV podem ser facilmente aplicados na determinação do corante reativo, Cibacron Blue, atingindo limite de detecção ao redor de $4,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ como descrito por Viana, Pereira e Zanoni (2006). O método foi aplicado na determinação do corante em água potável e água de efluente coletada da planta de tratamento municipal com recuperação de 89,2% e 88,0%, respectivamente.

Eletrodos de filme de mercúrio foram modificados pelas misturas de PLL e poli estirenosulfonato de sódio e aplicados na determinação direta de traços de metais (Cd, Pb e Cu) em água de estuário com moderado nível de matéria orgânica dissolvida sem qualquer tipo de tratamento da amostra. (MONTERROSO; CARAPUÇA; DUARTE, 2006).

Luz et al. (2006a) desenvolveram um sensor voltamétrico usando um ECV modificado com bis(1,10-fenantrolina de cobre II_bis(tetracianoquinodimetanida) [Cu(phen)₂(TCNQ)₂] e PLL para a determinação de catecol em pó de guaraná com um limite de detecção de $3,0 \text{ nmol L}^{-1}$. Os mesmos autores relatam o desenvolvimento de um sensor para a determinação de dopamina em formulações farmacêuticas através da modificação de ECV com filmes de tetracianoetilenida (LiTCNE)/poli-L-lisina. (LUZ, et al., 2005).

De acordo com Luz et al. (2006b), um sensor amperométrico obtido através de filmes de ftalocianina de tetrasulfonato de cobalto (CoTSPc) e PLL sobre ECV mostra atividade eletrocatalítica na oxidação de cisteína, a qual foi determinada em amostras de suplemento alimentar com níveis de confiança de 95%.

Outros poliaminoácidos também têm sido descritos na literatura na construção de sensores eletroquímicos. Um exemplo é o uso do poliaminoácido poli histidina (PH) na modificação de HMDE, cujo estudo é descrito por Moreira, Zhao e Fogg (1990). A PH permite a determinação de cobre (II) em níveis de concentrações entre $5,0 \times 10^{-9}$ a $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, usando voltametria de redissolução catódica. O eletrodo modificado pela eletropolimerização do monômero histidina em meio

alcalino é utilizado nas oxidações electrocatalíticas de ácido ascórbico (AA), dopamina, epinefrina e catecol (CHEN; YU; XU, 1997; YU, et al., 1996),

A análise de citocromo C, mioglobina e hemoglobina também sobre eletrodos de prata recobertos com filmes de PH adsorvidos sobre sua superfície é reportado por Li et al. (1999). Os eletrodos de prata modificados com PH também se mostraram eficientes para catalisar a redução de NAD^+ para NADH (LONG; CHEN, 1997).

Liu et al. (1999) relataram o uso do eletrodo de ouro modificado com poli cisteína pela imersão em solução do monômero em tampão fosfato pH 5,0 por 30 minutos, seguido de secagem. O método permitiu a construção de uma curva analítica para a espécie cobre (II) na faixa de 5,0 a 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ e um limite de detecção de 25 ng L^{-1} . Eletrodo de ouro modificado por monocamadas auto-organizadas de L-cisteína foram usados na determinação de dopamina na presença de ácido ascórbico por cronoamperometria. Limite de detecção da ordem de $2,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (HU, et al., 2006) foi obtido. Eletrodo de mercúrio modificado por deposição *in situ* de cisteína foi utilizado por Bai et al. (1998), na determinação de cobre (II) com limite de detecção de $5,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ após um tempo de deposição de 2 minutos.

Narasaiah e Mitra (1992, 1993) tem mostrado a imobilização de poli tirosina e poli triptofano sobre eletrodo de platina através da eletropolimerização do monômero tanto em meio ácido como em meio básico. O sistema mostrou-se adequado para a análise de benzoquinona e ferrocianeto.

Cha et al. (1993) mostra que eletrodo modificado por troca iônica em um filme de $[\text{Ru}(\text{v-bpy})_3]^{2+}$ com triptofano pode ser usado na determinação de mercúrio em solução no intervalo de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

Eletrodo de carbono vítreo modificado com poli glicina usando polimerização via oxidação electroquímica do monômero foi obtido em solução tampão fosfato pH 7,0 pela ciclagem no intervalo de potencial entre -0,5 a +1,8 V. O EQM apresentou atividade catalítica para o ácido ascórbico com redução do sobrepotencial de 350 mV e a construção de uma curva analítica entre $6,0 \times 10^{-8}$ a $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (YU; ZHANG; CHEN, 1997a). Os mesmos autores relatam a oxidação do ácido úrico com redução do sobrepotencial de 250 mV (YU; ZHANG; CHEN, 1997b).

A modificação de eletrodo de fibra de carbono pela oxidação do monômero glicina em tampão fosfato pH 7,0 para determinação de dopamina e ácido úrico também é descrita por Chen, Yu e Zhang (1997). A determinação de dopamina e

ácido ascórbico também é descrita por Zhang e Lin (2001b) em eletrodo modificado com o monômero glicina, possibilitando uma redução de potencial de aproximadamente 150 mV e 230 mV, respectivamente. O limite de detecção obtido foi de $1,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para a dopamina e $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para o ácido ascórbico. O mesmo procedimento é utilizado por Zhang, Sun e Lin (2001) para o monômero α -alanina sobre ECV na determinação de ácido ascórbico na presença de dopamina.

Diante disto, seria relevante para o assunto novos estudos sobre a preparação, caracterização e aplicação de eletrodos modificados com poli ácido glutâmico como sensores eletroquímicos para a determinação de compostos fenólicos e farmacêuticos.

1.3. ELETRODOS MODIFICADOS COM POLI ÁCIDO GLUTÂMICO (PAG)

Os aminoácidos em geral são compostos que apresentam, na sua molécula, um grupo amino (-NH₂) e um grupo carboxílico (-COOH), que estão ligados ao carbono α , ao qual também se liga um átomo de hidrogênio e um grupo R. As estruturas do aminoácido ácido glutâmico (R = (CH₂)₂-COOH) podem ser encontradas dependendo do pH da solução em que se encontram (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995), com os respectivos valores de $pK_1 = 2,19$; $pK_R = 4,25$ e $pK_2 = 9,67$, conforme mostra a Figura 1.

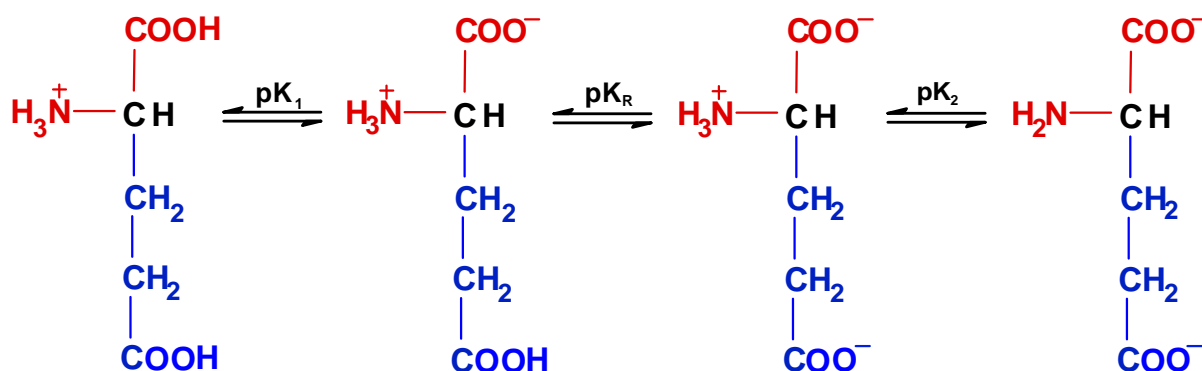


Figura 1 – Unidades monoméricas do ácido glutâmico em função do pH.

O poli ácido glutâmico (Figura 2) é formado por unidades repetitivas de glutamato que estão ligadas entre si pelos grupos α carboxílicos e α amino, podendo alcançar pesos moleculares da ordem de 10.000 até valores superiores a 1.000.000.

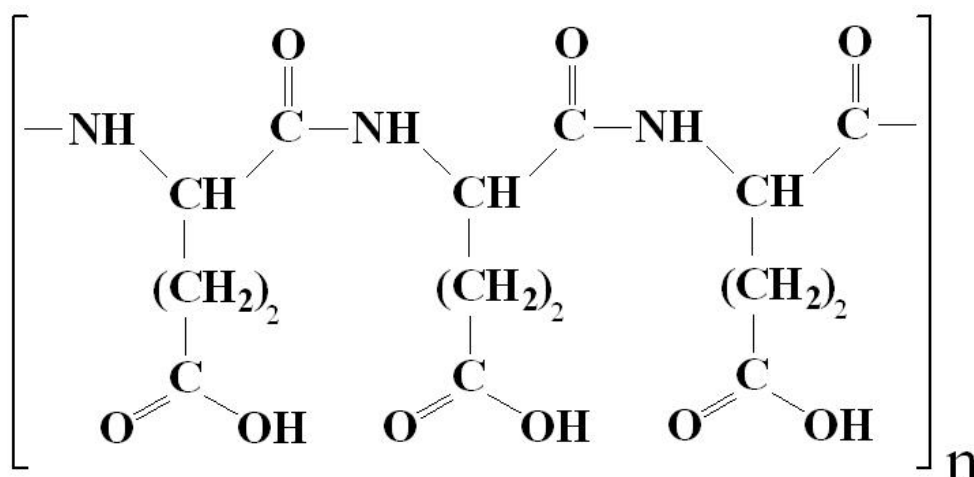


Figura 2 – Estrutura do poli ácido glutâmico.

O poliaminoácido PAG oferece pontos estratégicos para interação com o analito de interesse, tais como fármacos portadores de grupos R-NH₂, R-OH e R=O (RICHARD; MARGARITIS, 2001; LI, 2002). O PAG é biodegradável e não apresenta toxicidade, cuja característica o torna um candidato promissor para formação de conjugado polímero-droga e liberação seletiva do fármaco (LI, 2002). O polímero com elevados valores de peso molecular é processado no rim e recuperado totalmente na urina, e quantidades muito pequenas são acumuladas em outros tecidos. Embora estudos sobre a sua biodistribuição e biocompatibilidade sejam escassos, alguns estudos na literatura têm mostrado que o polímero PAG possui propriedades físico-químicas apropriadas para construção de pro-fármacos, através de interação com agentes anti-cancerígenos tais como: antraciclina, antimetabólitos, paclitaxel, camptotecinas (LI, 2002) e outros fármacos tais como prostaglandina E (HASHIDA, et al., 1999).

Além dos aspectos de biocompatibilidade do PAG, o seu uso na construção de sensores eletroquímicos tem sido investigado e descrito na literatura. Os exemplos mais significativos usados no recobrimento de diferentes materiais eletródicos são relatados a seguir.

Eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de PAG foram preparados por eletropolimerização direta de solução 0,02 mol L⁻¹ de ácido glutâmico no intervalo de potencial de -0,8 a +2,0 V (*vs.* ECS). O sobrepotencial envolvido na oxidação da hidrazina diminuiu 500 mV quando comparado com o obtido no eletrodo convencional, permitindo a detecção da mesma em concentrações tão baixas quanto 1,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ (YU; CHEN, 1997a).

Os autores Yu e Chen (1997b) também investigaram o comportamento voltamétrico do AA sobre eletrodo modificado com filmes de PAG. Nestas condições o AA é oxidado em potencial de +0,12 V, apresentando um decréscimo de sobrepotencial de 400 mV em relação ao eletrodo convencional, bem como o aumento das correntes de pico anódica. O limite de detecção obtido foi de $4,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. O desempenho do eletrodo modificado com PAG foi testado na determinação de AA em amostras de Vitamina C.

A modificação da superfície do eletrodo de ouro pela adição de monocamadas de PAG é descrita por Niwa et al. (1997). O método de modificação deste eletrodo mostrou-se satisfatório para incorporação de derivados de ferroceno na superfície, através de interações enantioméricas do ferroceno com α -aminoácidos.

A oxidação catalítica do ácido úrico e ácido ascórbico em ECV recoberto por filme de PAG, usando a oxidação voltamétrica do grupo amina no monômero através de varreduras sucessivas de potencial entre 0 a 1,7 V é descrita por Zhang e Lin (2001a). Um deslocamento de 200 e 300 mV no sobrepotencial das espécies respectivamente, e o significativo aumento das correntes de pico possibilitaram determinações de $1,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de ácido úrico e $9,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de ácido ascórbico em amostras de urina humana.

Com base nas propriedades do poli ácido glutâmico, investigou-se a possibilidade de modificação da superfície eletródica por filmes do poli aminoácido, com o intuito de usar os grupos carboxilas livres ao longo de sua cadeia principal para avaliar a interação com alguns tipos de analito, via troca iônica e/ou eletrocatalise. A seguir apresentamos uma análise dos principais trabalhos reportados na literatura para os analitos de interesse.

1.4. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Os compostos fenólicos são uma das maiores classes de metabólitos secundários de plantas. Surgem essencialmente na sua forma glicosilada ao nível das folhas, flores e frutos e outros tecidos de plantas. Quimicamente podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila, incluindo os seus derivados funcionais. A sua ocorrência em tecidos animais e outros que não os das plantas é explicada pela ingestão de produtos de origem vegetal. Os compostos fenólicos existentes nos alimentos pertencem geralmente a flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas e taninos. Muitas

das propriedades dos produtos de origem vegetal estão associadas com a presença e o seu conteúdo em polifenóis. Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides, sendo que ambos são metabólitos secundários bioativos.

1.4.1. FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos que apresentam em sua estrutura química o núcleo flavon, no qual consiste de três anéis fenólicos conforme mostra a Figura 3.

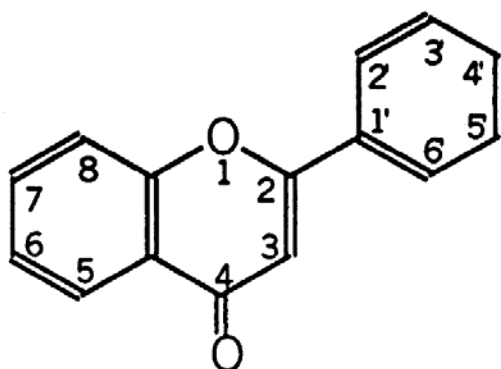


Figura 3 – Estrutura básica dos flavonóides.

O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um anel de fenil-benzeno como substituinte e a sua atividade depende da orientação destes substituintes na molécula. Eles podem ser agrupados em diversas classes estruturais incluindo antocianinas, flavonols, flavonas, isoflavonas e taninos apresentando atividade biológica bastante diversificada.

A rutina (quercetina-3-O-rutinoose), mostrada na Figura 4, é considerada um dos mais importantes flavonóides biologicamente ativos, sendo encontrada em mais de 70 espécies de plantas. Por exibir um amplo espectro de atividades biológicas, tais como cardiovascular, antiinflamatória, antioxidante e anticarcinogênica, diversos métodos descritos na literatura são requeridos para sua quantificação, dos quais destacamos os métodos eletroquímicos e espectrofotométricos (HASSAN; BARSOUM; HABIB, 1999; CARERI, et al., 2000; LIU; ZHANG; TIAN, 2003; WANG, et al., 2005; ABOU-DONIA et al., 2006; FANG, et al., 2007).

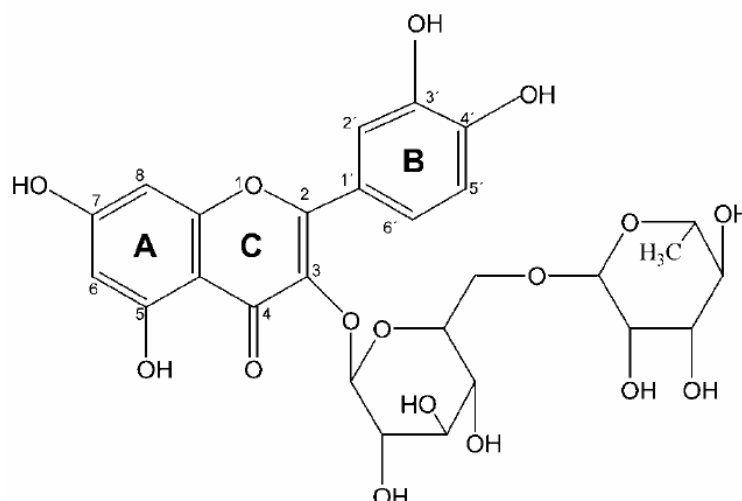


Figura 4 – Estrutura química da rutina.

Um estudo eletroquímico detalhado de quatro flavonóides, incluindo a rutina, com identificação de seus produtos de oxidação sobre eletrodo de carbono vítreo foi investigado por Hendrickson, Kaufman e Lunte (1994) utilizando técnicas de voltametria cíclica e disco rotatório.

Zoulis e Efstathiou (1996) investigaram o comportamento voltamétrico da rutina e outros flavonóides em eletrodo de pasta de carbono por voltametria cíclica e pulso diferencial. Usando etapa de pré-concentração, os autores propõem um método capaz de detecção em níveis de concentração abaixo de 10^{-7} mol L⁻¹ e, conseqüentemente, a aplicação na determinação de rutina em formulações farmacêuticas contendo multivitaminas.

Eletrodos de pasta de carbono obtidos pela mistura de nujol-grafite e difeniléter-grafite foram usados para a determinação de rutina e outros flavonóides por voltametria de redissolução em um sistema de injeção em fluxo. O procedimento foi desenvolvido para a determinação de rutina em preparação de multivitaminas por Volikakis e Efstathiou (2000).

Chen; Zhang e Ye (2000) desenvolveram um método baseado na eletroforese capilar (EC) com detecção eletroquímica para a determinação de rutina e quercetina em plantas. A determinação de rutina e AA simultaneamente em preparações farmacêuticas e suco de fruta por EC com detecção eletroquímica também foi investigada por Chen, Ding e Ye (2000). Uma relação linear da corrente de pico e a concentração de rutina foi obtida no intervalo de $1,0 \times 10^{-6}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $8,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Tang et al. (2000) utilizaram a rutina como mediador em filmes de biomembranas para o estudo de oxidação de NADH. Um deslocamento no sobrepotencial de 400 mV foi verificado na oxidação de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NADH quando comparado ao ECV convencional. Este filme de membrana biológica usando rutina como mediador também foi utilizado para a determinação de ácido ascórbico. A corrente de pico do AA aumenta drasticamente e o potencial de pico de $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ desloca negativamente 100 mV quando comparado ao eletrodo sem modificação. A corrente catalítica aumenta linearmente com a concentração de AA na região de $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (TANG, et al., 2001).

Bao et al. (2001) investigaram a interação da rutina com hemoglobina por voltametria cíclica. Os resultados mostraram a formação de um complexo supramolecular não eletroativo e o método foi aplicado na determinação de hemoglobina em amostras de sangue.

O comportamento eletroquímico da rutina foi também investigado sobre ECV por Kang et al. (2002) usando voltametria de pulso diferencial. Uma relação linear foi obtida na faixa de concentração de $3,3 \times 10^{-7}$ a $3,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção abaixo de $2,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, sendo o método aplicado em medicamentos chineses.

Determinação simultânea de rutina e vitamina C em compostos farmacêuticos foi proposta por Li; Zhang e Yuan (2002) usando a técnica de EC com detector eletroquímico. Excelente linearidade entre a corrente de pico e a concentração dos analitos foi obtida, com um limite de detecção para a rutina de $2,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Utilizando a mesma técnica descrita acima Cao; Wang e Yuan (2004) analisaram alguns flavonóides, dentre eles a rutina e outros compostos fenólicos, tais como o ácido ferúlico e o ácido cafêico em amostras de própolis. A faixa de linearidade na concentração dos compostos foi de $3,7 \times 10^{-7}$ a $1,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com recuperação de 94,9 a 108,4 %.

Pedrosa et al. (2006) relatam o uso de eletrodo de diamante dopado com boro para a detecção amperométrica e determinação de flavonóides em amostras de chá usando sistema de injeção em fluxo. Os resultados revelam que a corrente de pico aumenta linearmente com a concentração de rutina no intervalo de 0,1 a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e o limite de detecção foi de $7,7 \mu\text{mol L}^{-1}$. O método foi aplicado para a determinação de rutina em três diferentes infusões de chá verde.

A oxidação da rutina foi investigada sobre ECV pelas técnicas de voltametria cíclica, pulso diferencial e onda quadrada. Seu processo de oxidação é bastante complexo, envolvendo primeiramente a oxidação do grupo 3', 4' dihidroxila após transferência reversível de 2 elétrons e 2 prótons, seguida de uma reação irreversível do grupo 5,7 dihidroxila. Ambos os comportamentos são dependentes do pH (GHICA; BRETT, 2005).

Zeng et al. (2006) também investigaram o comportamento voltamétrico da rutina sobre eletrodo de ouro modificado com nanotubos de carbono. A reação eletroquímica gera um par de picos envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons. O método foi aplicado na determinação de rutina em medicamentos com recuperação de 95 a 105 %.

Voltametria de redissolução catódica foi aplicada para a determinação de rutina em formulações farmacêuticas, urina humana e no soro sanguíneo. O método foi desenvolvido baseado na adsorção do complexo Cu^{2+} rutina sobre HMDE e aplicado na quantificação de rutina. A voltametria cíclica foi usada para caracterizar o comportamento do complexo adsorvido. O limite de detecção em urina humana foi $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ no soro sanguíneo (TEMERK; IBRAHIM; SCHUHMANN, 2006).

Xu et al. (2006) utilizaram eletrodo de ouro modificado com monocamada auto-organizadas de 2-aminoetanotiol na determinação direta de rutina na presença de AA por voltametria de pulso diferencial.

Sensores eletroquímicos modificados com filmes de nanotubos de carbono têm sido investigados para a determinação de rutina em amostra de urina (HE, et al., 2006) e no soro sanguíneo (LIN; HE; ZHA, 2006).

Um procedimento eletroquímico é apresentado por Ensafi e Hajian 2006 para a determinação de rutina baseado na sua pré-concentração sobre HMDE. O complexo formado foi analisado por voltametria de onda quadrada e redissolução catódica apresentando um limite de detecção de $0,5 \text{ nmol L}^{-1}$. O método foi aplicado na determinação de rutina em chá e preparações farmacêuticas.

A quantificação de rutina em chá também foi investigada por Malagutti et al. (2006) usando voltametria de onda quadrada sobre ECV e eletrodo compósito de grafite/poliuretana. O limite de detecção foi de $7,1 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para o eletrodo modificado e $1,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para o ECV.

O desenvolvimento de um biossensor obtido pela imobilização da peroxidase obtida do jiló sobre o biopolímero chitosana foi aplicado na determinação de rutina em formulações farmacêuticas. O biossensor exibiu resposta linear para a rutina em concentrações de $7,2 \times 10^{-8}$ a $3,4 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, com índice de recuperação de 96,2 a 102,4% nas amostras (OLIVEIRA; FERNANDES; VIEIRA, 2006). Mousty et al. (2007) investigaram a aplicação de um biossensor usando polifenol oxidase para a determinação amperométrica de rutina.

A técnica de EC com detector eletroquímico também foi aplicada em casca e suco de uva para a determinação de ácido ascórbico e alguns flavonóides, dentre eles a rutina. Uma resposta linear foi obtida no intervalo de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (WU; GUAN; YE, 2007).

1.4.2. ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos fenólicos não são considerados flavonóides, sendo reunidos em dois grupos: derivados do ácido hidroxicinâmico e do ácido hidroxibenzóico. Os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico possuem um anel aromático com substituintes hidroxilas, uma cadeia carbônica de três carbonos ligados ao anel e uma insaturação entre C7 e C8, conforme podemos observar na Figura 5.

No grupo dos ácidos hidroxibenzóico a presença do grupo carboxílico ligado ao anel aromático caracteriza esta classe de compostos fenólicos. Ambos os grupos de compostos têm apresentado atividade antioxidante, característica esta geralmente determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula, sendo os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido hidroxibenzóico. Isto se deve à dupla ligação presente na molécula.

O interesse nestes ácidos fenólicos é baseado na sua atividade farmacológica com propriedades antioxidantes, antimutagênicas e anticarcinogênicas (NIELSEN; SANDSTROM, 2003; SHAHRZAD; BITSCH, 1996). Dentre os diversos tipos de ácidos fenólicos com estas propriedades destacamos (Figura 5): ácido caféico, clorogênico, sinápico, ferúlico, *p*-cumárico e ascórbico.

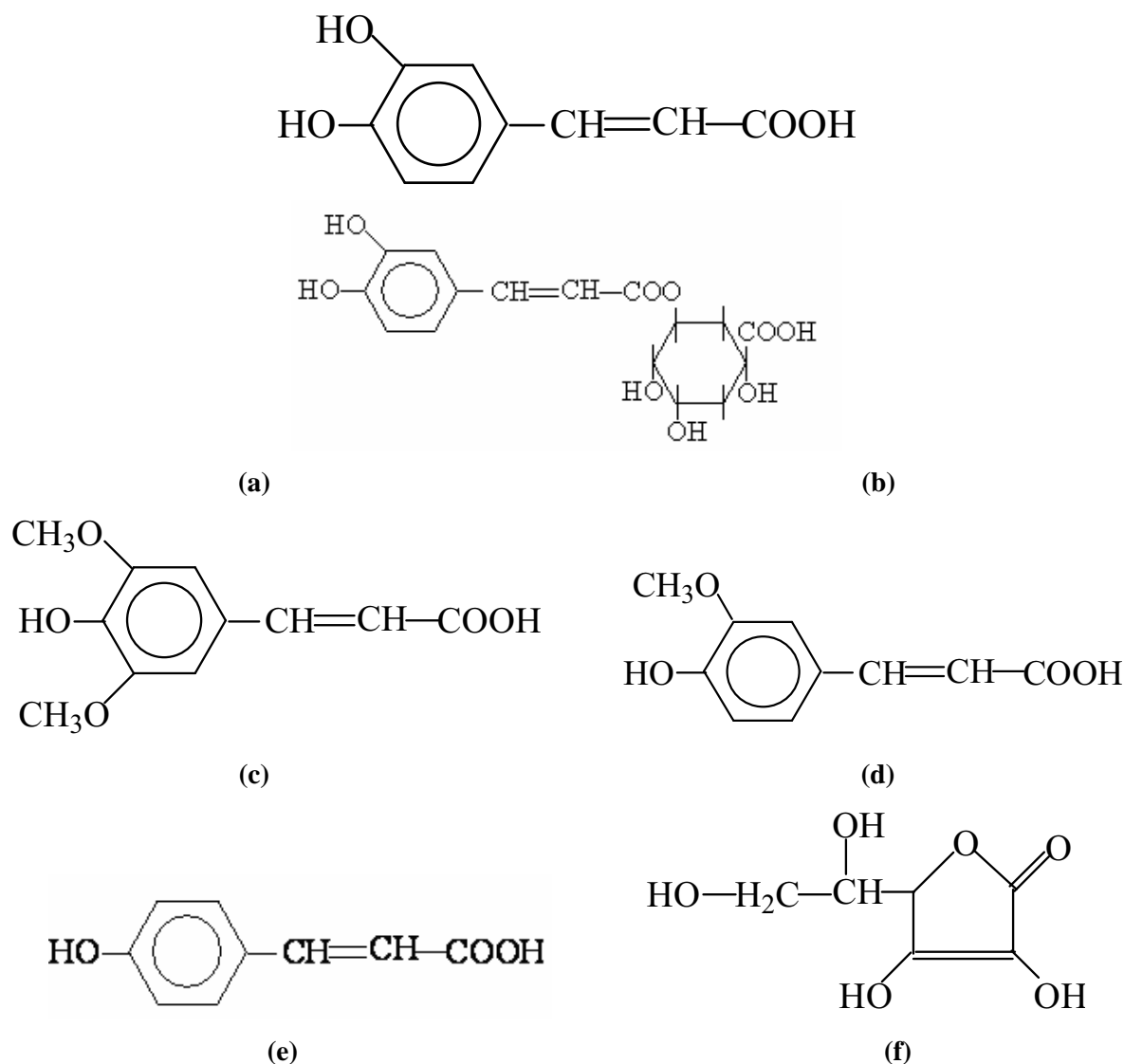


Figura 5 - Estrutura química de alguns ácidos fenólicos: (a) ácido cafêico, (b) ácido clorogênico, (c) ácido sinápico, (d) ácido ferúlico, (e) ácido *p*-cumárico e (f) ácido ascórbico.

Tendo em vista a importância dessas substâncias para a saúde, métodos analíticos, simples e econômicos para estes compostos são usualmente requeridos, dos quais destacam-se alguns, descritos a seguir.

Substâncias fenólicas derivadas de cinamatos apresentam espectro característico quando analisadas por espectrofotometria na região do ultravioleta, o qual tem sido usado para detectar adulteração em bebidas alcoólicas (BOCCHI, et al., 1996; ESCARPA; GONZALEZ, 2001).

O uso da técnica CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) com detecção espectrofotométrica é proposta na literatura para a determinação de ácidos fenólicos e flavonóides presentes em extratos vegetais (PEYRAT-MAILLARD; BONNEL; BERSET, 2000). Segundo os autores que investigaram o comportamento

voltamétrico dos ácidos fenólicos e tocoferol, o baixo potencial requerido para sua oxidação (100 – 450 mV), pode ser correlacionado à facilidade de oxidação dos substituintes fenólicos presentes no anel aromático, que por sua vez está relacionada com o potencial antioxidante destes compostos. Do mesmo modo, a detecção dos flavonóides foi obtida em valores de potenciais entre 0 a 900 mV e também correspondem à oxidação de grupos fenólicos presentes na molécula.

A determinação por CLAE acoplada aos detectores eletroquímico e de arranjo de diodo foi relatada por Zheng, Suo e Liu (2006) para quatro compostos fenólicos, dentre eles, o ácido cafêico e o ácido ferúlico. O índice de recuperação dos compostos em amostras de medicamentos foi de 96,5 a 101,7 %.

Karavicoká e Simko (2000) relataram à importância do método CLAE acoplada a detectores de arranjo de diodo, eletroquímico e fluorimétrico na determinação de antioxidantes fenólicos sintéticos adicionados em diferentes tipos de alimentos. Anteriormente, Christofersen e Cardwell (1996) mostraram que a determinação destes compostos fenólicos também foi possível através da técnica de injeção em fluxo com detecção eletroquímica no potencial de +0,78 V.

A oxidação do ácido cafêico foi investigada por Hapiot et al. (1996) em meio aquoso e não aquoso utilizando a técnica de voltametria cíclica. Os resultados mostraram que a oxidação da forma hidroquinona para quinona é um processo reversível envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons. O mecanismo de oxidação do ácido cafêico sobre ECV também foi investigado por Hotta et al. (2002) e os resultados foram semelhantes aos obtidos pelos outros autores.

As técnicas eletroanalíticas têm sido uma valiosa ferramenta instrumental para a aplicação de biossensores na quantificação total de compostos fenólicos em amostras de produtos comerciais, como vinho (GAMELA, et al., 2006), azeite de oliva extra virgem (JIMÉNEZ; VELARTE; CASTILLO, 2007) e amostras de plasma humano (ODACI, et al., 2007).

A oxidação de ácidos hidroxicinâmicos em meio aprótico foi investigado por Petrucci et al. 2007 usando a técnica espectroeletroquímica. Eletrólises a potencial controlado foram monitoradas por mudanças espectrais em função do tempo nos espectros de UV e as soluções eletrolisadas analisadas por CLAE acoplada a espectrometria de massa. A oxidação anódica dos ácidos mono e di-fenólicos estudada por voltametria cíclica mostra a ocorrência de um processo reversível envolvendo dois elétrons, estabilizando a formação do cátion correspondente.

No entanto, o uso de métodos eletroquímicos baseados em eletrodos quimicamente modificados têm sido pouco explorados. Diante disto seria de grande

importância investigar a oxidação destes compostos sobre eletrodo modificado com filme de PAG no intuito de potencializar sua determinação em matrizes bastante diversificadas, uma vez que são de grande importância na avaliação de produtos alimentares.

1.5. COMPOSTOS FARMACÊUTICOS

1.5.1. AMOXICILINA (AMX)

A amoxicilina, ácido penicilânico 6-(*p*-hidroxi α -amino fenil acetamida) é um antibiótico β -lactâmico da família das penicilinas, de grande importância no combate a microorganismos. As penicilinas possuem em comum em suas estruturas o núcleo característico, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), como mostra a Figura 6. A diversidade de antibióticos desta família consiste na mudança de suas propriedades quando o núcleo é substituído por diferentes terminações em R₁, R₂ e R₃.

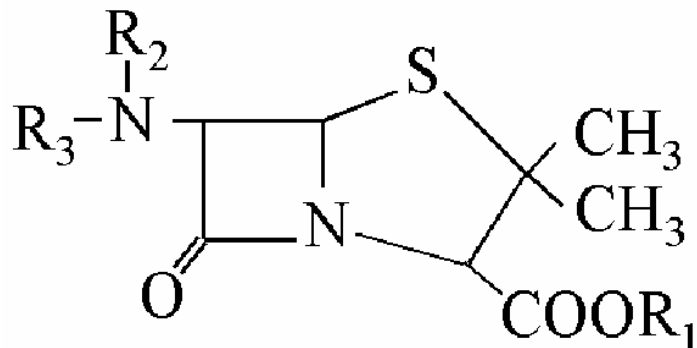


Figura 6 - Estrutura do 6-aminopenicilânico (6-APA).

A penicilina é um dos mais importantes antibióticos, sendo amplamente usada até hoje, com produção de novas gerações a cada ano através de derivados do seu núcleo básico. Muitos desses derivados possuem vantagens peculiares, de modo que na atualidade, vários membros desse grupo de antibióticos constituem drogas de escolha para grande número de doenças infecciosas. Dentre os diversos antibióticos pertencentes à família das penicilinas, o derivado denominado amoxicilina (Figura 7) destaca-se por apresentar como principal característica melhor absorção gastrointestinal, sendo o único a apresentar um grupo fenol como substituinte na molécula.

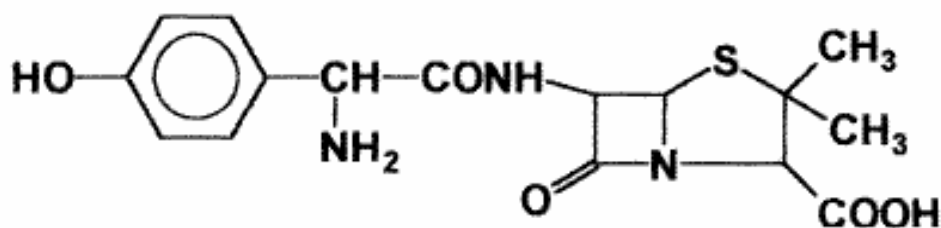


Figura 7 - Estrutura química da amoxicilina.

AMX é muito utilizada no tratamento antibacteriano, como princípio ativo de inúmeras formulações, seja na forma única ou em associações. O método descrito na Farmacopéia Britânica em 1998 para a determinação de amoxicilina triidratada em forma de cápsula ou injeção é a CLAE com detecção espectrofotométrica, enquanto que na Farmacopéia Americana (1990 apud BERGAMINI, et al., 2006), recomenda-se o método de titulação iodométrica.

Devido à importância do seu uso terapêutico, diversos métodos de análises são requeridos para seu controle clínico e industrial, seja na forma pura ou em preparações farmacêuticas, bem como em fluidos biológicos. A AMX é rapidamente absorvida pelo intestino numa extensão de 72-93%, a sua meia-vida de eliminação é de aproximadamente 1 hora. A principal via de eliminação da AMX é através dos rins, aproximadamente 60-70% do fármaco é excretado inalterado pela urina durante as primeiras 6 horas após a administração de uma dose padrão. A AMX também é parcialmente eliminada pela urina como ácido penicilóico, em quantidades equivalentes a 10-25% da dose inicial (FURP – AMOXICILINA, 2007). Com isso vários métodos analíticos são reportados na literatura para sua determinação, dos quais relatamos a seguir aqueles baseados nas técnicas espectrofotométricas, cromatográficas e eletroquímicas.

A determinação de amoxicilina e ampicilina em preparações farmacêuticas por espectrofotometria é relatada por Belal et al. (2000). O método envolve a hidrólise dos fármacos em meio ácido seguida da neutralização em meio básico e adição de cloreto de paládio (II). A detecção para a AMX foi possível na região de concentração de 10–40 mg ml⁻¹ em $\lambda_{\text{máx.}} = 335$ nm.

O complexo formado entre a AMX e o tiocianato de Mo (V) foi determinado espectrofotometricamente no $\lambda_{\text{máx.}} = 467$ nm com relações lineares entre concentração de 7,5 a 75,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, usando como base a extração do complexo com cloreto de metileno (MOHAMED, 2001).

Salem e Saleh (2002) reportaram a determinação quantitativa de amoxicilina e outros antibióticos β -lactâmicos por espectrofotometria em preparações farmacêuticas, via oxidação com cério (IV) ou ferro (III) em meio ácido. Em 2004, Salem relatou o desenvolvimento de quatro novos métodos espectrofotométricos para a determinação de antibióticos β -lactâmicos, entre eles a AMX em formulações farmacêuticas.

Pasamontes e Callao (2003) também relataram a determinação de AMX em formulações farmacêuticas usando análise por injeção seqüencial (FIA) com um detector espectrofotométrico de arranjo de diodo, sendo um método rápido e com baixo consumo de reagentes.

Fernández-González, Badía e Díaz-García (2005) propõem um mecanismo de reação para a degradação de antibióticos β -lactâmicos na presença de íons cobre (II) usando os métodos espectrofotométrico e fluorimétrico. O espectro de UV-vis mostra uma absorção máxima em 323 nm para a AMX na presença de íons cobre em meio tamponado de pH 3,5.

Al-Abachi, Haddi e Al-Abachi (2005) desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação de AMX em soluções aquosas e preparações farmacêuticas pela interação do fármaco com N, N-dimetil-p-feniletildenodiamina na presença de hexacianoferrato de potássio (III). O produto da reação foi determinado por batelada utilizando-se FIA e monitorado em $\lambda_{\text{máx.}} = 660$ nm. García-Reiriz, Damiani e Olivieri (2007) também investigaram a determinação de AMX por análise multivariada de segunda ordem usando dados espectrofotométricos. O mecanismo de hidrólise do fármaco catalisado pelo metal envolve a formação de um intermediário com uma absorbância máxima em aproximadamente 330 nm. O método foi aplicado na determinação de AMX em amostra de urina humana e comparado com a técnica CLAE.

A amoxicilina e a ampicilina são as duas únicas penicilinas utilizadas em alimentos para animais como forma de medicamento devido à boa resistência ao suco gástrico, sendo assim Gamba e Dusi (2003) relataram o uso da cromatografia líquida com detecção fluorescente destas duas penicilinas em alimento de suínos com um limite de detecção de $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ nas amostras fortificadas e um índice de recuperação acima de 80 %.

Sendo a AMX um dos antibióticos mais importantes no tratamento de infecções bacterianas, a sua determinação em amostras biológicas e leite bovino é de grande importância para estudos farmacocinéticos após sua administração. Com base nisso, a determinação simultânea de antibióticos β -lactâmicos em

amostras de leite bovino utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização por *electrospray* foi investigada por Riediker e Stadler (2001), Bruno et al. (2001) e Holstege et al. (2002). Este método também foi utilizado na análise quantitativa de AMX e seus metabólitos em amostras de tecido animal (DE BAERE, et al., 2002) e em plasma humano por Yoon et al. (2004).

Aghazadeh e Kazemifard (2001) determinaram AMX e ácido clavulânico em formulações farmacêuticas por CLAE com detector eletroquímico operando em potencial de +1,25 V. O limite de detecção para a AMX foi de 0,8 ng mL⁻¹.

Pajchel; Pawłowski E Tyski (2002) utilizaram a técnica EC com detecção espectrofotométrica para a determinação simultânea de antibióticos β -lactâmicos e inibidores β -lactâmicos em formulações farmacêuticas.

Wibawa et al. (2002) utilizando CLAE com detecção fluorimétrica ($\lambda_{exc.} = 365$ nm e $\lambda_{em.} = 445$ nm) determinaram concentrações de AMX em plasma de ratos em concentrações de 0,5 μ g mL⁻¹; 0,1 μ g mL⁻¹ em suco gástrico e 0,075 μ g g⁻¹ em tecido gástrico. Hoizey et al. (2002) também determinaram concentrações de 0,6 - 20,0 mg L⁻¹ de AMX em plasma humano desproteínizado com metanol, utilizando a técnica CLAE com detecção UV em $\lambda_{m\acute{a}x.} = 220$ nm. A determinação de AMX em plasma humano pelo uso da CLAE acoplada a detector de arranjo de diodo possibilitou um limite de quantificação de AMX de 0,5 μ g mL⁻¹; o método foi aplicado com sucesso em estudos farmacocinéticos envolvendo ratos (MATAR, 2006).

Santos et al. (2007) aplicaram EC com detector espectrofotométrico para a determinação simultânea de seis antibióticos em amostra de leite fortificada. O índice de recuperação dos antibióticos para as fortificações no leite de 2,5 a 5,0 μ g mL⁻¹ foi de 72%.

Dentre os métodos eletroquímicos, podemos destacar a facilidade das reações de complexação da AMX com os íons metálicos que motivou Shoukry (1992) a determinar AMX através de titulação potenciométrica na forma de complexos com cobre, níquel, cobalto e zinco.

Complexos formados pelos íons metálicos (níquel, cobalto, cobre e zinco) com AMX também foram estudados por Lyle e Yassin (1993) através de redução polarográfica do complexo sobre eletrodo gotejante de mercúrio. A região de linearidade para determinação do fármaco foi de $4,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

A oxidação eletroquímica de algumas penicilinas utilizando-se eletrodo de ouro, cujo processo é catalisado pelos filmes de óxidos formados na superfície do eletrodo é relatada por Koprowski, Kirchmann e Welch (1993).

Biryol, Uslu e Kucukyavuz (1998) investigaram a determinação de AMX usando o processo de oxidação sobre eletrodo de pasta de carbono modificado com poli 4-vinil piridina, e outros eletrodos como a platina, rutênio ou ouro, e somente com o eletrodo de pasta de carbono modificado foi possível a determinação de AMX em preparações farmacêuticas sem qualquer etapa de separação.

O uso da técnica de voltametria também é relatado por Uslu e Biryol (1999) para a determinação de AMX sobre eletrodo de pasta de carbono modificada com poli-vinil imidazol. A linearidade da resposta obtida no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ é boa e o método exibe um limite de detecção de $8,1 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado para a determinação direta de AMX em formulações farmacêuticas.

O uso de eletrodo de pasta de carbono modificado com complexo de oxovanádio na determinação de AMX foi investigado por Bergamini et al. (2006) usando as técnicas de voltametria cíclica (CV), onda quadrada (SWV) e pulso diferencial (DPV) com limites de detecção respectivamente, de 24,8; 16,6 e 8,49 μ mol L⁻¹. O método por DPV usando o eletrodo modificado foi aplicado na determinação de AMX em formulações farmacêuticas e comparado com o método iodométrico.

Diante da importância da AMX como antibiótico e poucos estudos relatados com EQM, seria de grande interesse investigar o comportamento da AMX sobre ECV modificado com filmes do PAG, possibilitando assim desenvolver um método para sua quantificação em amostra de urina.

1.5.2. DOXORRUBICINA (DXR)

As antraciclinas têm sido usadas por mais de 30 anos no tratamento de câncer (mama, pulmão, tireóide, bexiga). Muitas delas carregam um grupo morfolínico na posição 3' ou 4' do resíduo de açúcar, enquanto outras possuem um grupo hidrofílico ligado na posição 9 da cadeia, conforme Figura 8. Os antibióticos antraciclínicos representam uma classe de compostos que possuem sítios eletroativos susceptíveis a sofrer redução e oxidação.

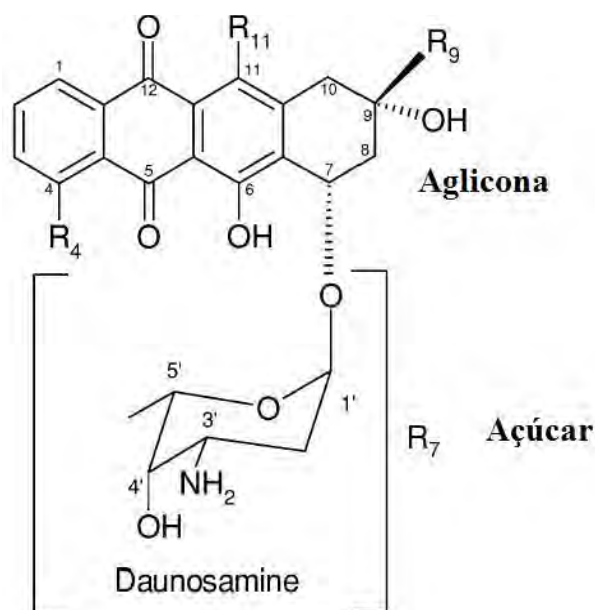


Figura 8 - Estrutura química básica das antraciclina.

De modo geral, os metabólitos das antraciclina diferenciam-se pela natureza dos substituintes (R₄/R₇/R₉ e R₁₁) localizados em sua estrutura básica.

A doxorubicina também conhecida como adriamicina é um antibiótico da família das antraciclina com um grande espectro de ações antineoplásicas e aplicações quimioterápicas, incluindo uma variedade de tumores sólidos, comprovando a importância de seu estudo na interação com moléculas de DNA. Há evidências experimentais de que a DXR pode promover estresse oxidativo na dupla-hélice do DNA em células cancerígenas por geração de espécies oxidativas reativas (KIYOMIYA; MATSUO; KURUEBE, 2001; ZHOU, et al., 2001). Ela se liga ao DNA por intercalação entre os pares de bases nitrogenadas e inibe a transcrição do RNA (WARING, 1981). É altamente efetiva no tratamento de sarcomas, mas sua cardiotoxicidade limita o uso clínico. A estrutura da DXR consiste de um quinóide tetracíclico aglicona, com um endógeno fluorescente e um amino açúcar, como podemos observar na Figura 9.

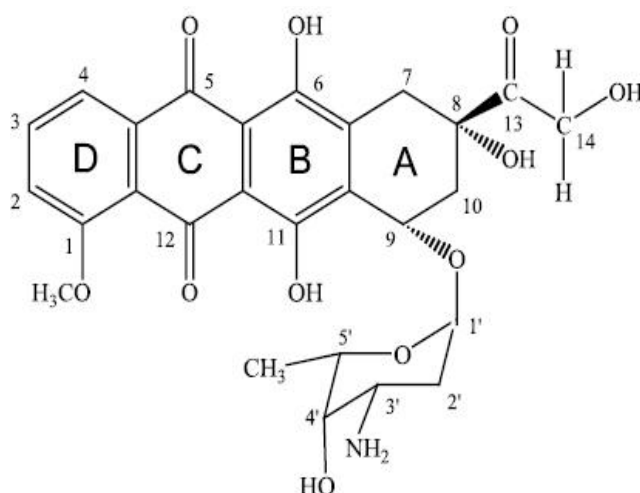


Figura 9 - Estrutura da Doxorubicina.

A DXR possui ambos os grupos quinonas (=O) e hidroquinonas (-OH) e por isso pode ser reduzida ou oxidada eletroquimicamente. O comportamento eletroquímico usual é descrito por Ossowski et al. (2000) como um processo de redução da quinona para a forma semiquinona, tal como na presença de agentes redutores biológicos tais como NADH e NADPH. A geração da espécie radicalar de grande estabilidade é importante no seu mecanismo de ação e tem merecido destaque.

A complexação deste fármaco com os íons metálicos também desempenha um importante papel nas propriedades das antraciclina. Esta interação tem dado uma nova direção na busca da eficácia quimioterápica, diminuindo assim a toxicidade destes fármacos. De modo geral, a complexação desta classe de compostos com alguns metais pode causar uma significativa influência nas propriedades redox destes fármacos (ALLMAN; LENKINSKI, 1987; GREENAWAY; DABROWIAK, 1982).

O desenvolvimento de métodos analíticos eficientes e sensíveis tem sido essencial para a determinação rotineira de diversas drogas e seus metabólitos em fluidos e tecidos fisiológicos, contribuindo para evolução tecnológica e otimização na administração desses fármacos. Dentre os diversos métodos propostos na literatura para a análise de DXR podem ser destacados aqueles baseados nas técnicas espectrofotométricas (HUSAIN; AGBARIA; WARNER, 1993; SASTRY; RAO, 1996; NAKAO, et al., 2006), cromatográficas (TJADEN; BRUIJN, 1990; ZHAO; DASH, 1999; ZAGOTTO, et al., 2001) e eletroquímicas.

No ano de 1977, Sternson e Thomas relataram o uso da técnica polarográfica de pulso diferencial na quantificação de espécies de DXR em plasma sanguíneo monitorando-se a redução do grupo quinona em $-0,6$ V, com limite de detecção de $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

O comportamento eletroquímico da DXR sobre o eletrodo de pasta de carbono é também descrito por Baldwin, Packett e Woodcock (1981). A DXR é determinada pela técnica de pulso diferencial monitorando-se a onda de oxidação do grupo hidroquinona em $E_p = +0,5$ V. O método permite obtenção de curva analítica linear no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

A pré-concentração de DXR em eletrodos de pasta de carbono também é descrita por Chaney e Baldwin (1982). Os autores quantificam a DXR através da onda de oxidação em $+0,50$ V (*vs.* ECS) pela técnica de pulso diferencial. O método foi aplicado em amostras de urina obtida de paciente com câncer após a administração intravenosa de DXR, com um desvio padrão relativo entre as medidas de 10%. Os mesmos autores no ano de 1985 relatam a quantificação de DXR pela técnica de análise por injeção em fluxo pela adsorção da DXR sobre eletrodo de pasta de carbono em potencial de $+0,57$ V (*vs.* Ag/AgCl). O método permite limite de detecção de 10^{-9} mol L⁻¹.

A forte adsorção de DRX sobre ECV e grafite pirolítico por meio de medidas voltamétricas e microscopia de força atômica (AFM) tem sido relatada por Brett, Piedade e Chiorcea (2002). Os autores demonstram que a oxidação da DRX adsorvida sofre influência da variação de pH e envolve o mecanismo de dois elétrons e dois prótons. As imagens de AFM foram utilizadas para estudo da superfície que comprova a rápida e espontânea adsorção da DXR na superfície do eletrodo pirolítico. A forte quimissorção da DXR sobre ECV é irreversível e possibilita limites de detecção da ordem de picomols (10^{-10} mol L⁻¹).

A interação da DXR com íons ferro (III) e nicotinamida (NA) tem sido investigada por Çakır et al. (2003). O complexo é acompanhado eletroquimicamente sobre eletrodo de mercúrio por voltametria cíclica e onda quadrada, e também medidas espectrofotométricas em condições aeróbicas e anaeróbicas. O complexo formado entre o ferro e a DXR apresenta um par de pico reversível em $-0,49$ V ($\lambda_{\text{máx.}} = 580$ nm), o qual é mais estável em condições aeróbicas. Na presença de nicotinamida forma-se um intermediário (NA-Fe (III)-DXR) redutível a $-0,46$ V, cuja ação é potencializar a diminuição do efeito cardiotoxico da DXR.

Por voltametria de onda quadrada Komorsky-Lovric (2006) relata a cinética da reação redox da DXR adsorvida sobre eletrodo de grafite impregnado com

parafina (PIGE) e eletrodo de mercúrio. A DXR é adsorvida no eletrodo de mercúrio por 30 segundos a -0,1 V sem agitação da solução e no PIGE é adsorvida pela imersão do eletrodo na solução de DXR por 3 minutos. Os resultados mostram que para ambos os eletrodos a DXR apresenta dois pares de picos redox, estes correspondentes à redução da quinona e à oxidação da hidroquinona, sendo melhor adsorvida sobre o PIGE.

Para uma melhor compreensão do mecanismo de ação da DXR *in vivo*, muitos estudos têm sido realizados visando a interação da DXR com moléculas de DNA, uma vez que sua ação ainda não é totalmente compreendida. A interação da DXR com o DNA é mostrada por Zhang e Li (2000) que através de estudos eletroquímicos utilizando eletrodo de mercúrio indicam a ocorrência da formação de um complexo supramolecular DXR-DNA eletroquimicamente não ativo. O decréscimo da corrente é proporcional à concentração de DNA, o qual foi usado para a correspondente determinação do fármaco.

Dentro deste contexto, Brett et al. (2002) investigaram a detecção eletroquímica de DXR *in situ* durante estresse oxidativo de DNA. A interação da droga com o DNA pode promover reações de oxidação e redução cujo produto pode reagir especificamente com a guanina causando o estresse oxidativo e geração de resíduos de 8-oxoguanina, principal produto de oxidação da guanina.

Eletrodo de ouro dopado com tiol-DNA e mercaptana *n*-hexadecil (HDM) foram investigados para estudo da interação entre DXR e azul de metileno (MB) pela técnica de voltametria cíclica. A DXR foi completamente bloqueada no filme de HDM enquanto no MB sofre reação redox. Adsorção não específica de DNA na superfície de ouro foi observada, conduzindo ao aumento progressivo das correntes redox da DXR e o MB. Isto é atribuído à pré-concentração de ambos sobre a superfície modificada por meio de interações eletrostáticas com o DNA (YAU; CHAN; YANG, 2003).

Dentre os trabalhos relatados na literatura, as técnicas eletroquímicas têm sido utilizadas tanto para quantificação quanto para estudo da interação da DXR com moléculas de DNA. Embora tenha seu comportamento redox investigado e descrito na literatura, podendo ser oxidada e/ou reduzida eletroquimicamente, conforme mecanismo proposto (Esquema 7 página 125) por Brett et al. (2002) nenhum estudo baseado em eletrodos modificados por poliaminoácidos tem sido realizado. Deste modo o uso do eletrodo de carbono vítreo modificado por filmes de PAG pode contribuir na interação da DXR com a superfície modificada potencializando sua aplicação.

2. OBJETIVOS

Preparação de eletrodos de carbono vítreo modificados com filmes de poli ácido glutâmico e caracterização por voltametria cíclica, microscopia de força atômica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

Aplicação dos eletrodos modificados com filmes do poli aminoácido para interação com compostos fenólicos tais como ácido ascórbico, rutina e ácido cafêico e farmacêuticos como a amoxicilina e a doxorrubicina visando o desenvolvimento de novas metodologias analíticas para determinação de ambos os compostos utilizando técnicas voltamétricas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPAMENTOS

Os experimentos voltamétricos foram realizados em um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 30 acoplado ao microcomputador controlado por software GPES 4.9. Um sistema de três eletrodos (EG & PARC) foi usado, consistindo de um eletrodo de calomelano saturado (ECS) exceto para a rotina que utilizou-se como um eletrodo de referência um prata/cloreto de prata saturado ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$) e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Todas as medidas foram realizadas em eletrodo de carbono vítreo (ECV) como eletrodo de trabalho, com 3 mm de diâmetro.

As análises de Microscopia de Força Atômica (AFM) foram realizadas em um equipamento PicoSPM controlado pelo módulo MAC e interface com o controlador PicoScan (Molecular Imaging Co.). Os experimentos foram monitorados por um scanner CS AFM S (Molecular Imaging Co.) com escala de 6 μm em x - y e 2 μm em z . Nas medidas foram utilizados Silicone tipo II MAClevers de 225 μm de comprimento, constante de 2.8 N m^{-1} e frequências de ressonância em ar de 60–90 kHz. Todas as imagens foram realizadas à temperatura ambiente; com velocidade de varredura de 1,00–1,13 linhas s^{-1} . Quando necessário, o processamento das imagens de AFM pelo módulo MAC Mode incluiu o alisamento da imagem topográfica, de primeira ou segunda ordem, para remover o declive do plano de base, e o ajustamento do contraste e da luminosidade das imagens. Os substratos usados nas análises foram ECV ($d = 6 \text{ mm}$) e eletrodo de grafite pirolítico altamente orientado (HOPG) (Advanced Ceramics Co.) com 15 x 15 x 2 mm^3 , os quais foram limpos e modificados com filmes de PAG pelos três diferentes procedimentos relatados acima. O ECV foi polido usando *spray* de diamante (1 μm) e lavado com água desionizada antes das medidas de AFM. O HOPG foi limpo com fita adesiva antes de cada experimento. O ECV modificado com o filme MONO foi preparado em um compartimento de Teflon de aproximadamente 12,5 mm de diâmetro interno, prendendo o ECV no fundo da célula. Um contra eletrodo de platina e um fio de Ag como um eletrodo pseudo-referência (AgQRE) foram colocados na célula, imergindo aproximadamente 5 mm na solução.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em um μ Autolab acoplado ao software GPES 4.9, Eco-Chemie. Foi usada uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

As medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) foram realizadas em potencial de circuito aberto na ausência e na presença dos filmes de PAG em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico em temperatura ambiente interfaciado ao software FRA em um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 30 acoplado ao microcomputador. Os dados foram coletados em uma escala de frequência de 100 mHz a $0,01 \text{ Hz}$ com cinco pontos por escala de frequência e um potencial de polarização de $+0,2 \text{ V vs. ECS}$. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em uma gaiola de Faraday.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis) da Hewlett Packard modelo 8453 interfaciado ao programa UV-visible Chemstation Software da Hewlett Packard modelo HP – 845X. A cubeta de quartzo utilizada nas análises foi de $1,0 \text{ cm}$ de comprimento óptico.

As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro MICRONAL modelo B222 com um eletrodo de pH/combinado da marca MICRONAL.

3.2. REAGENTES

Reagentes grau suprapuro fornecidos pela Merck e água desmineralizada de um sistema Milli-Q (Millipore) foram usados na preparação de todas as soluções. As diferentes soluções tampão utilizadas como eletrólito de suporte foram preparadas da seguinte forma: Soluções tampão acetato em diferentes valores de pH foram preparadas pela mistura de quantidades apropriadas de soluções $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético e acetato de sódio. Soluções tampão Britton-Robinson (B-R) foram preparadas usando soluções $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético, bórico e orto-fosfórico e ajustadas com solução de hidróxido de sódio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. Soluções tampão fosfato foram preparadas pela mistura de soluções $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido hidrogênio fosfato de sódio e dihidrogênio fosfato de sódio em diferentes valores de pH.

Soluções estoque do flavonóide rutina (Sigma) e dos ácidos fenólicos: caféico (Sigma), clorogênico (Sigma), ferúlico (Sigma), *p*-cumárico (Sigma), sinápico (Sigma) e ascórbico (Sigma) foram preparadas diretamente da substância pura. As soluções de Amoxicilina triidratada (DEG Importação de Produtos Químicos) e Cloridrato de Doxorrubicina (Sigma) foram preparadas a partir da substância pura. Antes das medidas eletroquímicas, as soluções foram desaeradas com gás nitrogênio para remoção de oxigênio das soluções em estudo. As soluções de rutina (Sigma) foram preparadas a partir da substância pura pela dissolução direta em etanol (Aldrich).

Soluções do poliaminoácido poli ácido glutâmico (Aldrich) (PM = 50,000-100,000) foram obtidas pela dissolução de 25 mg do PAG em 2,5 mL de água desionizada (solução 1% m/v). Estas soluções foram armazenadas a 0°C em frascos individuais com capacidade de 100 µL de solução e descongeladas para uso.

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. PREPARAÇÃO DE FILMES DE POLI ÁCIDO GLUTÂMICO

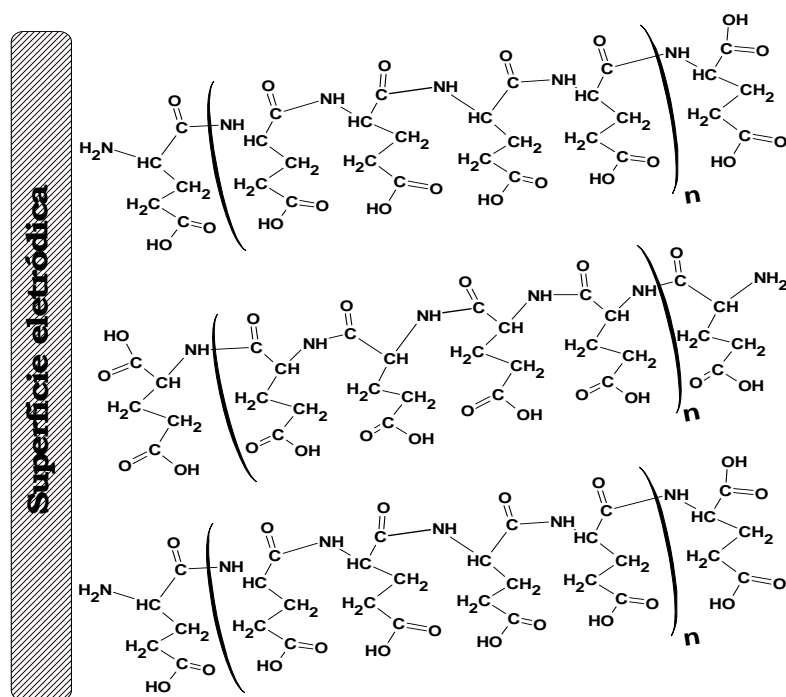
Primeiramente o ECV foi polido com alumina (0,3 µm, BUEHLER) dispersa sobre tecido aveludado, seguido de lavagem com etanol e água. Seco a temperatura ambiente antes do uso. A obtenção dos filmes de PAG sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi testada usando-se três diferentes procedimentos, conforme descritos a seguir.

3.3.1.1. ELETROPOLIMERIZAÇÃO (MONO)

O eletrodo de carbono vítreo foi modificado pela eletropolimerização do monômero em uma solução 0,02 mol L⁻¹ de ácido glutâmico (Sigma) tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 (YU; CHEN, 1997a,1997b). Voltamogramas cíclicos em velocidade de varredura (*v*) sucessiva de 100 mV s⁻¹ por 15 ciclos foram obtidos no intervalo de potencial de -0,8 a +2,0 V (*vs.* ECS).

3.3.1.2. ADIÇÃO DIRETA DE PAG (PAG)

Neste procedimento uma alíquota de 16 μL de uma solução aquosa (1% m/v) do PAG foi colocada na superfície eletródica com uma micropipeta para garantir que toda a área do eletrodo fosse coberta uniformemente, conforme Esquema 1.



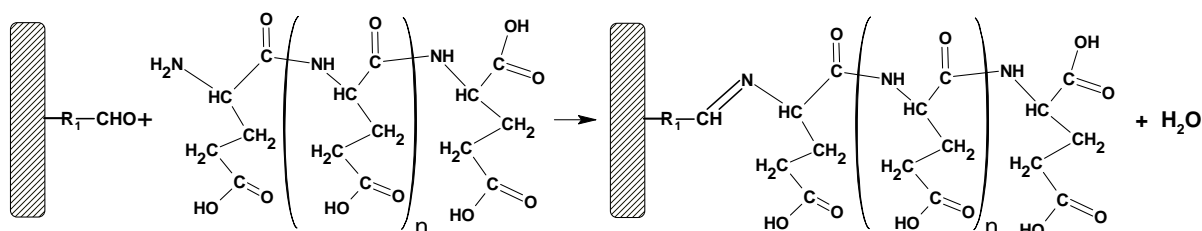
Esquema 1 - Formação do filme PAG sobre a superfície do ECV.

O eletrodo modificado foi então colocado para secar a temperatura ambiente até total evaporação do solvente. Após a etapa de evaporação do solvente, o mesmo foi imerso em uma solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 6,0 e submetido a 15 ciclos sucessivos entre -0,8 a +2,0 V (*vs.* ECS) com *v* de 100 mV s^{-1} .

3.3.1.3. ADIÇÃO DE PAG E GLUTARALDEÍDO (PAG:GLU)

Buscando uma melhor aderência dos filmes de PAG sobre a superfície eletródica utilizou-se o glutaraldeído, composto o qual tem sido muito utilizado para imobilização de materiais biológicos como relatado por Walt e Agayn (1994). Sua natureza bifuncional possibilita a formação das bases de Schiff devido à reação do grupo aldeído do GLU com o grupo amino livre presente nas moléculas biológicas (PEREIRA, et al., 2004).

Os filmes de PAG:GLU foram obtidos diretamente na superfície pela transferência de glutaraldeído (GLU - 0,05% v/v) e posterior adição de PAG (1% m/v). Essas soluções foram adicionadas na superfície do eletrodo com auxílio de uma micropipeta para garantir uniformidade superficial, em seguida o EQM foi seco a temperatura ambiente até total evaporação do solvente. Após a secagem, o EQM foi imerso em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 6,0 e submetido a 15 ciclos sucessivos entre -0,8 a +2,0 V com v de 100 mV s⁻¹. O produto esperado segue o Esquema 2 (PEREIRA, et al., 2004) mostrado abaixo:



Esquema 2 – Formação do filme PAG:GLU sobre a superfície do ECV.

Levando em consideração que a reação entre o GLU e o PAG possa ocorrer entre o grupo aldeído livre do glutaraldeído e o grupo amino do poliaminoácido, a razão entre as quantidades de GLU e PAG podem interferir na quantidade de grupos carboxílicos do PAG disponíveis para interação com o analito. Portanto investigaram-se diferentes razões entre o GLU e o PAG na formação dos filmes. As concentrações de glutaraldeído e PAG foram mantidas constantes, variando-se apenas o volume adicionado de cada solução sobre a superfície eletrodica. As seguintes composições foram investigadas: 50%:50%; 62,5:37,5%; 75%:25%; 87,5%:12,5% de PAG:GLU (v/v). A comparação na composição dos filmes foi realizada entre os valores de correntes obtidas dos voltamogramas cíclicos em solução 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de amoxicilina em tampão acetato pH 5,2.

Os diferentes filmes obtidos do poliaminoácido sobre a superfície eletrodica foram facilmente removidos, primeiramente com papel absorvente seguido do polimento em alumina (0,3 μm, BUEHLER) dispersa sobre tecido de veludo e, posteriormente, lavado com etanol e água.

A influência das condições de preparo no desempenho dos eletrodos com filmes de PAG foi investigada pelas técnicas voltamétricas e por medidas de impedância utilizando-se ácido ascórbico como solução padrão, bem como a caracterização topográfica dos diferentes filmes pela técnica de AFM.

3.4. PROCEDIMENTO

3.4.1. TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

A caracterização dos EQMs por filmes de PAG com os analitos mencionados foi investigado testando-se o substrato antes e após modificação por meio de técnicas voltamétricas. Dentre elas utilizaram-se as técnicas de voltametria cíclica, onda quadrada e pulso diferencial. As informações foram obtidas pela medida da intensidade de corrente em função do potencial aplicado em relação ao eletrólito de suporte usado como branco.

As medidas foram realizadas pela imersão do eletrodo convencional ou modificado na célula eletroquímica contendo o analito de interesse e subsequente análise. Foi realizado o estudo dos diferentes parâmetros para as três técnicas voltamétricas adotadas no estudo.

3.4.2. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFÊICO EM VINHO TINTO SOBRE ECV MODIFICADO POR FILME PAG

As análises de ácido cafêico foram realizadas em triplicata utilizando-se amostras de vinho tinto da marca Sinuelo[®] comercializado no Brasil. Para comparação, todas as amostras analisadas foram preparadas momentos antes de serem analisadas. Uma alíquota de 10 mL de vinho tinto foi tratada com 5 mL de uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), um agente complexante de metal, usado para estabilizar o ácido cafêico na solução (NARDINI, et al., 2002). Esta solução foi então transferida diretamente para uma célula voltamétrica. O eletrodo modificado pelo filme de PAG foi imerso nesta solução sob agitação durante 10 minutos. Em seguida, os voltamogramas cíclicos foram registrados. Os valores das correntes de pico foram obtidos e a composição do ácido cafêico determinada após o método da adição de padrão (HARRIS, 2001) de alíquotas de uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido cafêico adicionada na amostra original. Esta solução foi submetida ao tempo de deposição durante 10 minutos e os voltamogramas registrados após cada adição. Os resultados foram repetidos usando voltametria de onda quadrada, sob frequência de 30 Hz e amplitude de potencial de 50 mV.

3.4.3. DETERMINAÇÃO DE RUTINA EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA SOBRE ECV MODIFICADO POR FILME PAG

O comportamento voltamétrico da rutina foi investigado utilizando a voltametria cíclica e a voltametria de onda quadrada, otimizando-se assim as melhores condições experimentais para a aplicação do EQM com filme PAG na determinação de rutina em formulação farmacêutica.

Cada comprimido da formulação farmacêutica contém em sua composição: 20,0 mg de rutina, 100,0 mg de extrato seco de *Smilax japicanga*, 100,0 mg de extrato seco de *Polygonum punctatum*, 100,0 mg de extrato seco de *Aesculus hippocastanum* e também estearato de magnésio, goma arábica e lactose q.s.p. Cinco comprimidos de Novarrutina[®] foram pesados e macerados até obter um pó fino (média de 0,5041 g dos 5 comprimidos). Uma quantidade deste pó foi transferido para um balão de 10 mL para o preparo de uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de rutina em etanol e levada ao banho de ultrassom por 15 minutos, em seguida a solução foi colocada em uma micro centrífuga por 3 minutos em 6.000 rpm. O sobrenadante foi removido e utilizado nas medidas tanto voltamétricas quanto espectrofotométricas.

Alíquota da solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de rutina foi adicionada a célula eletroquímica contendo 20 mL da solução de eletrólito suporte tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 4,0, e em seguida utilizou-se o método das adições do padrão (HARRIS, 2001) de uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de rutina.

3.4.4. DETERMINAÇÃO DE AMX E DXR EM AMOSTRA DE URINA HUMANA SOBRE ECV MODIFICADO POR FILME PAG:GLU

O comportamento voltamétrico dos fármacos, AMX e DXR foi realizado por diferentes técnicas voltamétricas, otimizando-se assim as melhores condições experimentais para a aplicação do EQM na determinação destes fármacos em fluido biológico. O método espectrofotométrico UV-vis foi utilizado como método comparativo ao método proposto neste trabalho.

As amostras de urina foram obtidas de voluntários sadios e usadas nas análises no mesmo dia da coleta. Aliquotas de 3 ml das amostras de urina fortificadas com $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de AMX e DXR foram tratadas com 0,2 mL de metanol para subsequente remoção das proteínas. Estas amostras foram agitadas e colocadas em uma micro centrífuga por 3 minutos em 6.000 rpm. O sobrenadante foi removido e utilizado nas medidas tanto voltamétricas quanto espectrofotométricas.

Quantidades apropriadas de urina fortificada com os respectivos fármacos foram adicionadas a célula eletroquímica contendo 20 mL de eletrólito suporte e a quantificação dos fármacos foram obtidas após subsequentes adições do padrão (HARRIS, 2001) de soluções estoque de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de cada fármaco.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa do trabalho são apresentados os resultados obtidos pelas medidas voltamétricas, AFM e EIS utilizadas para compreender a relação entre as características morfológicas e as propriedades eletroquímicas da superfície do ECV modificado com filmes de poli ácido glutâmico pelos três diferentes métodos de preparação adotados neste trabalho. A performance dos eletrodos foi testada usando a oxidação eletroquímica do ácido ascórbico como sistema modelo.

Também serão mostrados os resultados obtidos pela metodologia desenvolvida para a determinação dos compostos fenólicos e farmacêuticos em diferentes matrizes utilizando os eletrodos modificados com os filmes de PAG.

4.1. CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA DOS ECV MODIFICADO POR FILMES DE PAG

Buscando as melhores condições no preparo e aplicação dos eletrodos modificados por filmes de PAG, investigou-se os três diferentes métodos no preparo dos EQM.

Voltamogramas cíclicos representativos do comportamento voltamétrico da formação dos filmes de PAG na superfície de ECV obtido pela eletropolimerização de ácido glutâmico em solução 0,02 mol L⁻¹ tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 são mostrados na Figura 10.

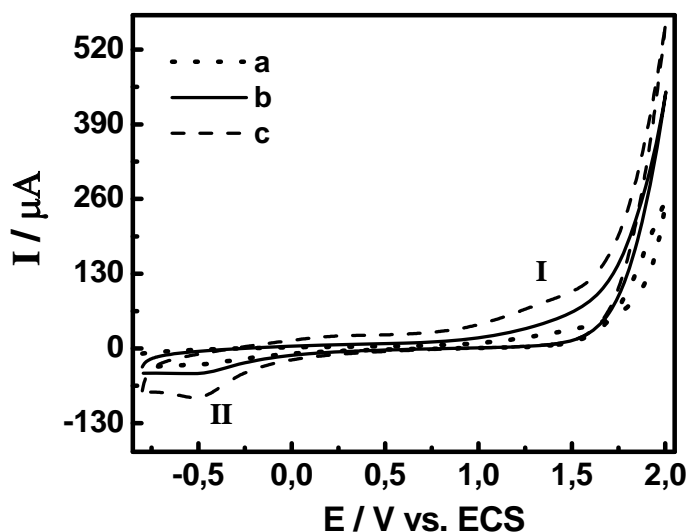
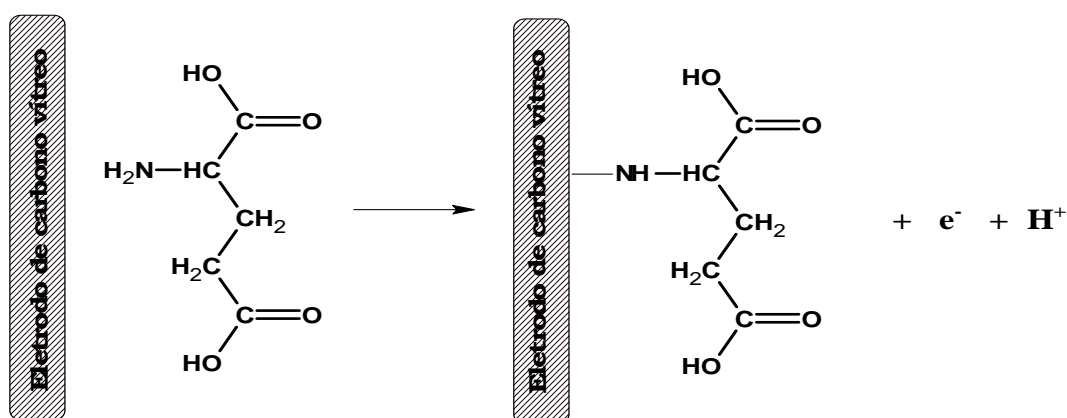


Figura 10 – Voltamogramas cíclicos do filme MONO obtidos pela eletropolimerização do ácido glutâmico em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 sobre ECV. (a) 1^a; (b) 2^a e (c) 10^a varredura. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma apresenta uma onda mal definida de pouca intensidade em +1,3 V (pico I na Figura 10) referente à oxidação da amina primária. O mesmo comportamento é observado por Yu e Chen (1997a) que sugere que no eletrodo modificado pela eletropolimerização do ácido glutâmico (MONO), o processo envolve a oxidação do grupo amino via transferência de 1 elétron. O radical cátion correspondente é gerado e responsável pela interação C-N na superfície do eletrodo, dando-lhe a aderência necessária. Um esquema representativo da formação do filme MONO sobre ECV segundo método proposto por Zhang e Lin (2001a) é mostrado a seguir:



Esquema 3 – Processo de modificação do ECV com filme MONO (ZHANG; LIN, 2001a).

Estudos sob diferentes velocidades de varredura na formação dos filmes de PAG foram investigados no intervalo de 10 a 200 mV s⁻¹, e a melhor condição para preparação dos filmes foi 100 mV s⁻¹ onde um melhor perfil voltamétrico foi obtido.

Eletrodos modificados por filmes utilizando adição direta do polímero poli ácido glutâmico (PAG) e mistura de poli ácido glutâmico + glutaraldeído (PAG:GLU), apresentam o mesmo comportamento voltamétrico quando submetidos à varredura de potencial (15 ciclos) em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH = 6,0.

Deste modo os filmes de PAG obtidos pelas três diferentes metodologias citadas indicam forte aderência à superfície eletródica, onde se observa a formação de uma película visível. Os filmes não apresentam picos correspondentes a sítios eletroativos na região de -0,2 a +1,2 V, possibilitando assim a utilização destes eletrodos modificados com larga janela de potencial, os quais apresentam boa repetibilidade.

Os filmes formados pelos três procedimentos diferenciados na preparação dos filmes de poli ácido glutâmico sobre eletrodo de carbono vítreo foram caracterizados voltametricamente monitorando-se a oxidação do ácido ascórbico. Este composto foi usado como modelo, uma vez que sua oxidação é catalisada pelo poli ácido glutâmico (YU; CHEN, 1997a; ZHANG; LIN, 2001a), visando correlacionar o efeito electrocatalítico do filme com a caracterização topográfica pela técnica de AFM da superfície do ECV antes e após modificação; bem como obter informações sobre a cinética e mecanismo de transferência de elétrons obtidos pela técnica EIS.

Vários métodos tradicionais têm sido reportados para a determinação de AA incluindo métodos espectrométricos, cromatográficos, enzimáticos e eletroanalíticos [BACKHEET, et al., 1991; LEUBOLT; KLEIN, 1993; REIS, et al., 2005]. Comparado a outros métodos, os métodos eletroquímicos apresentam grande vantagem devido à sua alta sensibilidade e simplicidade. Inúmeros trabalhos são relatados na literatura para o uso de EQM na oxidação catalítica do AA [QIAN, et al., 2005; ROY, et al., 2006; WANG; DU, 2004] com fins para análise ambiental e clínica. A superfície dos eletrodos modificados têm sido testada como um meio de reduzir o sobrepotencial e superar a cinética lenta de muitos processos eletródicos sobre eletrodos convencionais

Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 sobre o ECV antes e após o recobrimento da superfície por filmes do poliaminoácido PAG preparados pelos três diferentes métodos, MONO (eletropolimerização do monômero), PAG (depósito direto de poli ácido glutâmico) e PAG:GLU (depósito de poli ácido glutâmico + glutaraldeído) são mostrados na Figura 11, curvas 2, 3 e 4, respectivamente. A oxidação sobre o ECV convencional também pode ser observada pela curva 1 da Figura 11.

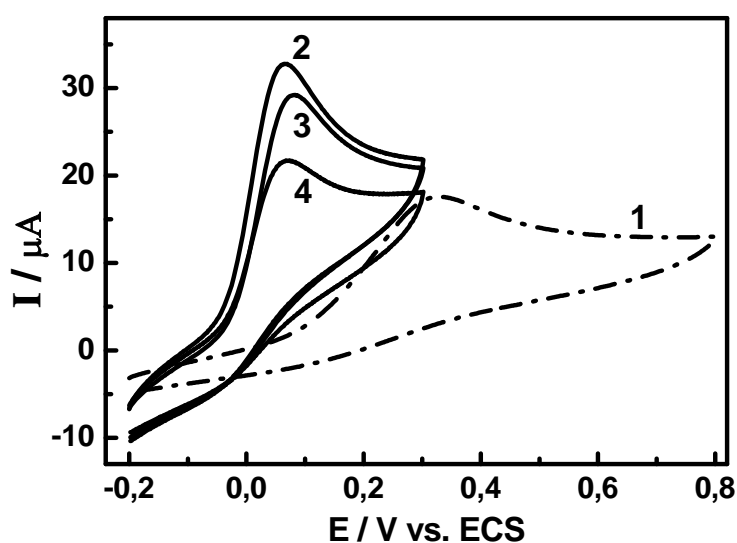
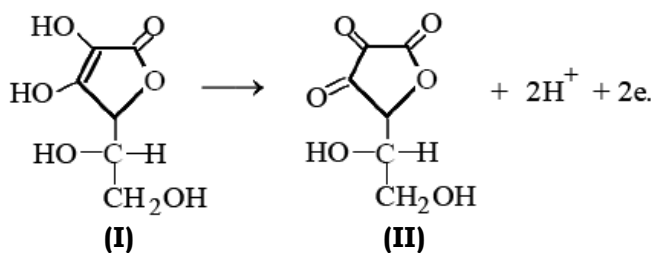


Figura 11 – Voltamogramas cíclicos obtidos da oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 no (1) ECV e após modificação por filmes: (2) PAG (3) PAG:GLU (87,5%:12,5%) e (4) MONO. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Pelos voltamogramas apresentados na Figura 11 um pico anódico bem definido no potencial de $+0,32 \text{ V}$ (curva 1 Figura 11) é observado no ECV convencional, o qual é oxidado irreversivelmente na superfície eletródica gerando o ácido dehidroascórbico, de acordo com o esquema proposto por Matos et al. (2000).



Esquema 4 – Oxidação eletroquímica do ácido ascórbico (I) para o ácido dehidroascórbico (II) (MATOS, et al., 2000).

O processo de oxidação do AA sobre o ECV é usualmente reportado por envolver a perda de dois elétrons e subsequente perda de dois prótons. A determinação deste analito em eletrodos sólidos pode ser dificultada devido à adsorção de produtos gerados após sua oxidação sobre a superfície eletródica (MATOS, et al., 2000).

Entretanto sobre o eletrodo modificado pela adição direta de 16 μ L de uma solução 1% m/v de PAG observa-se um aumento significativo da corrente de pico e o potencial de pico desloca para valores de potencial menos positivo, indicando um decréscimo no sobrepotencial de 260 mV (Figura 11 curva 2). Os resultados são similares àqueles verificados para o eletrodo modificado com poli-histidina (YU, et al., 1996) para a oxidação do AA, no qual o filme conduz a um decréscimo de sobrepotencial de 400 mV e um aumento significativo da corrente de pico.

A oxidação catalítica do AA no eletrodo modificado pela adição da mistura de PAG:GLU e por eletropolimerização do monômero também ocorre no potencial de +0,06 V, entretanto apresentam valores de corrente de pico com menor intensidade quando comparado ao eletrodo com filme de PAG, como mostra a curvas 3 e 4 da Figura 11, sugerindo que a reação prévia do PAG com o glutaraldeído diminui os sítios ativos do poliaminoácido ou a espessura do filme pode estar interferindo no processo. ZHANG e LIN (2001a) observaram resultados semelhantes com eletrodo modificado com PAG obtido pela eletropolimerização do monômero na determinação de ácido ascórbico e úrico. A análise dos voltamogramas confirma também a mudança na reversibilidade do processo global sobre os eletrodos modificados. Os valores de αn_a obtidos de $E_p - E_{p1/2} = 47,7 \text{ mV} / \alpha n_a$ dos voltamogramas cíclicos muda de 0,43 no eletrodo convencional para valores de 0,87 (PAG:GLU) e 1,08 (PAG e MONO).

O comportamento do AA no ECV antes e após modificação com filmes MONO, PAG e PAG:GLU é confirmado também pela técnica voltamétrica de pulso diferencial conforme mostra a Figura 12.

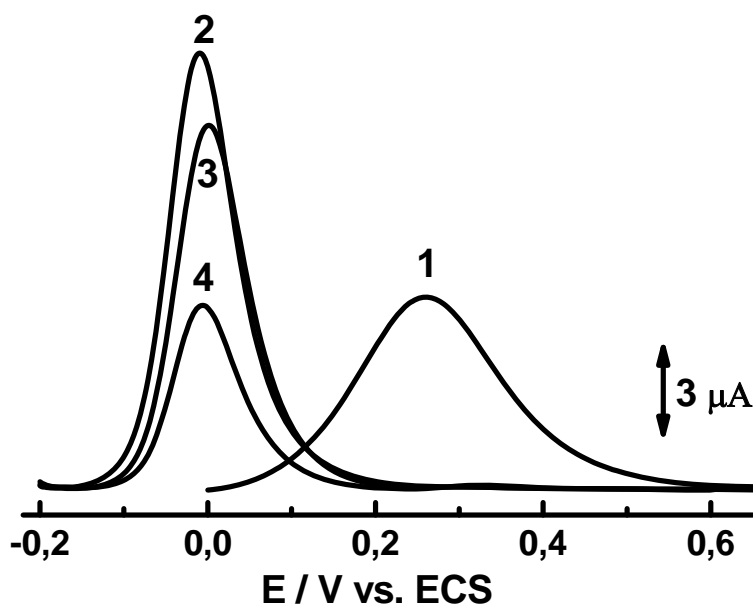


Figura 12 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos da oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 no (1) ECV e após modificação por filmes (2) PAG; (3) PAG:GLU (87,5%:12,5%) e (4) MONO. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $t_p = 400 \text{ ms}$.

A comparação dos voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 no eletrodo convencional exibe um pico de oxidação em $+0,26 \text{ V vs. ECS}$, mas é deslocado para aproximadamente 0 mV vs. ECS quando oxidado no eletrodo modificado por filmes de PAG.

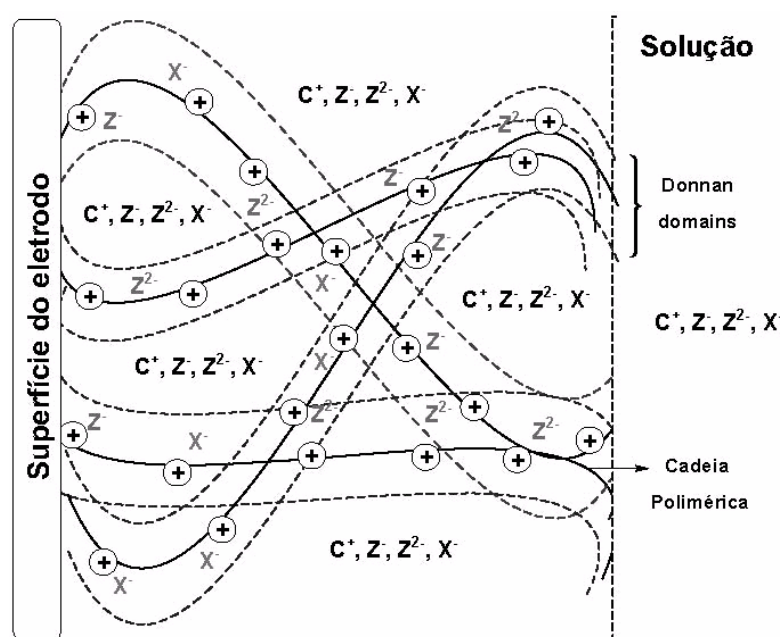
Os filmes promovem a eletrocatalise do ácido ascórbico interferindo também na largura e na intensidade da corrente de pico dos voltamogramas de pulso diferencial. Os valores de $W_{1/2}$ (largura do pico a meia altura) obtidos dos voltamogramas decrescem de 196 mV no eletrodo convencional para 93 mV para o filme de PAG:GLU; 99 mV para o eletrodo usando a modificação MONO e 91 mV para o filme de PAG. Este comportamento é indicativo que no eletrodo modificado pelo procedimento de adição direta de PAG o valor de $W_{1/2}$ é mais próximo daquele previsto para um processo reversível envolvendo dois elétrons para a oxidação do ácido ascórbico.

Embora a oxidação do AA na superfície do ECV modificado por filmes de PAG promova um decréscimo no potencial de pico e na reversibilidade do processo eletrodico, a corrente é diminuída no filme de PAG:GLU. Por outro lado, a corrente de pico é quase o dobro no eletrodo modificado pela adição direta de PAG. No entanto a corrente é superior em relação à obtida no filme formado por eletropolimerização (MONO). Estes resultados sugerem que o procedimento adotado

no recobrimento da superfície eletródica interfere na estrutura do filme, embora não altere a posição do pico pode interferir acentuadamente na intensidade de pico registrado para ambos os voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial.

A retenção do AA nos filmes MONO, PAG e PAG:GLU foi testada pela imersão dos eletrodos modificados em solução contendo $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AA em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0, submetido a varreduras sucessivas e em circuito aberto variando o tempo de imersão. Para ambos os métodos, o eletrodo foi lavado com água desionizada e imerso na solução do eletrólito suporte. Não se observa sinal de que o ácido ascórbico tenha sido retido nos filmes de PAG, indicando que o analito é removido da superfície rapidamente quando o eletrodo é transferido para o eletrólito suporte. Não se observou também aumento na corrente de pico após sucessivas varreduras e o efeito de pré-concentração não foi observado durante o controle do tempo de imersão do eletrodo na solução de ácido ascórbico. Porém o filme é estável na superfície do eletrodo, já que o sinal voltamétrico obtido para a oxidação do AA pode ser restituído se o eletrodo modificado é transferido novamente para a solução de AA.

De acordo com o modelo mecanístico desenvolvido para filmes protonados de poli-L-lisina, o transporte de carga através da camada de polieletrólito sobre a superfície eletródica pode ser favorecida como proposto por Anson, Saveant e Shigehara (1983) e mostrado no Esquema 5.



Esquema 5 – Modelo mecanístico para filmes de polieletrólitos na superfície eletródica em uma solução contendo eletrólito C^+X^- não eletroativo e um par eletroativo Z^-/Z^{2-} [ANSON; SAVEANT; SHIGEHARA, 1983].

De acordo Anson, Saveant e Shigehara (1983) filmes de polieletrólitos protonados sobre eletrodo de carbono vítreo caracterizam-se por cadeias dilatadas quando imersos em eletrólito de suporte aquoso, criando espaços vazios dentro do filme inchado em meio aquoso como ilustrado no modelo proposto por esses autores e apresentado no Esquema 5. Como consequência a incorporação do analito e propagação de carga no filme de polieletrólito caracterizam-se por duas fases. A primeira fase consiste na região onde os contra íons (eletrólito e analito) são retidos na vizinhança dos sítios carregados do polieletrólito protonado, formando uma região denominada de membrana de “Donnan”. A segunda fase compreende o volume restante do filme, onde se assume que a solução do eletrólito, contendo ambos contra íons eletroinativos e eletroativos, seja aprisionada na rede polimérica formada pelas cadeias do poliaminoácido. O acoplamento entre os dois mecanismos de propagação por meio de troca de elétrons é particularmente favorecido pela rápida difusão dos contra íons permitindo que os mesmos preencham os poros na estrutura dilatada do filme. Conseqüentemente, filmes de PLL mostraram-se efetivos tanto no melhoramento da cinética de transferência de carga de diversos analitos como na facilidade de pré-concentração via interação eletrostática ou complexação.

Assim, o comportamento observado para o poli ácido glutâmico pode ser explicado considerando que a formação do filme interfere no equilíbrio da solução do eletrólito suporte contendo ambos contra íons eletroativos e eletroinativos no interior de um filme de PAG inchado pelo eletrólito. A transferência de carga pode ser facilitada devido à propagação de carga dentro da camada do polieletrólito através da difusão do reagente nos domínios do filme.

A mudança no potencial e a reversibilidade observada para a oxidação do AA no filme podem então ser atribuídas à relativa acessibilidade do reagente dentro dos domínios do filme. De acordo com Anson, Saveant e Shigehara (1983) filmes de polieletrólitos são formados por redes de poliaminoácidos com estruturas abertas entre cadeias, ampliando a possibilidade de reação difusional dentro dos domínios internos do filme.

Informações sobre o mecanismo redox do AA sobre o filme de PAG, o qual mostrou maior potencialidade analítica foram obtidas analisando-se o efeito do pH nos voltamogramas de pulso diferencial. Os respectivos voltamogramas obtidos pela imersão do eletrodo com filme de PAG em solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA em valores de pH de 1,0 a 8,0 são mostrados na Figura 13.

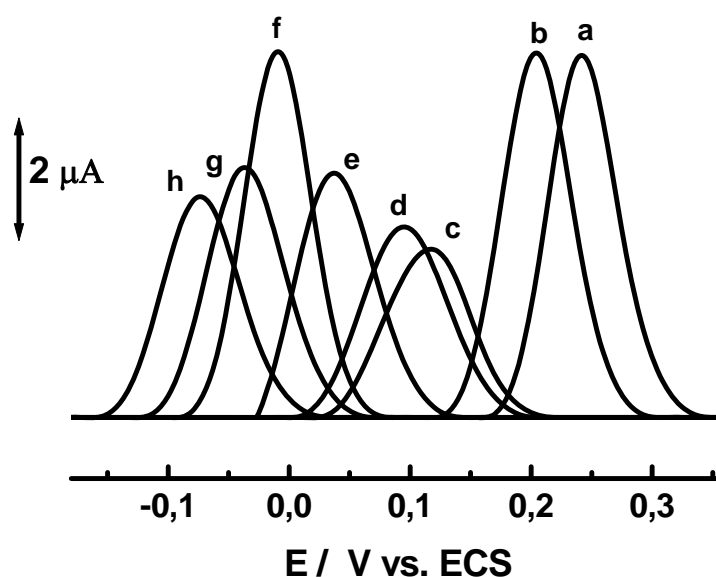


Figura 13 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA sobre ECV modificado com filme PAG em diferentes tampões com valores de pH 1,2 (a); 2,0 (b); 3,4 (c); 4,3 (d); 5,4 (e); 6,0 (f); 6,9 (g); 8,0 (h). $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $t_p = 400 \text{ ms}$.

De acordo com a Figura 13, o pico de oxidação correspondente a oxidação do AA desloca-se para potenciais mais negativos com o aumento do pH e a corrente de pico apresenta um comportamento típico, dependendo fortemente do equilíbrio de protonação do meio. A relação de E_{pa} vs. pH e I_{pa} vs. pH é ilustrada na Figura 14A.

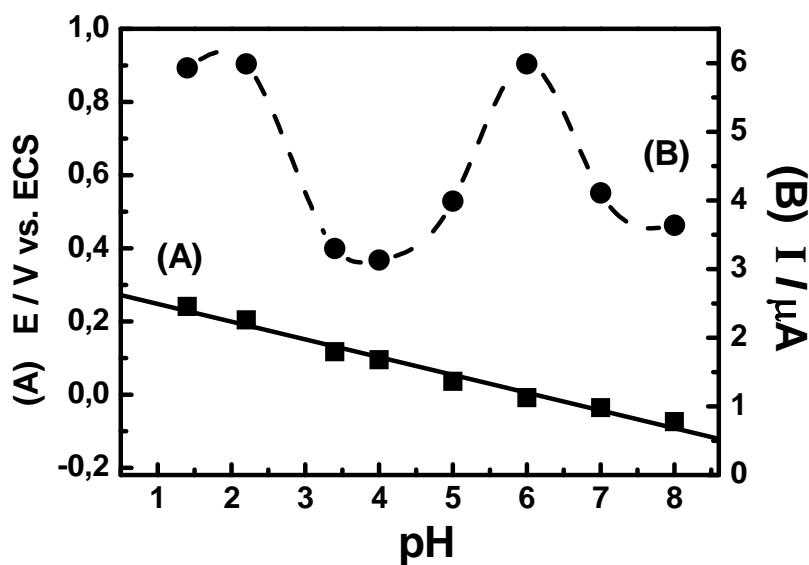


Figura 14 – Dependência do pH no potencial (A) e na corrente de pico (B) do ECV modificado com filme PAG na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0.

A relação linear no intervalo de pH mostra um deslocamento de 59 mV por unidade de pH, mostrando que o mecanismo de oxidação do AA envolve reações de pré-protonação (BARD; FAULKNER, 1980), onde $\Delta E_p/\Delta pH = 59 \text{ mV}/ne^-$. De acordo com a literatura (MATOS, et al., 2000) o número de elétrons para a oxidação do AA é 2, logo 2 prótons devem estar envolvidos na reação. Estes resultados indicam que a oxidação do AA no filme envolve 2 elétrons e 2 prótons, tal como verificado no ECV convencional. Corrente de pico máxima (Figura 14B) é obtida em condições muito ácidas de $pH \leq 2,0$ e em $pH = 6,0$. Em $pH \leq 2,0$ a alta intensidade de corrente pode ser atribuída provavelmente a interação eletrostática com o polieletrólito que está na forma protonada ($pK_a(\text{PAG}) = 4,07$). No entanto, o aumento da corrente obtida em $pH 6,0$ também sugere que outros processos estão ocorrendo durante a transferência de elétron que não pode ser atribuído a simples interação eletrostática, desde que ambos analito e superfície modificada não estejam na forma protonada.

Embora a corrente de pico seja menor, o mesmo comportamento foi obtido nos filmes formados por eletropolimerização do monômero e PAG:GLU. Provavelmente este comportamento evidencia que o mecanismo difusional é otimizado no filme PAG, contribuindo no transporte do analito para a superfície do eletrodo ou há melhora na velocidade de transferência eletrônica. Com isso o valor de $pH 6,0$ foi escolhido para observar o comportamento do AA devido sua alta intensidade de pico.

A influência da velocidade de varredura em cada filme preparado por PAG, MONO e PAG:GLU foi investigada monitorando-se a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA e os valores comparados com o eletrodo convencional. A Figura 15 ilustra o gráfico dos valores da corrente de pico anódica (I_{pa}) vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

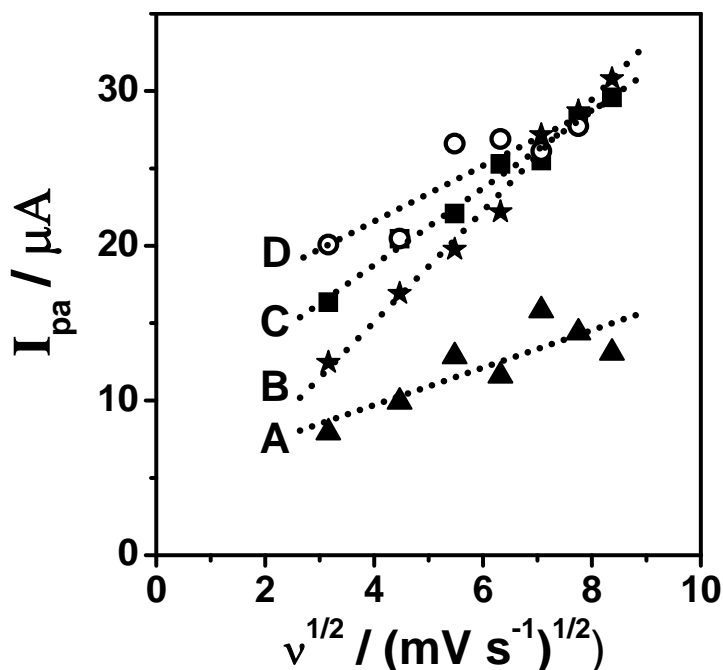


Figura 15 – Gráfico da I_{pa} vs. $v^{1/2}$ do ECV (A) antes e após modificação por filmes (B) MONO, (C) PAG e (D) PAG:GLU (87,5%:12,5 %).

No eletrodo convencional a corrente de pico aumenta proporcionalmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que o AA é oxidado no ECV convencional, cujo processo é controlado por difusão (MATOS, et al., 2000). Do mesmo modo, a velocidade de varredura no intervalo de 10 a 100 $mV s^{-1}$ apresenta uma relação linear entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura para o eletrodo modificado por MONO e adição direta de PAG, como mostra a Figura 15 (curva B e C). Este comportamento indica que provavelmente o processo eletródico é controlado por difusão através do filme de polieletrólito. Isto pode ser explicado considerando que o filme apresenta suficiente porosidade para permitir que o AA atinja à superfície do ECV por difusão. Esta relação também é verificada para o eletrodo modificado pela mistura de PAG:GLU. No entanto, a corrente não cruza a origem, e este efeito é mais acentuado para o filme PAG:GLU. Provavelmente, a membrana formada pelo PAG:GLU é um filme mais espesso e a corrente originada é aquela correspondente à oxidação do reagente dentro dos domínios limitados do filme.

De acordo com Anson, Saveant e Shigehara (1983) com o aumento na espessura do filme, maior é o tempo necessário para que o reagente atravesse o filme e promova a troca iônica com o contra-íon. Como consequência, a velocidade de difusão é o fator que controla a permeação do reagente através do filme.

O efeito dos filmes de PAG na oxidação do AA em diferentes concentrações foi investigado usando voltametria cíclica e pulso diferencial no eletrodo convencional e nos modificados por PAG, MONO e PAG:GLU. Os voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV convencional antes e após a modificação pelos filmes do poliaminoácido obtidos para a variação na concentração de AA são mostradas na Figura 16.

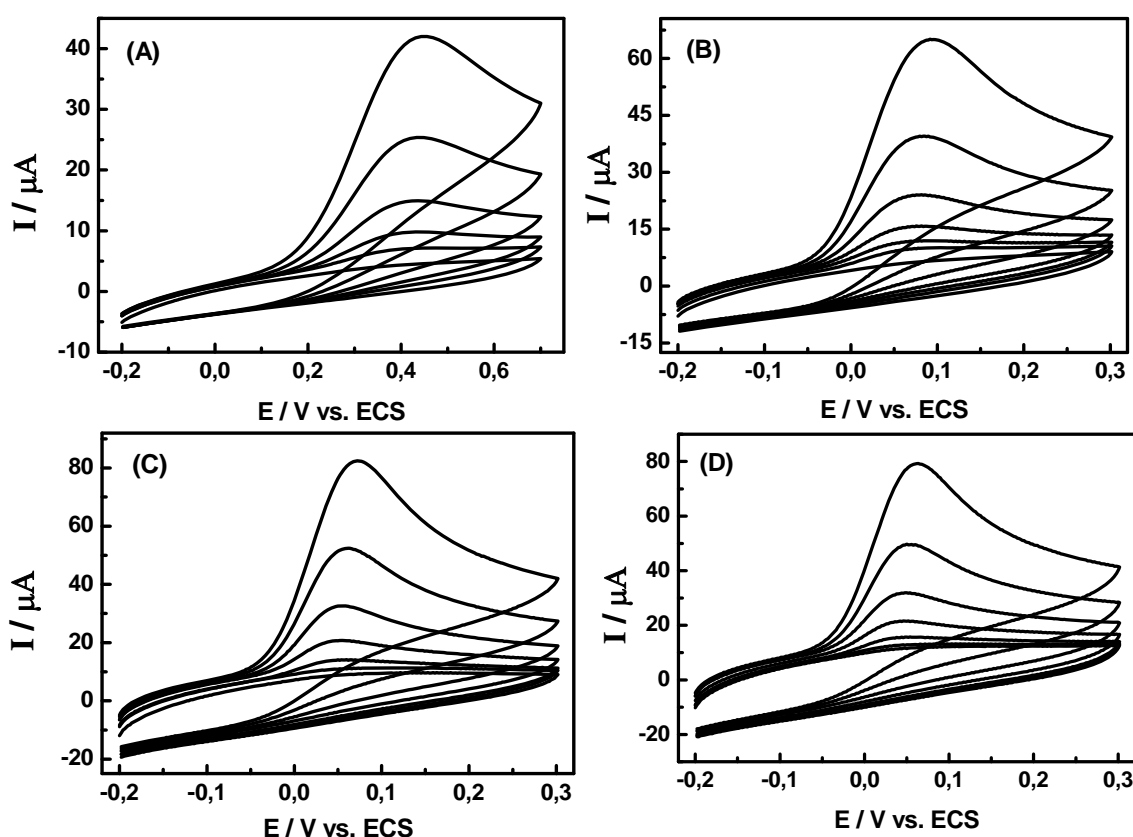


Figura 16 – Voltamogramas cíclicos obtidos para oxidação do AA sobre ECV (A) e após modificação por filmes (B) MONO, (C) PAG e (D) PAG:GLU (87,5%:12,5%) em concentrações de 3,0; 7,0; 15,0; 31,0; 63,0; 127,0 e 255,0($\times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$). $v = 50$ mV s $^{-1}$

Os eletrodos modificados foram imersos em solução de AA em tampão fosfato 0,1 mol L $^{-1}$ pH 6,0. Adições sucessivas da solução estoque 1,0 $\times 10^{-2}$ mol L $^{-1}$ de AA para sua determinação em intervalo de concentração entre 1,0 $\times 10^{-5}$ a 2,5 $\times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ foram utilizadas para a construção da curva analítica, conforme mostra a Figura 17.

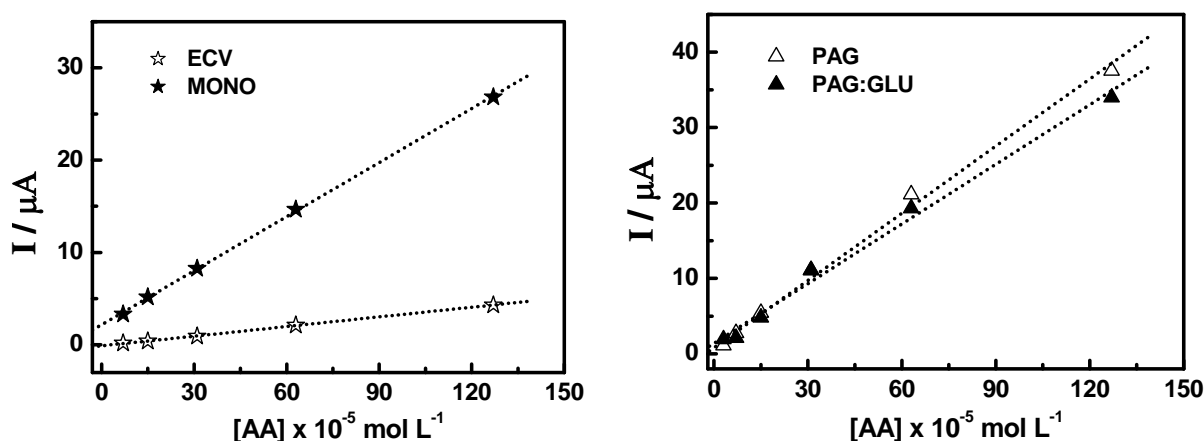


Figura 17 – Gráficos de calibração obtidos por VC para a determinação de AA no ECV antes e após modificação por filmes de PAG. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Os dados obtidos por voltametria cíclica para a obtenção da curva analítica no ECV antes e após modificação com filmes de PAG são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores obtidos da curva analítica por VC para a oxidação do AA sobre ECV antes e após modificação por filmes de PAG.

	Equação da reta (C = 10⁻⁵ mol L⁻¹)	Região linear / 10⁻⁵ mol L⁻¹	Coefficiente de correlação	Limite de deteccção (mol L⁻¹)
ECV	$I_{pa}(\mu\text{A}) = -0,11 + 0,04 C$	7,0 – 127	0,99	$2,39 \times 10^{-5}$
MONO	$I_{pa}(\mu\text{A}) = 2,17 + 0,20 C$	7,0 – 127	0,99	$1,99 \times 10^{-5}$
PAG	$I_{pa}(\mu\text{A}) = 0,36 + 0,33 C$	3,0 – 127	0,99	$1,78 \times 10^{-5}$
PAG:GLU	$I_{pa}(\mu\text{A}) = 1,40 + 0,26 C$	7,0 – 127	0,99	$8,09 \times 10^{-5}$

Nos eletrodos modificados um aumento da corrente em baixas concentrações de AA foi observado quando comparada com o eletrodo convencional.

A dependência dos eletrodos modificados (MONO, PAG, PAG:GLU) na concentração do AA também foi investigada por voltametria de pulso diferencial em intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 18.

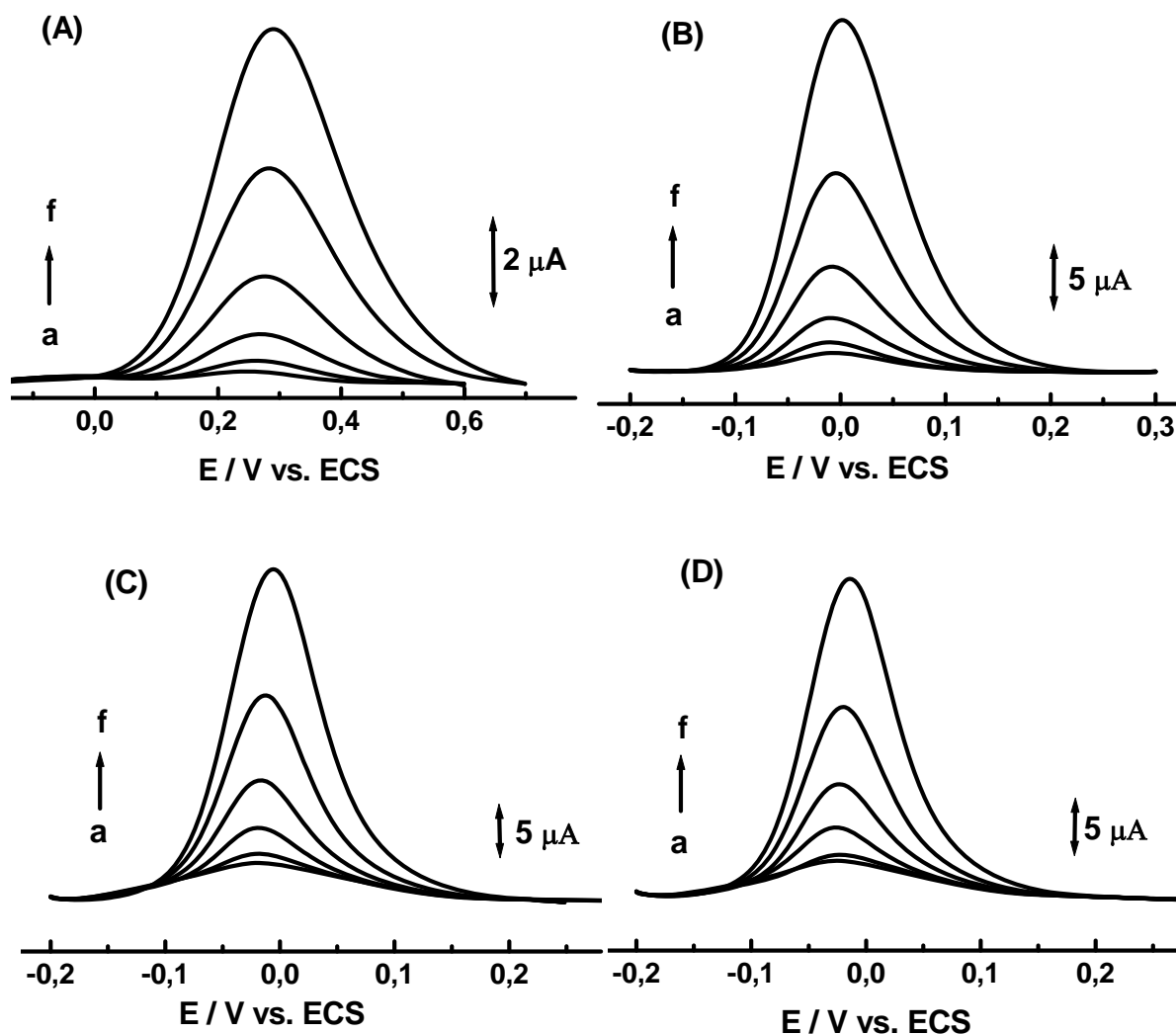


Figura 18 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a oxidação do AA sobre ECV antes (A) e após modificação por filmes (B) MONO, (C) PAG (1% m/v) e PAG:GLU (87,5%:12,5%) (D) em concentrações de: (a)= 7,0; (b)= 15,0; (c)= 31,0; (d)= 63,0; (e)= 127,0 e (f)= 255,0 ($\times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 mol L $^{-1}$ pH 6,0.

Os eletrodos foram imersos em uma célula contendo tampão fosfato 0,1 mol L $^{-1}$ pH 6,0, seguida de adições da solução estoque 1,0 $\times 10^{-2}$ mol L $^{-1}$ de AA. Gráficos de calibração linear foram obtidos no intervalo de concentração entre 1,0 $\times 10^{-5}$ a 2,5 $\times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$, como podemos observar na Figura 19.

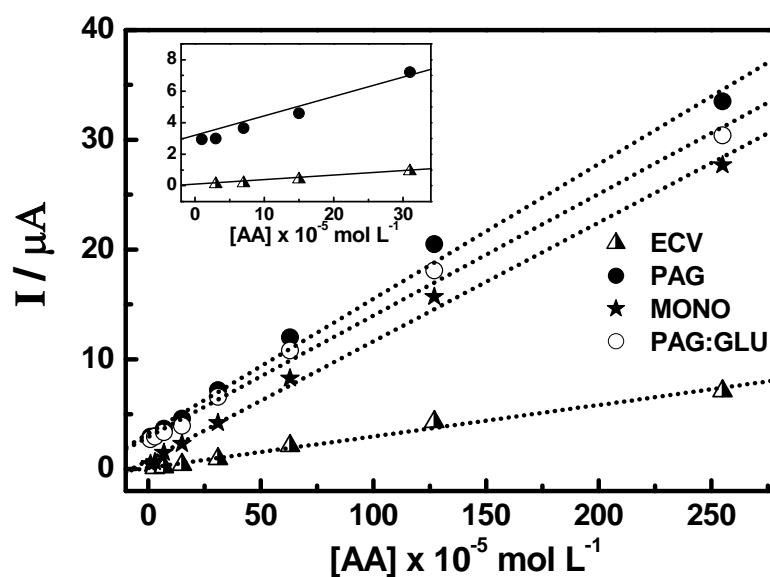


Figura 19 - Gráficos de calibração obtidos por DPV para a determinação de AA no ECV antes e após modificação por filmes de PAG.

Os parâmetros obtidos do gráfico de calibração dos diferentes eletrodos obtidos por DPV são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores obtidos da curva analítica por DPV para a oxidação do AA sobre ECV antes e após modificação por filmes de PAG.

	Equação da reta ($C = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)	Região linear / $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	Coefficiente de correlação	Limite de deteccção (mol L^{-1})
ECV	$I_{pa}(\mu A) = -0,11 + 0,035 C$	7,0 – 127	0,99	$2,38 \times 10^{-5}$
MONO	$I_{pa}(\mu A) = 0,51 + 0,12 C$	3,0 – 127	0,99	$2,31 \times 10^{-5}$
PAG	$I_{pa}(\mu A) = 2,51 + 0,15 C$	3,0 – 63	0,99	$1,50 \times 10^{-5}$
PAG:GLU	$I_{pa}(\mu A) = 2,50 + 0,12 C$	7,0 – 127	0,99	$6,48 \times 10^{-5}$

Para os filmes finos como o obtido pelo procedimento de eletropolimerização do monômero, a concentração de AA dentro dos domínios é zero e a relação passa pela origem do gráfico como aquela verificada para o eletrodo convencional, a qual o perfil da concentração corresponde à difusão do analito. Assim para filmes mais espessos como o PAG e PAG:GLU a corrente de pico é maior, mas há uma divergência dos pontos da origem refletindo o equilíbrio entre o fluxo de elétrons atravessando a camada de PAG e o fluxo de AA que estão alcançando a interface do PAG e o eletrólito.

Além das medidas voltamétricas, a relação função-estrutura dos ECVs modificados com poli ácido glutâmico usando os três procedimentos foi investigada por medidas de AFM e EIS.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PAG POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica é uma técnica muito sensível e especializada na investigação microscópica de superfícies. Através dessa técnica é possível obter informações com alta resolução de imagens topográficas de células intactas, assim como, medidas de eventos moleculares sob condições fisiológicas [LEHENKARI, et al., 2000]. Nos dias de hoje a técnica de AFM é largamente utilizada em pesquisa e desenvolvimento de biomateriais [CHENG; TEOH, 2004]. Para caracterizar a formação dos filmes de PAG e obter informações em sua arquitetura, medidas de microscopia de força atômica foram escolhidas no modo tap. O modo MAC AFM é uma técnica que permite a visualização das moléculas que são depositadas na superfície do eletrodo por interações suaves.

A obtenção das imagens sobre a topografia de amostras através da técnica de AFM envolve um cantilever longo com tamanho entre 100 - 200 μm que possui uma ponta (*tip*) que mantém contato com a amostra numa área de alguns nanômetros quadrados. Esse *tip* varre a superfície da amostra para frente e para trás capturando informações sobre a topografia. A Figura 20 mostra o princípio da obtenção de imagens por AFM.

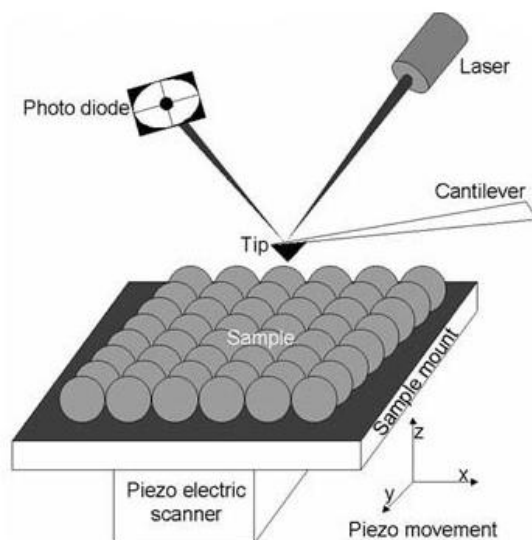


Figura 20 - Princípio da obtenção de imagens pela técnica de microscopia de força atômica (AFM) [Research Equipment and Services, 2006].

O *tip* é constituído por um material piezelétrico o qual altera a posição do cantilever, dependendo da topografia da amostra, mantendo constante sua curvatura. Um feixe de laser é refletido sobre o cantilever para o fotodetector, o qual detecta a dobra do cantilever. Esse sinal captado pelo fotodetector é o que resulta na formação da imagem topográfica da amostra.

As imagens de AFM foram investigadas no intuito de observar a formação e as características morfológicas dos filmes obtidos no ECV seguindo os três procedimentos, MONO, PAG e PAG:GLU, descritos na parte experimental.

As imagens de AFM obtidas no ECV (Figura 21A) e após modificação (Figura 21B-D) pelos diferentes métodos de formação dos filmes do poliaminoácido são mostradas na Figura 21.

O ECV modificado pela eletropolimerização do monômero ácido glutâmico permite a formação de um filme fino de PAG na superfície eletródica. De fato as imagens de AFM demonstram que o filme MONO apresenta uma topografia granular fina, Figura 21B, com irregularidades características do ECV convencional ainda visíveis.

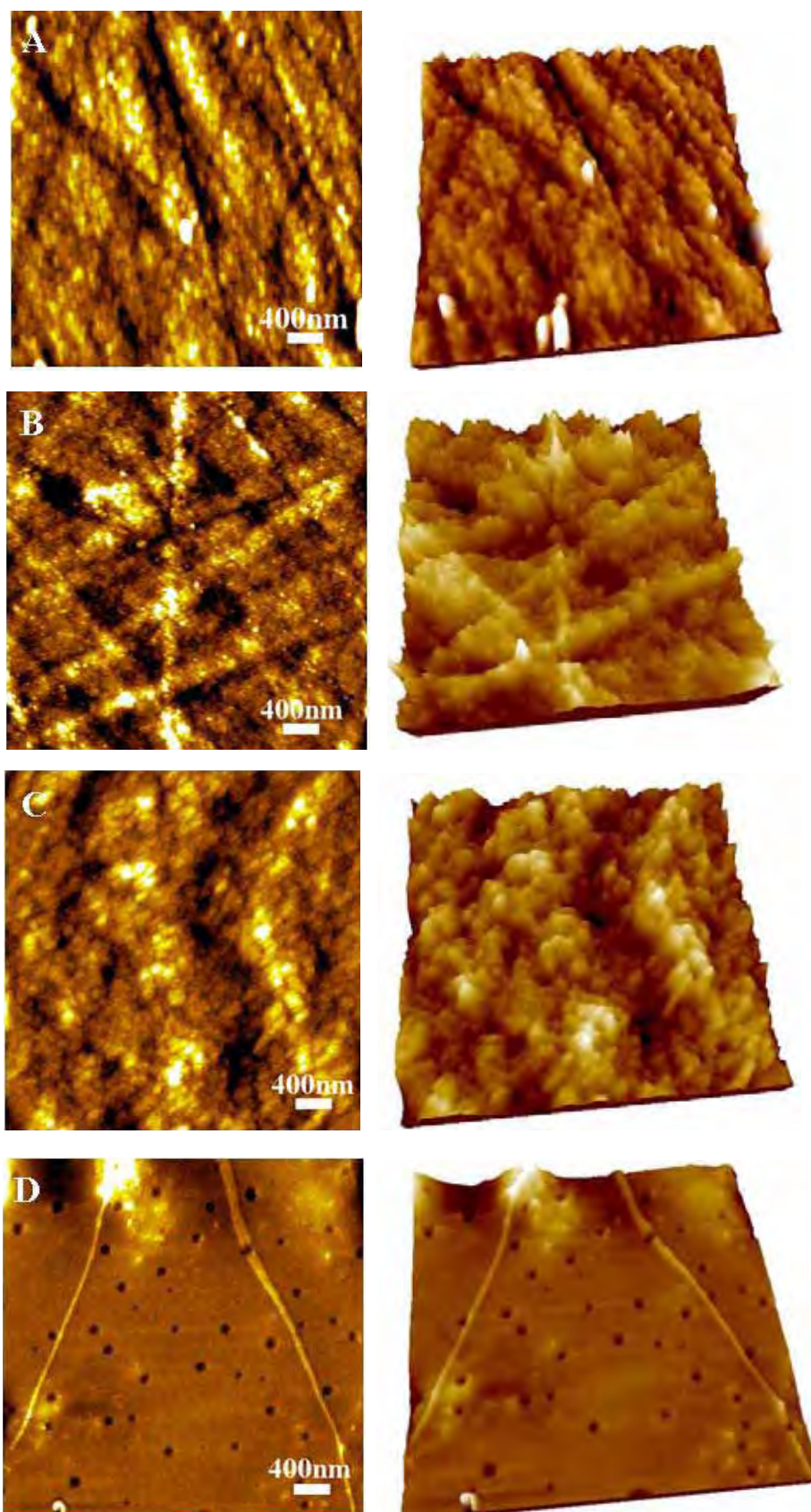


Figura 21 - Imagens topográficas de AFM da superfície do ECV antes (A) e após modificação por filmes (B) MONO, (C) PAG e (D) PAG:GLU (87,5%:12,5%).

Provavelmente os filmes gerados pela eletropolimerização do monômero (YU; CHEN, 1997a,1997b/ZHANG; LIN, 2001a) são formados pela oxidação eletroquímica do grupo amina e seu radical cátion correspondente como discutido previamente. Deste modo, as moléculas do aminoácido são imobilizadas na superfície do eletrodo individualmente devido à ligação carbono-nitrogênio, como mostra o Esquema 3. Para comprovar que a eletrooxidação do ácido glutâmico pode levar a sua imobilização sobre a superfície eletródica, Zhang e Lin (2001a) realizaram medidas de espectroscopia de fotoelétrons induzida por raio-X (XPS) na superfície do ECV monitorando a mudança no conteúdo de nitrogênio em função da voltagem. Os resultados mostraram que a oxidação da amina funcionalizada pode imobilizar o ácido glutâmico na superfície do ECV.

Ao contrário do que foi observada para o ECV com o filme MONO, a formação de filmes espessos e visíveis foram obtidos pela evaporação de solução de PAG e mistura de PAG:GLU sobre ECV, Figura 21C-D.

O filme de PAG:GLU sobre ECV apresenta uma morfologia muito uniforme e lisa, com poros largos bem definidos, de 80 a 180 nm de largura e de 70 a 150 nm de profundidade, Figura 21D. Embora este filme tenha apresentado uma melhor aderência sobre ECV, a presença de largos poros na superfície pode causar menor retenção do analito.

O ECV com filme de PAG apresenta-se espesso e enovelado, Figura 21C, com morfologia uniforme e com poros muito pequenos que poderiam permitir o encapsulamento das moléculas do analito no filme. Este efeito é bem visualizado em eletrodo de grafite pirolítico altamente orientado, no qual a imagem de AFM sem modificação é demonstrada na Figura 22.

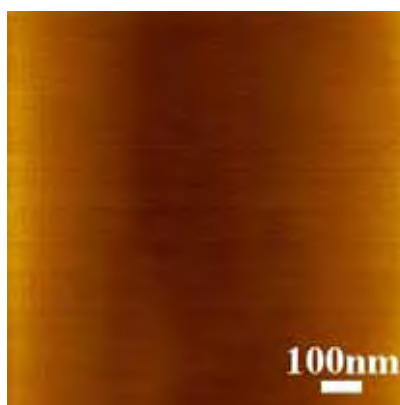


Figura 22 – Imagem topográfica de AFM da superfície do HOPG.

O eletrodo de HOPG é extremamente liso, inerte no ar e tem a facilidade na limpeza de seu plano basal, permitindo uma melhor avaliação das características morfológicas sobre sua superfície eletródica. Comparativamente, para uma superfície com área de $1000 \times 1000 \text{ nm}^2$, o ECV tem uma média de rugosidade por raiz quadrada de $2,10 \text{ nm}$, enquanto a superfície do HOPG tem uma rugosidade menor que $0,06 \text{ nm}$ (BRETT; CHIORCEA, 2003). Diante disto a morfologia do filme de PAG sobre o HOPG foi analisada, conforme imagens mostradas na Figura 23.

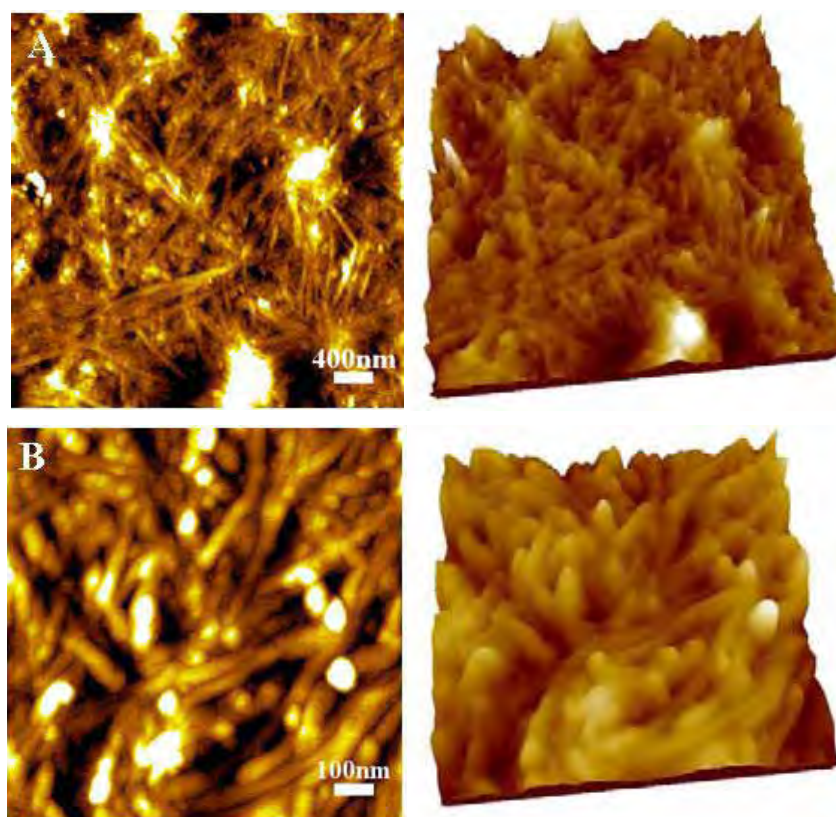


Figura 23 - Imagens topográficas de AFM do HOPG modificado com filme PAG.

A alta resolução das imagens de AFM obtidas para o filme PAG gerado pelo depósito da solução seguido da evaporação a temperatura ambiente na superfície do HOPG, Figura 23A, mostra claramente um filme espesso, formado por uma cadeia polimérica nanoestruturadas, Figura 23B. Esta cadeia nanoestruturada de PAG densamente empacotada causa maior efeito na incorporação do analito e contra-íons dentro do filme quando imerso em solução, uma característica muito útil para aplicações práticas do ECV modificado com o filme PAG.

A relação dos diferentes procedimentos adotados na construção dos ECVs com filmes do poliaminoácido na aplicabilidade dos mesmos foi investigada também por EIS, buscando correlacionar com as medidas voltamétricas e de AFM.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PAG POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

A técnica de impedância tem sido muito utilizada na caracterização de EQM, pois consiste em uma importante ferramenta para analisar mudanças nas propriedades interfaciais de eletrodos modificados, fornecendo informações detalhadas na mudança da resistência e capacitância da superfície dos eletrodos modificados [CAMPUZANO, et al., 2006; CHEN, et al., 2005; HOU, et al., 2006]. Informações sobre a cinética e mecanismo de transferência de elétrons também podem ser obtidos pela EIS. Conseqüentemente o estudo das interações moleculares utilizando esta técnica tem sido muito bem explorada na construção de sensores eletroquímicos [GUAN; MIAO; ZHANG, 2004; KATZ; WILLNER, 2003; YANG; RUAN; LI, 2003].

Gougnon, 2006 estudou o comportamento eletroquímico do eletrodo de carbono impresso alterando sua superfície com diferentes razões entre cloreto de polivinila/acetato de celulose. Em seus resultados observou-se que a pequena quantidade de cloreto de polivinila prejudica o comportamento eletroquímico do eletrodo e a presença do acetato de celulose fornece um aumento da condutividade possibilitando excelente afinidade entre o suporte e a solução proporcionando baixa resistência durante a transferência de carga. Com base nas características dessa técnica é de grande importância a correlação dos resultados obtidos com as análises de AFM e estudo voltamétrico com a técnica de EIS, para a compreensão das propriedades eletroquímicas fundamentais do sistema eletrodo/modificador. Dessa forma, a caracterização da superfície dos eletrodos modificados pelos diferentes métodos de imobilização do PAG pode contribuir para o avanço nos estudos de desenvolvimento de sensores baseados em poliaminoácidos.

A EIS é um modo efetivo e simples para medir a resistência de transferência de carga (R_{ct}) de reações eletroquímicas [CHEN, et al., 2005]. As medidas foram realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA sobre o ECV convencional e os modificados (MONO, PAG, PAG:GLU). A Figura 24A mostra o gráfico de Nyquist representativo dos espectros de EIS do ECV convencional e os eletrodos modificados pelos diferentes procedimentos descritos. Pode ser visto que cada um dos três espectros de impedância obtidos nos eletrodos modificados exibe um semicírculo e uma parte linear.

O semicírculo corresponde ao processo de transferência de carga do filme em uma escala de alta frequência, considerando que a parte linear é devido ao processo difusional em baixas frequências. O diâmetro do semicírculo representa a magnitude da R_{ct} na superfície eletródica. As medidas de EIS foram obtidas com um circuito equivalente, como mostra a Figura 24B. Este circuito equivalente consiste da resistência ôhmica (R_s) da solução do eletrólito suporte, a capacitância da dupla camada (C_{dl}), resistência a transferência de carga (R_{ct}) e a impedância de Warburg (Z_w) resultando da difusão dos íons do meio da solução para a interface. Este circuito equivalente foi usado para obter os dados de impedância e extrair os valores de C_{dl} e R_{ct} .

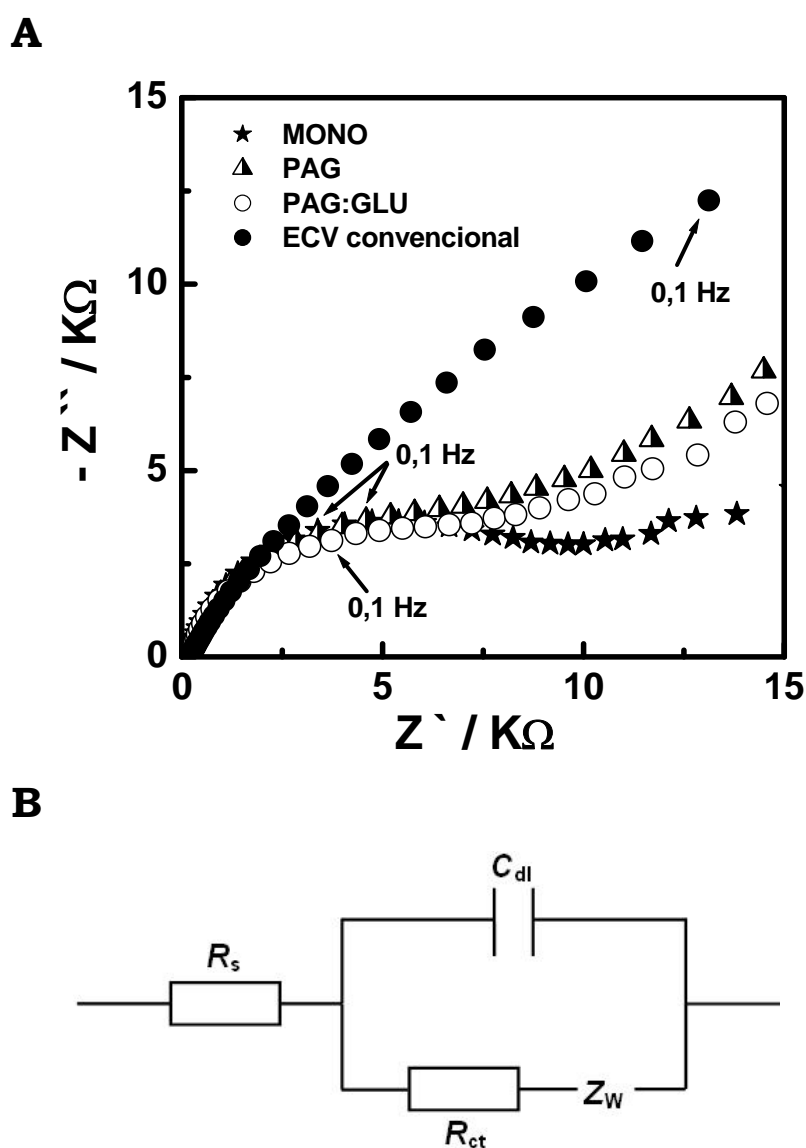


Figura 24 – **(A)** Gráficos de Nyquist dos espectros de impedância do ECV antes e após modificação por filmes MONO, PAG e PAG:GLU, imersos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 6,0 na presença de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de AA. E = 0,02 V. **(B)** Circuito equivalente.

Na Tabela 3 são reportados os valores obtidos para a R_{ct} e a C_{dl} do ECV convencional e ECVs modificado com filmes MONO; PAG e PAG:GLU.

Tabela 3 - Resultados para (R_{ct}) e (C_{dl}) obtidos após ajuste dos espectros de impedância eletroquímica com o circuito equivalente.

Eletrodo	R_{ct} (KΩ)	C_{dl} (μF)
ECV convencional	50,1	0,03
ECV modificado com MONO	13,9	3,8
ECV modificado com PAG	7,9	4,8
ECV modificado com PAG:GLU	7,6	3,6

A R_{ct} para o ECV convencional é 50,1 K Ω , a qual é muito maior que a valores da R_{ct} observada para o ECV modificado com filmes MONO, PAG E PAG:GLU. Este baixo valor da R_{ct} para os eletrodos modificados implica que a transferência de carga é relativamente rápida quando comparada a do eletrodo convencional. Isto também pode ser observado na Tabela 3 que mostra o aumento da C_{dl} quando os filmes são formados sobre a superfície do ECV. Pelos dados obtidos, pode se concluir que o ECV modificado pela deposição de PAG apresenta à menor R_{ct} na interface e concomitante aumento da C_{dl} , refletindo uma melhora da velocidade de transferência de carga.

Deste modo, os resultados obtidos pela AFM e EIS confirmam os dados obtidos na caracterização voltamétrica dos filmes, mostrando que o filme obtido pela deposição de PAG sobre a superfície eletródica exibe filmes com separações relativamente grandes entre as cadeias poliméricas nanoestruturadas, as quais podem dilatar-se quando em solução do eletrólito. Esta rede de cadeias poliméricas foi bem caracterizada topograficamente por AFM (Figura 23), as quais proporcionam um aumento da corrente para a oxidação do AA no ECV com o filme PAG devido ao baixo valor da resistência a transferência de carga, facilitando o transporte da carga por meio da solução no interior dos poros do filme.

De modo geral, os eletrodos de carbono vítreo podem ser modificados por filmes de poli ácido glutâmico pelos três procedimentos propostos, os quais apresentaram efeito eletrocatalítico para o AA. A etapa de formação do filme pode influenciar os grupos ativos disponíveis para interação com a espécie de interesse, influenciando diretamente a resposta analítica.

Os resultados mostram que o recobrimento pela adição de PAG sobre ECV apresentou o melhor desempenho, exibindo filmes finos e uniformes na forma nanoestruturados com baixa resistência à transferência de carga. Estes resultados abrem a possibilidade para a construção e aplicação de sensores eletroquímicos por meio de poliaminoácidos de modo rápido, simples, reprodutível e de baixo custo. Deste modo, investigou-se a possibilidade de uso destes eletrodos de carbono vítreo modificados com filmes de PAG na interação e/ou pré-concentração com os diferentes compostos analisados como relatado a seguir.

4.4. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

4.4.1. RUTINA

4.4.1.1. OXIDAÇÃO DA RUTINA SOBRE ECV

O comportamento voltamétrico de uma solução $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de rutina em solução tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 4,0 sobre ECV convencional foi investigado e os voltamogramas cíclicos são mostrados na Figura 25.

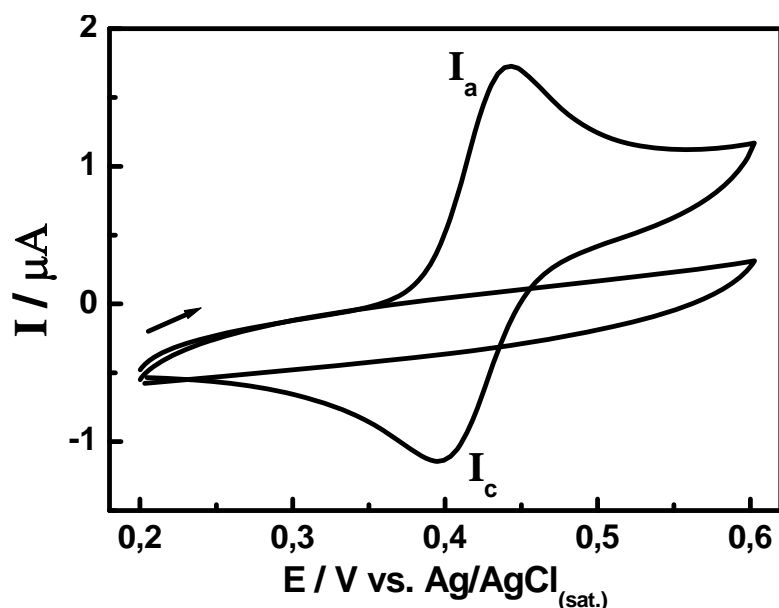


Figura 25 – Voltamogramas cíclicos para oxidação de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina sobre ECV em solução tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

A Figura 25, mostra um par de pico redox com $E_{pa} = +0,43 \text{ V}$ e $E_{pc} = +0,40 \text{ V}$ correspondente a oxidação do substituinte 3',4'- dihidroxila (I_a) no anel B da molécula de rutina (Figura 4) e a redução do produto 3',4'- diquinona formado após a oxidação na varredura reversa (I_c).

Pelos parâmetros obtidos dos voltamogramas cíclicos a razão de i_{pa}/i_{pc} é igual a 1,09 e o valor de $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 30 \text{ mV}$, mostrando que o processo de oxidação da rutina sobre ECV é característico de processo reversível (BARD; FAULKNER, 1980) envolvendo portanto dois elétrons. Estes resultados estão em concordância com o obtido na literatura para a oxidação da rutina sobre ECV (GHICA; BRETT, 2005; KANG, et al., 2002).

4.4.1.2. OXIDAÇÃO DA RUTINA SOBRE ECV MODIFICADO COM FILME PAG

O comportamento da rutina sobre ECV modificado com filme PAG foi investigado em solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0, conforme mostra a Figura 26 (curva 2). O comportamento da rutina sobre ECV também é mostrado na curva 1 da Figura 26 para efeito de comparação.

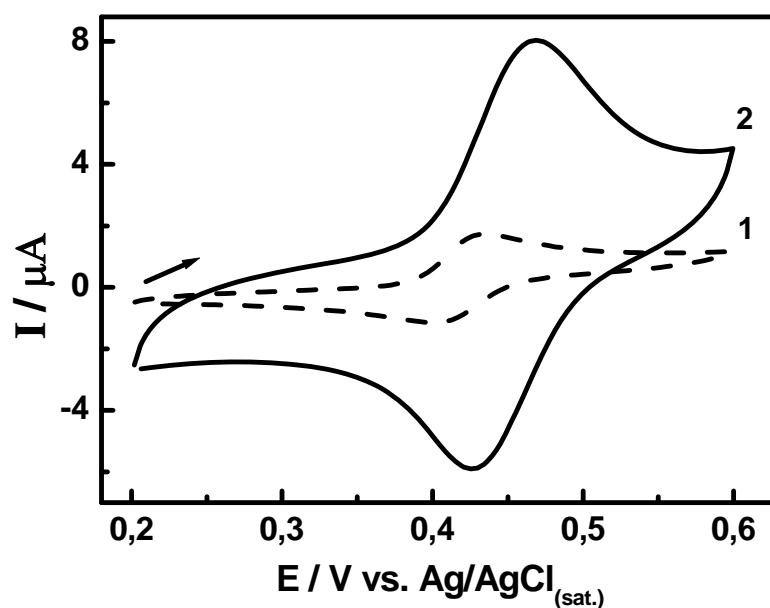


Figura 26 - Voltamogramas cíclicos para oxidação de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em solução tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 sobre ECV (1) antes e (2) após modificação com filme PAG com tempo de imersão de 20 min. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 26 compara o comportamento voltamétrico observado para oxidação da rutina em tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 sobre ECV convencional e modificado com filme PAG. Pelos voltamogramas cíclicos apresentados (curva 1 e 2 da Figura 26) pode-se observar um pequeno deslocamento de 30 mV para valores mais positivos no potencial de pico da rutina sobre o ECV modificado com filme PAG, porém com um aumento significativo no valor da corrente de pico quando comparado ao comportamento sobre o ECV.

O voltamograma cíclico obtido para o ECV com filme de PAG caracteriza-se por um par de pico em +0,46 V e +0,43 V na varredura reversa, com ΔE_p de 30 mV e a razão de I_{pa}/I_{pc} igual a 1, caracterizando um processo reversível (BARD; FAULKNER, 1980; BRETT; BRETT, 1993). O número de elétrons envolvido na oxidação da rutina sobre ECV antes ($\Delta E_p = 30 \text{ mV}$) e após modificação com filme PAG ($\Delta E_p = 30 \text{ mV}$) foi de 1,97, portanto em ambos os casos dois elétrons são envolvidos no processo de oxidação da rutina. Os dados obtidos estão em concordância com a literatura tanto para ECV convencional (GHICA; BRETT, 2005; KANG, et al., 2002) quanto para EQMs (MALAGUTTI, et al., 2006; ZENG, et al., 2006).

4.4.1.2.1. PRÉ-CONCENTRAÇÃO DA RUTINA SOBRE ECV MODIFICADO COM FILME PAG

A pré-concentração de rutina no filme modificado com PAG foi investigada pela imersão do EQM em solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0. Os voltamogramas cíclicos foram registrados em diferentes tempos de imersão do eletrodo modificado na solução de rutina. A Figura 27 mostra os dados obtidos dos voltamogramas registrados para o ECV com filme PAG.

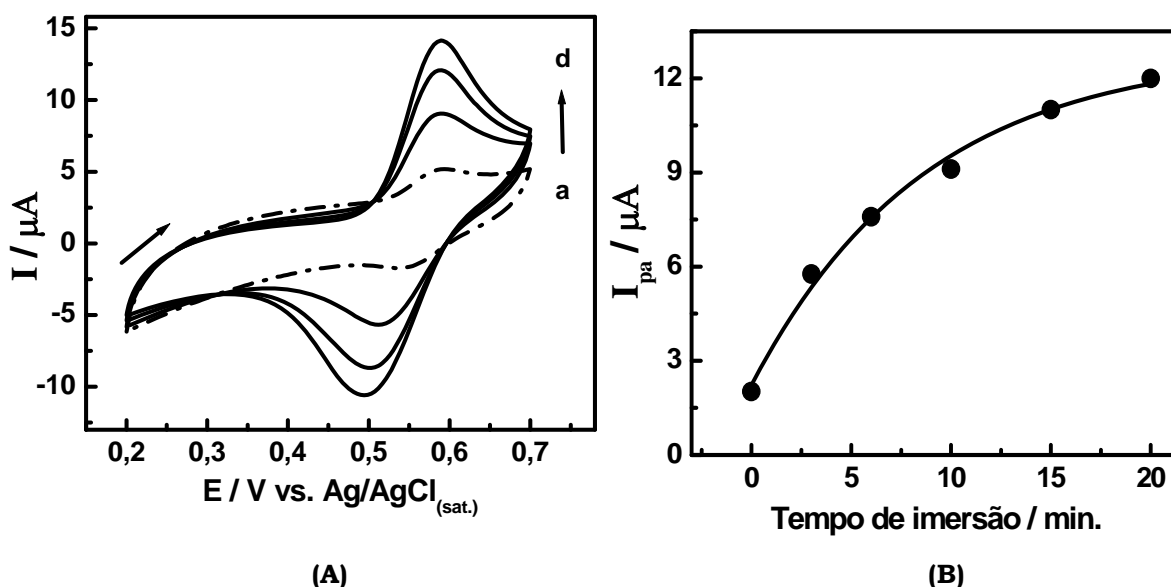


Figura 27 - (A) Efeito do tempo de imersão nos voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV modificado com filme PAG em solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0. (a) = 0, (b) = 3, (c) = 10 e (d) = 20 min. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **(B)** Gráfico de I_{pa} vs. tempo de imersão.

Pelo gráfico da Figura 27 pode-se observar que a rutina é pré-concentrada no filme PAG até o tempo de 20 minutos, onde se observa saturação do analito nos sítios do filme de PAG sobre ECV. Portanto adotou-se o tempo de 20 minutos para o registro dos parâmetros voltamétricos investigados a seguir sobre o ECV modificado com filme de PAG.

Pode-se observar também que o efeito do tempo de pré-concentração da rutina sobre ECV modificado com filme PAG não alterou os valores dos parâmetros $i_{\text{pa}}/i_{\text{pc}}$ e a variação de $E_{\text{pa}} - E_{\text{pc}}$, confirmando a característica de processo reversível na oxidação da rutina sobre o EQM.

O comportamento da rutina sobre ECV modificado com PAG em função do pH foi investigado e os parâmetros são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Efeito do pH para a oxidação de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina sobre ECV modificado com filme PAG em solução tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$.

pH	E_{pa} (mV)	I_{pa} (μA)	E_{pc} (mV)	$-I_{pc}$ (μA)	ΔE_p (mV)	I_{pa}/I_{pc} (μA)
2	589	4,36	550	4,00	31	1,09
3	524	3,53	488	3,90	32	0,90
4	464	5,83	430	5,60	34	1,04
5	410	3,17	373	2,65	35	1,20
6	354	2,28	311	1,92	39	1,19
7	315	1,41	261	1,41	49	1,00

Os potenciais de pico deslocam para valores menos positivos em função do pH para a oxidação da rutina sobre o ECV modificado com filme PAG conforme os dados mostrados na Tabela 4. A intensidade de corrente é máxima em valor de pH 4,0. O gráfico do potencial de pico em função do pH para o ECV antes e após modificação obtido dos voltamogramas é mostrado na Figura 28.

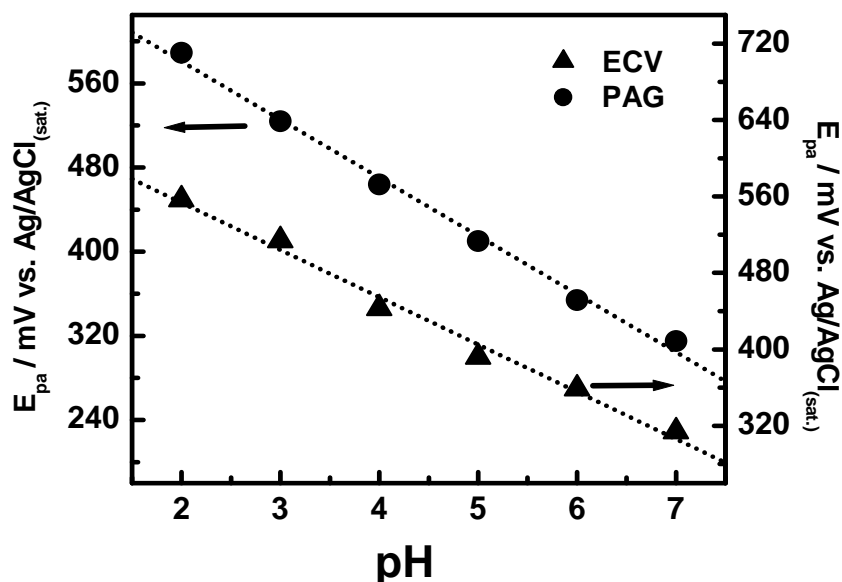


Figura 28 - Efeito da variação de pH sobre o potencial de oxidação de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina sobre o ECV antes e após modificação com filme PAG.

A relação do potencial de pico *vs.* pH para a oxidação da rutina sobre ECV convencional e modificado com filme PAG segue uma relação linear no intervalo de $2,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$, segundo as equações 1 e 2, respectivamente:

$$\text{(ECV): } E_{\text{pa}} \text{ (mV)} = 652 - 49,5 \text{ pH; } R = 0,994 \text{ (n} = 6\text{).} \quad \text{(eq. 1)}$$

$$\text{(PAG): } E_{\text{pa}} \text{ (mV)} = 691 - 55,2 \text{ pH; } R = 0,997 \text{ (n} = 6\text{).} \quad \text{(eq. 2)}$$

De acordo com a literatura (BARD; FAULKNER, 1980), o número de prótons é obtido da relação $\Delta E_p / \Delta \text{pH} = 59 \text{ mV}^+ / \text{ne}^-$, onde pelos valores do coeficiente angular apresentados nas equações 1 e 2 para o ECV antes e após modificação, obtém-se o número de prótons envolvidos no sistema igual a 2 para ambos os eletrodos. Assim os resultados obtidos para o comportamento da rutina sobre o ECV convencional e modificado com filmes de PAG estão concordantes com os trabalhos encontrados na literatura.

O efeito do pH sobre a relação da corrente de pico anódica (I_{pa}) para a rutina sobre o ECV antes e após modificação é mostrada na Figura 29.

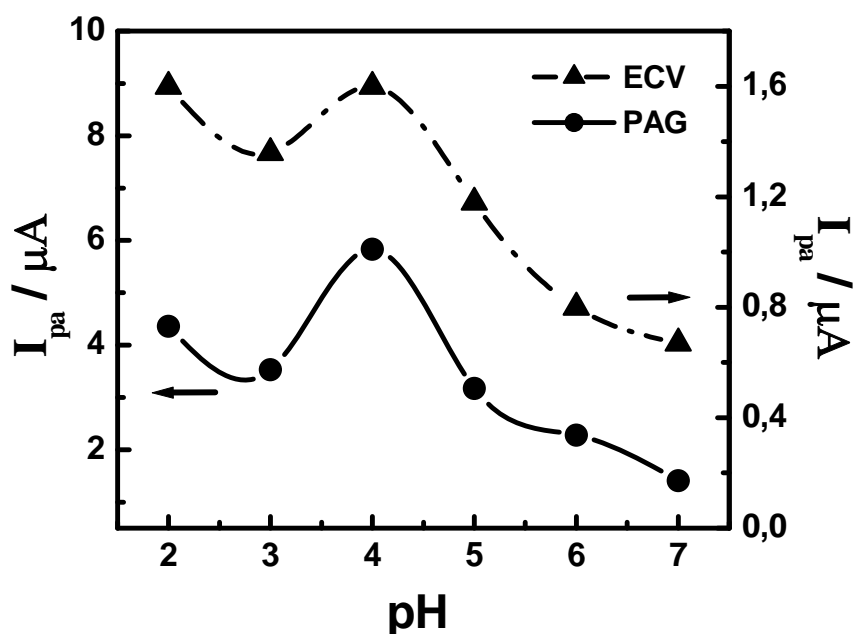


Figura 29 - Efeito da variação de pH na intensidade de corrente de pico correspondente a oxidação de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina sobre ECV antes e após modificação com filmes PAG. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Pode-se observar que a corrente de pico de oxidação da rutina é máxima no valor de pH 4,0 para ambos os eletrodos e diminui com o aumento do pH. Para tal, o valor de pH 4,0 em solução tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ foi o escolhido para o estudo do comportamento da rutina sobre ECV modificado com filme PAG. Destes resultados podemos concluir que o potencial e a corrente de pico apresentam comportamento semelhante sobre o ECV convencional e no modificado com filme de PAG, mas com um significativo aumento da corrente de pico, uma vez que a rutina adsorve sobre a superfície modificada.

O estudo do efeito da velocidade de varredura sobre o sinal voltamétrico para o filme PAG na incorporação de 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de rutina em tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 4,0 foi investigado para valores de v de 10 a 100 mV s⁻¹ (Figura 30A).

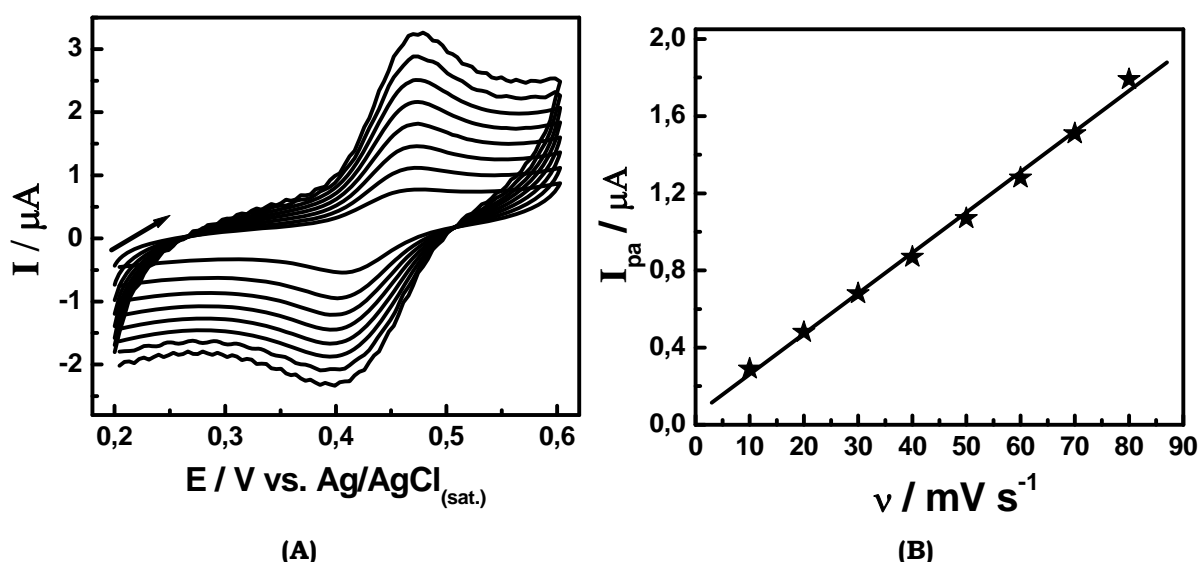


Figura 30 - (A) Voltamogramas cíclicos da v em solução 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 4,0 sobre o eletrodo modificado. (B) Gráfico de I_{pa} vs. v .

A Figura 30A mostra os voltamogramas obtidos após a incorporação de rutina sobre ECV modificado onde podemos observar que as I_{pa} são proporcionais a v (Figura 30B), seguindo a equação: $I_{\text{pa}} (\mu\text{A}) = 0,05 + 0,02 v R = 0,99$, $n = 8$, característico de um processo difusional.

Buscando aumentar a sensibilidade do método, a oxidação da rutina também foi investigada pela técnica de voltametria de onda quadrada, devido às características inerentes da técnica, otimizando assim a melhores condições para a construção da curva analítica sobre ECV modificado com filme PAG. Uma resposta típica da voltametria de onda quadrada para uma solução $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em tampão B-R pH 4,0 é mostrada na Figura 31 com uma frequência (f) de 20 Hz, amplitude de pulso de 50 mV e incremento de potencial (ΔE_s) de 2,0 mV.

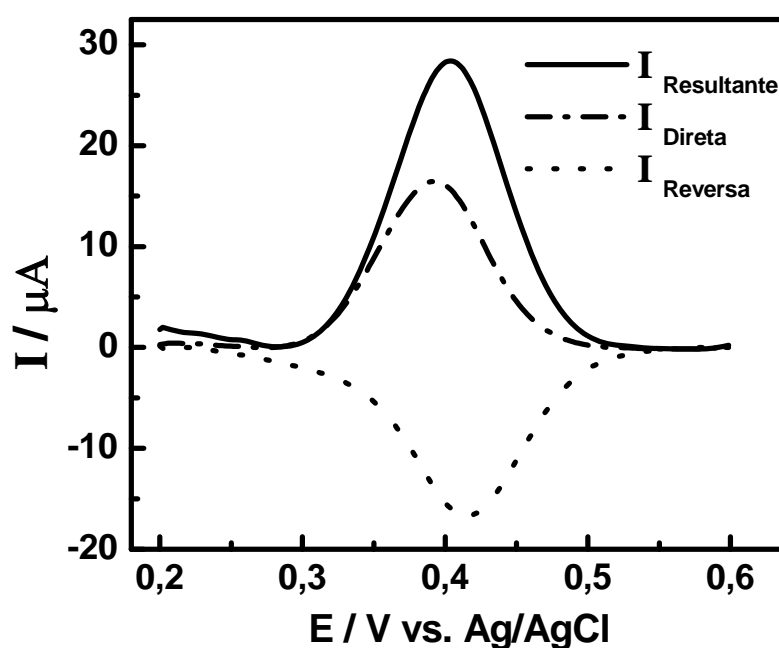


Figura 31 – Voltamograma de onda quadrada de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ sobre ECV modificado com filme PAG após 20 minutos de imersão. $f = 20 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$.

A dependência da corrente de pico para a oxidação da rutina em função da variação da frequência foi avaliada para uma solução $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0, como mostra a Figura 32.

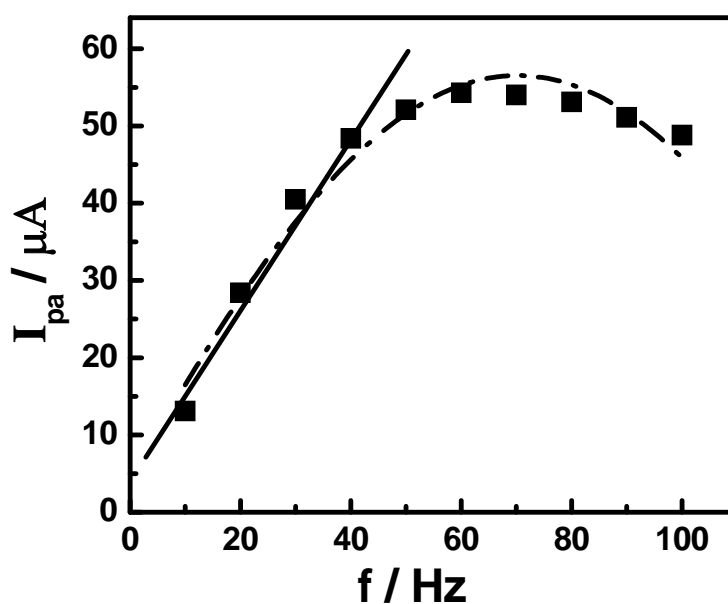


Figura 32 - Influência da variação da frequência sobre o pico de oxidação de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 no ECV modificado com filme PAG após 20 minutos de imersão. $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$.

A análise da Figura 32 mostra um aumento proporcional da corrente em função do aumento da frequência no intervalo de 10 a 60 Hz, com um decréscimo da corrente em valores de frequência superiores a 60 Hz, portanto o valor de 40 Hz foi escolhido para os estudos posteriores, uma vez que acima deste valor observa-se alargamento dos voltamogramas.

A influência da amplitude de pulso na oxidação da rutina sobre ECV modificado com filme PAG foi investigada no intervalo de 10 a 120 mV empregando uma frequência de 40 Hz e incremento de potencial de 2,0 mV a conforme mostra a Figura 33.

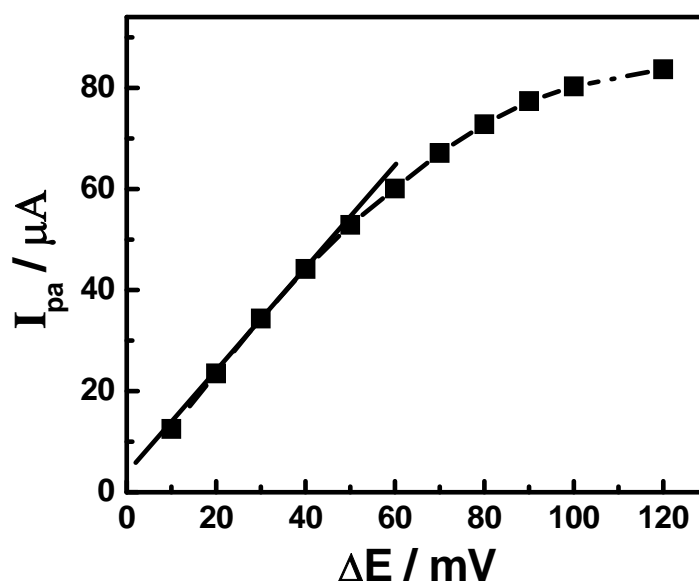


Figura 33 - Influência da ΔE sobre o pico de oxidação de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 no ECV modificado com filme PAG após 20 minutos de imersão. $f = 40 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$.

A corrente de pico anódica aumenta em função do aumento da ΔE apresentando uma região linear de 10 a 50 mV, sendo a amplitude de pulso escolhida de 50 mV, pois acima deste valor observamos um desvio da linearidade, supostamente devido ao alargamento dos voltamogramas.

4.4.1.2.2. CURVA ANALÍTICA PARA RUTINA

Após otimização das melhores condições para determinação de rutina sobre o ECV modificado com filme PAG pela técnica voltamétrica de onda quadrada, usando frequência de 40 Hz e amplitude de pulso de 50 mV, investigamos a dependência do EQM nas diferentes concentrações de rutina (Figura 34).

A curva analítica foi obtida no intervalo entre $7,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0, com os voltamogramas registrados após 20 minutos de imersão entre cada adição para um mesmo filme.

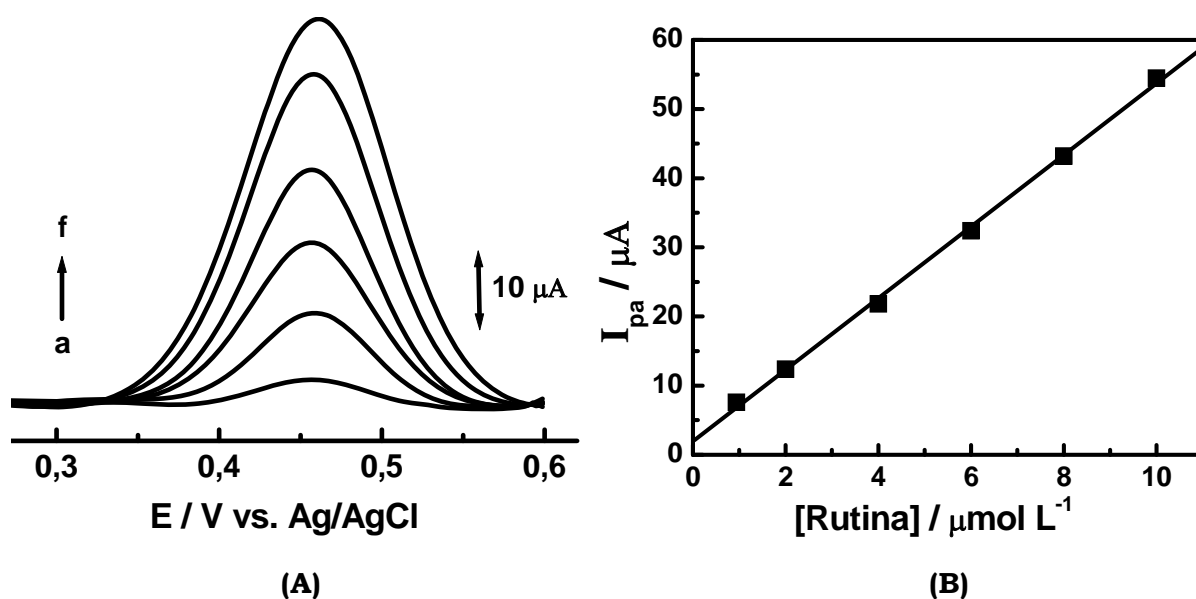


Figura 34 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para determinação de rutina em solução tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 em diferentes concentrações: (a) = 0,94; (b) = 2,0; (c) = 4,0; (d) = 6,0; (e) = 8,0 e (f) = 10,0 ($\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Curva analítica. $f = 40 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$.

A Figura 34A mostra os respectivos voltamogramas obtidos, cuja corrente de pico aumenta concomitantemente em função do aumento da concentração de rutina. Gráficos de calibração linear (Figura 34B) foram obtidos no intervalo de 0,94 a $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, seguindo a equação: $I_{pa} (\mu\text{A}) = 1,19 + 5,17 C$ ($C = \mu\text{mol L}^{-1}$), $R = 0,99$ e $n = 6$. O limite de detecção foi calculado [$3 \times$ (desvio padrão do branco)/sensibilidade] em $3,40 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 34B).

4.4.1.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRA DE NOVARRUTINA®

A aplicação do método desenvolvido na determinação de rutina em amostra de Novarrutina® foi realizada após o tratamento dos comprimidos conforme descrito na parte experimental. Uma alíquota de $60 \mu\text{L}$ da formulação farmacêutica $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dissolvida em etanol foi adicionada a célula eletroquímica contendo apenas tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0, com concentração final de $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. O ECV modificado foi imerso na célula eletroquímica e após 20 minutos de imersão o voltamograma foi registrado conforme mostra a curva 1 da Figura 35. Posteriormente adições do padrão rutina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas a célula eletroquímica segundo o método da adição de padrão (curvas 2, 3 e 4 da Figura 35). Entre cada adição do padrão rutina

o ECV modificado com filme PAG foi submetido a 20 minutos de imersão antes do registro dos voltamogramas.

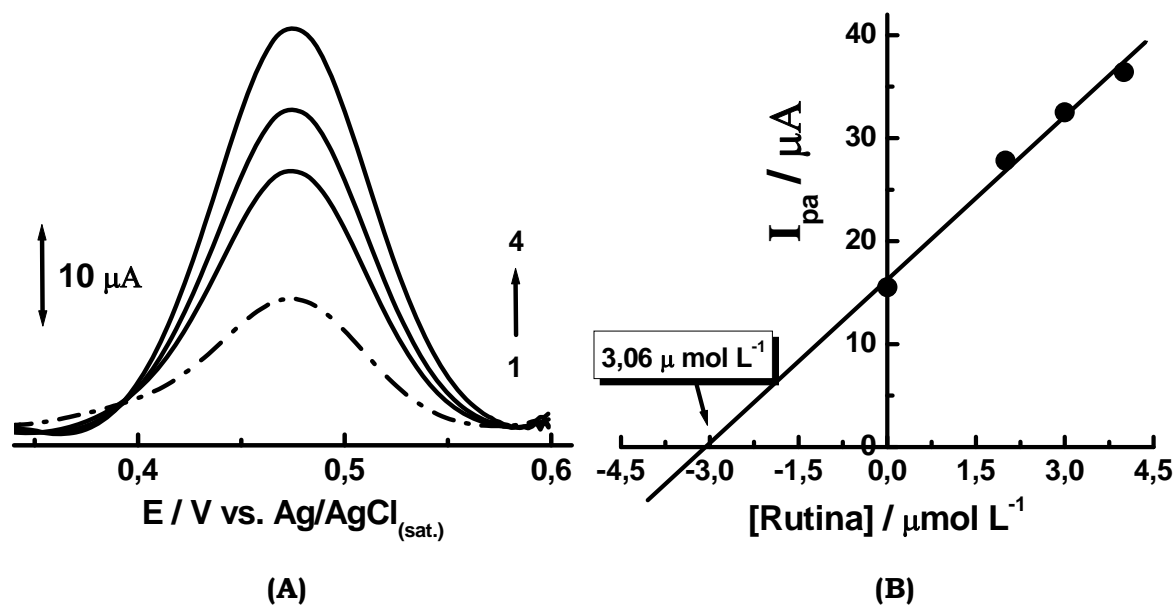


Figura 35 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a rutina em: (1) amostra de Novarrutina[®], adições do padrão: (2) 2,0; (3) 3,0 e (4) 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de rutina em solução tampão B-R 0,04 mol L^{-1} pH 4,0. (B) Curva da adição do padrão rutina. $f = 40$ Hz, $\Delta E = 50$ mV e $\Delta E_s = 2,0$ mV.

Pela Figura 35 podemos observar que as adições do padrão rutina sobre a amostra de Novarrutina[®] aumentam proporcionalmente o valor da corrente de pico. Os resultados obtidos para a determinação de rutina na formulação farmacêutica com o ECV modificado com o filme PAG mostram valores satisfatórios com baixos valores de desvio padrão para três análises, conforme indicados na Tabela 5.

4.1.1.4. COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO POR ESPECTROFOTOMÉTRIA PARA DETERMINAÇÃO DE RUTINA EM AMOSTRA DE NOVARRUTINA®

Para comparar o desempenho da metodologia proposta na determinação de rutina na formulação farmacêutica Novarrutina®, foi testado o método espectrofotométrico na região do UV-vis.

A rutina apresenta os picos de absorção nos comprimentos de onda de 207, 255 e 352 nm conforme mostra os espectros de absorção na Figura 36A. A curva analítica obtida para a rutina ($\lambda = 207$ nm) em diferentes concentrações na solução tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 4,0 é apresentada na Figura 36B.

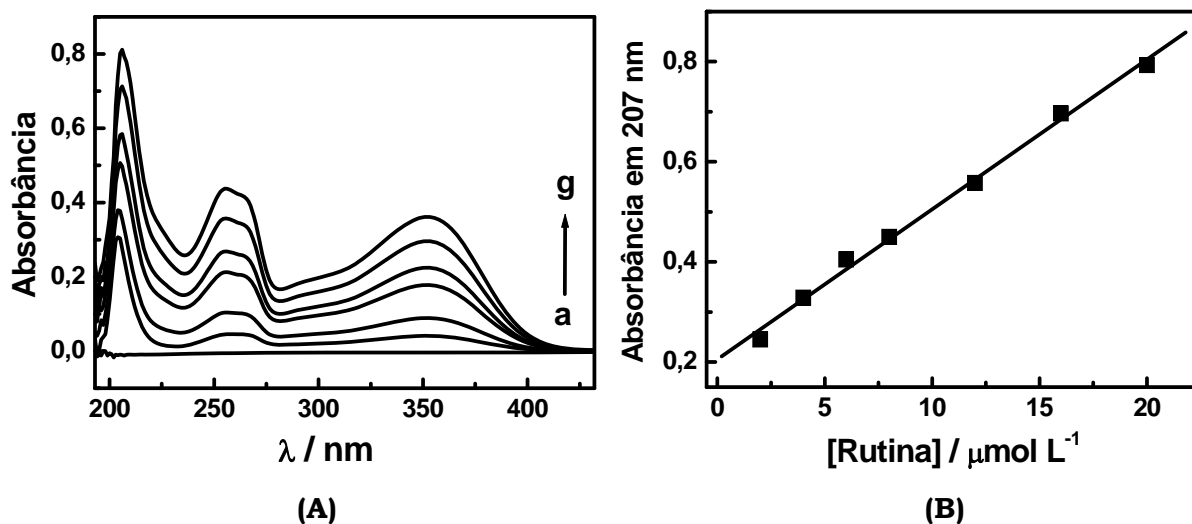


Figura 36 – (A) Espectros de absorção da rutina em solução tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 4,0 em diferentes concentrações: (a) branco; (b) 2,0; (c) 4,0; (d) 8,0; (e) 12; (f) 16 e (g) 20 ($\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Curva analítica.

Pode-se verificar pela Figura 36B que a relação entre a absorbância e a concentração de rutina é linear no intervalo de concentração investigado, no valor do $\lambda = 207$ nm. A linearidade foi obtida no intervalo de 2,0 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com um coeficiente de correlação de 0,99, segundo a equação: $\text{Abs} = \epsilon b C = 0,21 + 0,03 C$, onde: Abs = absorbância (207 nm), ϵ = absorvidade molar, b = caminho óptico em cm e C = concentração de rutina em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O método espectrofotométrico foi realizado em triplicata na determinação de rutina na amostra farmacêutica de Novarrutina® pelo método da adição do padrão, conforme resultados mostrados Figura 37.

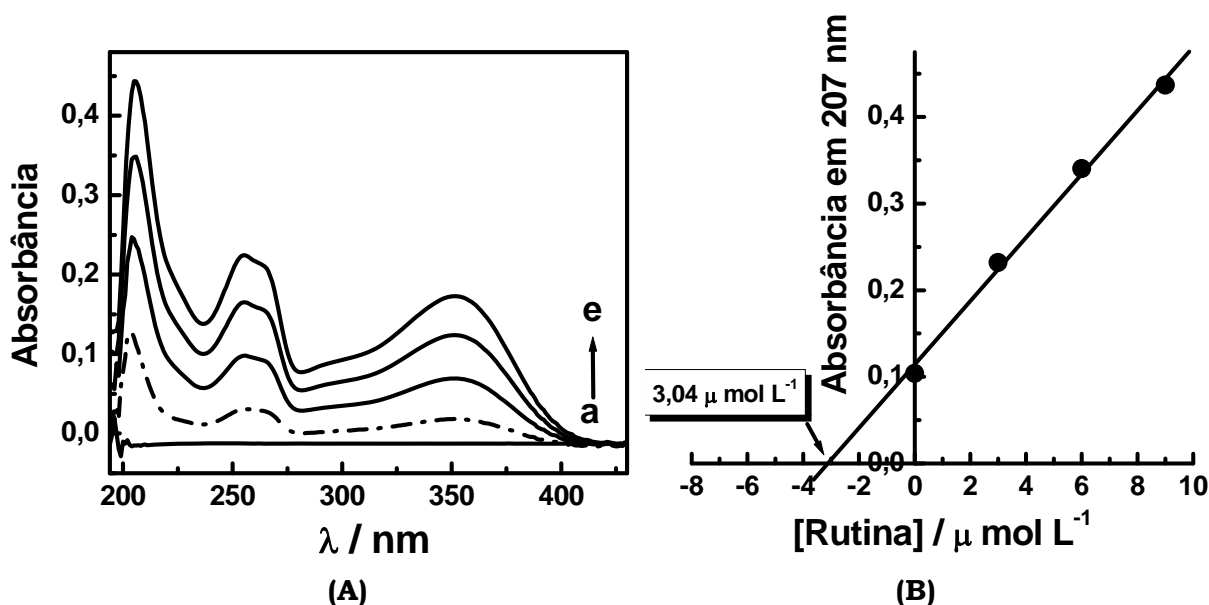


Figura 37 – (A) Espectros de absorção da amostra de Novarrutina[®] e rutina padrão em diferentes concentrações em solução tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 4,0. (a) branco; (b) 3,0 μmol L⁻¹ da amostra de Novarrutina[®]; adições de padrão: (c) 3,0; (d) 6,0 e (e) 9,0 (μmol L⁻¹). (B) Curva da adição do padrão rutina na amostra de Novarrutina[®].

Os resultados obtidos (Figura 37) reportam valores de recuperação de 101,3%, sendo a equação da reta correspondente: $Abs(207\text{ nm}) = \epsilon bC = 0,11 + 0,04 C$ (μmol L⁻¹), $R = 0,99$.

Os dados obtidos pelo método proposto e espectrofotométrico para a determinação de rutina em formulação farmacêutica foram comparados conforme resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados obtidos para a determinação de rutina em amostra de Novarrutina[®]

Amostra	Valor Rotulado*	Método Proposto	Método Comparativo
Novarrutina [®]	20,0 mg	21,0 ± 0,2 mg	21,3 ± 0,9 mg

(n = 3). * Valor informado pelo fabricante Zurita

Podemos concluir que a determinação de rutina na amostra de Novarrutina[®] tanto para o método proposto utilizando ECV modificado com filme PAG quanto para o método espectrofotométrico mostrou-se viável com altos valores de concordância com as informações do fabricante.

4.4.2. ÁCIDO CAFÊICO

4.4.2.1. OXIDAÇÃO DO ÁCIDO CAFÊICO SOBRE ECV

O comportamento voltamétrico do ácido cafêico sobre ECV convencional foi investigado preliminarmente em dois valores de pH (3,5 e 5,6), cujo voltamogramas cíclicos são mostrados na Figura 38A-B. Ambos os voltamogramas foram registrados após imersão dos eletrodos em solução de ácido cafêico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

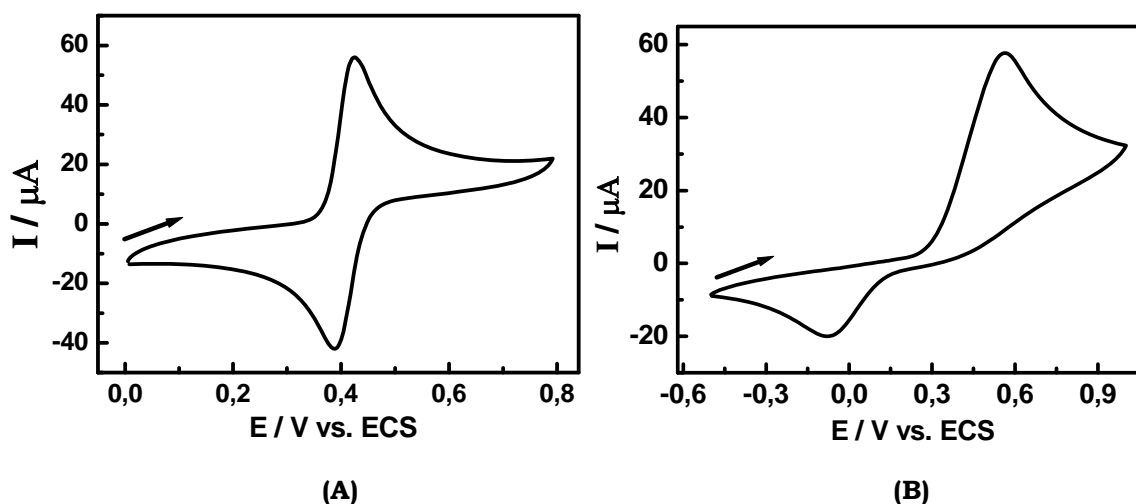
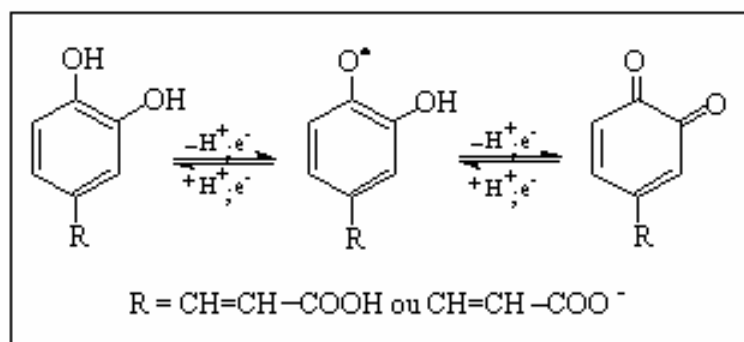


Figura 38 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do ácido cafêico no ECV em **(A)** pH = 3,5 e **(B)** pH 5,6 em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Um par de pico reversíveis em $+0,42 \text{ V}/+0,39\text{V vs. ECS}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 é observado (Figura 38A). A relação de $i_{pa}/i_{pc} = 1$ como mostra a Tabela 6 e a variação de $E_{pa} - E_{pc} = 30 \text{ mV}$, sugerindo que a oxidação do ácido cafêico envolve 2 elétrons (BARD; FAULKNER, 1980). Estes resultados são concordantes com a literatura (HOTTA, et al., 2002), que atribui a oxidação do grupo fenólico à forma quinona correspondente via semiquinona como intermediário conforme mecanismo proposto mostrado no Esquema 6.



Esquema 6 - Mecanismo proposto para a oxidação do ácido cafêico sobre eletrodo de carbono vítreo (HOTTA, et al., 2002).

O voltamograma na Figura 38B também mostra o comportamento da oxidação do ácido cafêico sobre ECV no valor de pH de 5,6. O potencial de pico para a oxidação do ácido cafêico neste pH é observado em +0,55 V, apresentando perda da reversibilidade do processo quando comparado ao valor de pH 3,5. Segundo Hotta et al. (2002), o comportamento redox envolvendo a transferência de 2 elétrons para o ácido cafêico é dependente do valor de pH, uma vez que a forma semiquinona pode se dissociar em função do pH do meio, mostrando uma melhor reversibilidade do processo redox em pH 3,0.

Tabela 6 - Efeito do pH em tampão acetato 0,01 mol L⁻¹ para a oxidação de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de ácido cafêico sobre ECV.

pH	E _{pa} (mV)	I _{pa} (μA)	E _{pc} (mV)	I _{pc} (μA)	E _{pa} -E _{pc} (mV vs. ECS)	I _{pc} /I _{pa} (μA)
3,5	424	49,7	390	44,1	34	0,9
5,6	553	43,3	-72	16,4	481	0,4

Pelos parâmetros mostrados na Tabela 6 o valor de pH 3,5 mostrou-se bastante relevante para o estudo do ácido cafêico sobre ECV mostrando uma boa reversibilidade do processo eletrodico.

4.4.2.2. OXIDAÇÃO DO ÁCIDO CAFÊICO SOBRE ECV MODIFICADO COM FILME PAG

O comportamento voltamétrico do ácido cafeico foi investigado sobre o ECV modificado com o filme PAG em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 e pH 5,6.

Na Figura 39 podemos observar o comportamento do ácido cafeico sobre ECV antes (curva 1) e após modificação com filme de PAG (curva 2) em solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5.

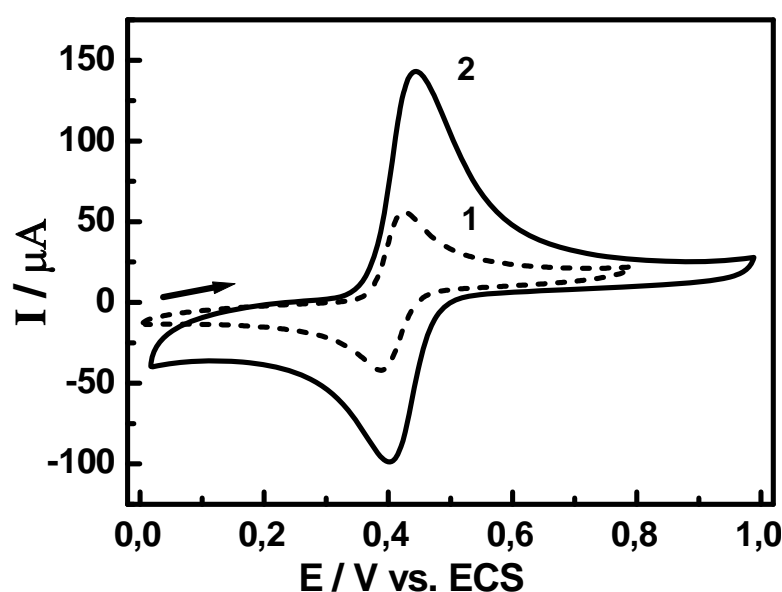


Figura 39 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do ácido cafeico no ECV antes (1) e após (2) modificação com filme PAG solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O comportamento reversível na oxidação do ácido cafeico no valor de pH 3,5 também é observado no ECV modificado com filme PAG com valores de $E_{\text{pa}} = +0,42 \text{ V}$ e $E_{\text{pc}} = +0,45 \text{ V}$, confirmando assim com os dados da literatura no envolvimento de dois elétrons na oxidação do ácido cafeico. Entretanto, a magnitude da corrente de pico para a oxidação do ácido cafeico sobre o ECV modificado é aproximadamente o triplo daquela observada no ECV convencional.

Na Figura 40 (curva 2) observamos o comportamento do ácido cafeico em solução tampão acetato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,6 sobre o eletrodo modificado com filme PAG. O comportamento sobre ECV é mostrado para efeito de comparação (curva 1 da Figura 40).

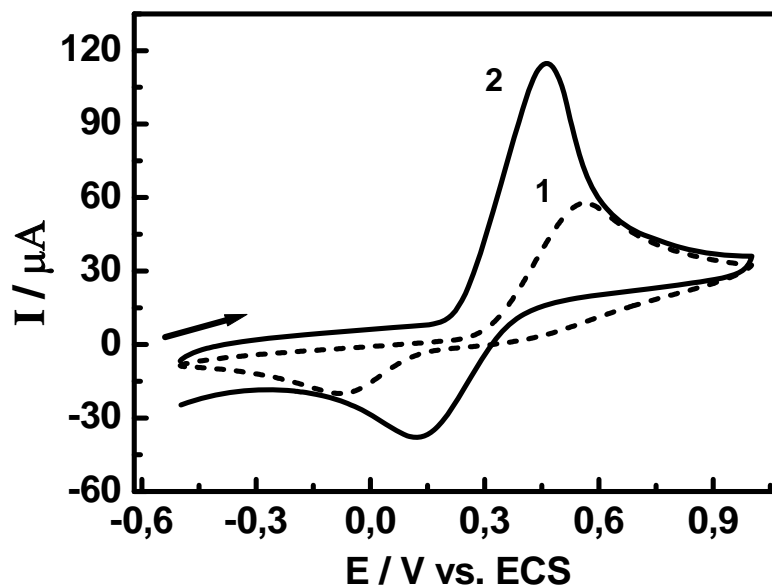


Figura 40 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do ácido cafêico no ECV antes (1) e após (2) modificação com filme PAG solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,65. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Pelo voltamograma da Figura 40 (curva 2) podemos observar que o comportamento do ácido cafêico em pH 5,6 sobre o ECV modificado apresenta um par de pico redox em +0,46/+0,13 V com o dobro da intensidade de corrente obtida para o ECV. O pico anódico desloca-se para potenciais menos positivo e o pico da varredura reversa para potenciais mais próximos daquele esperado para um processo reversível (BARD; FAULKNER, 1980). Os respectivos parâmetros obtidos para o ácido cafêico sobre o ECV modificado com filme PAG em valores de pH 3,5 e 5,6 são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Efeito do pH em tampão acetato para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafêico sobre ECV com filme PAG.

pH	E_{pa} (mV)	I_{pa} (μA)	E_{pc} (mV)	I_{pc} (μA)	$E_{pa}-E_{pc}$ (mV vs. ECS)	I_{pc}/I_{pa} (μA)
3,5	442	135,5	405	90,9	37	0,7
5,6	460	101,9	132	30,1	328	0,3

Pelos parâmetros obtidos para a oxidação do ácido cafêico sobre ECV antes (Tabela 6) e após modificação (Tabela 7) podemos observar que no valor de pH 3,5 o ácido cafêico caracteriza-se por um processo reversível e a modificação do ECV promoveu um aumento significativo nos valores da corrente de pico. Isto ocorre possivelmente porque o ácido cafêico ($pK_{a1} = 4,36$ e $pK_{a2} = 8,48$) é pré-concentrado sobre a superfície do filme de PAG em qualquer solução ácida de pH. No entanto em pH 5,6 é nítida a mudança de reversibilidade do processo, como evidenciado pela diminuição do pico catódico e alto valor de potencial na redução do produto observado na varredura reversa.

A capacidade de retenção do ácido cafêico no filme PAG foi analisada usando dois procedimentos: Inicialmente o eletrodo modificado foi imerso em uma solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafêico em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 e submetido à incorporação eletroquímica usando 10 ciclos entre 0 a +0,8 V com $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ (Figura 41A). No outro procedimento o ácido cafêico foi incorporado em circuito aberto variando o tempo de imersão de 0 a 10 minutos do eletrodo modificado em solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafêico (Figura 41B). Em ambos os casos, o eletrodo após lavagem com água foi transferido para a solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5, onde voltamogramas cíclicos foram registrados apresentando características similares ao verificado para o eletrodo modificado imerso diretamente na solução de ácido cafêico.

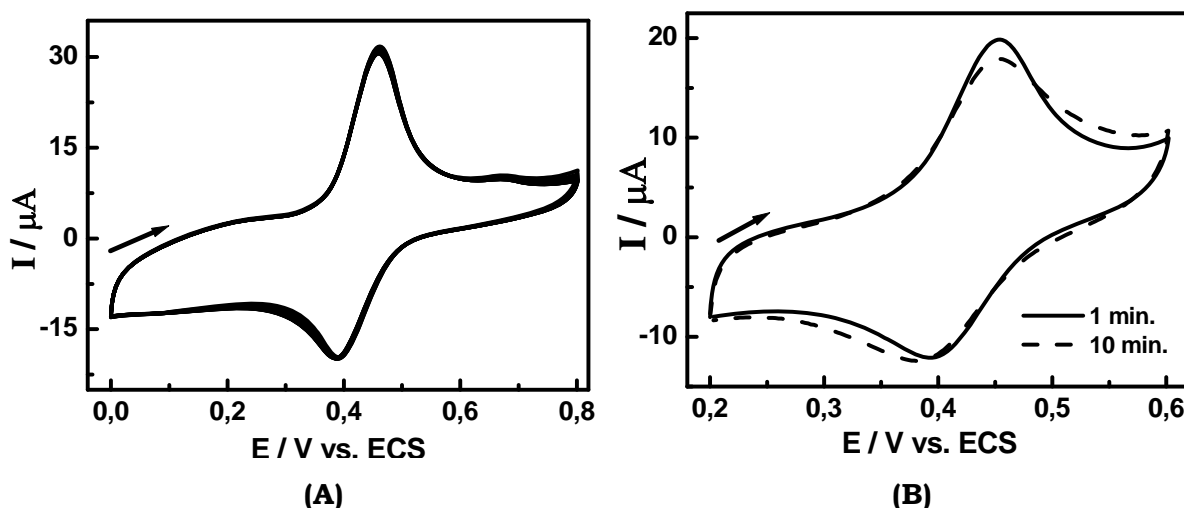


Figura 41 – Efeito da incorporação do ácido cafêico sobre ECV modificado com filme PAG em solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 por meio da (A) ciclagem sucessiva (10 ciclos) e (B) por circuito aberto em 1 e 10 minutos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Os valores da corrente de pico dos voltamogramas registrados após incorporação do ácido cafêico por ambos os procedimentos são quase inalterados quando o EQM foi imerso na solução do eletrólito suporte. Não houve deslocamento significativo nos potenciais de pico anódico e catódico do ácido cafêico. Este comportamento indica que o uso de eletrodo modificado com PAG retém fortemente o ácido cafêico na superfície eletródica em pH 3,5. Nas medidas a seguir adotou-se um tempo de acúmulo de um minuto para a incorporação do ácido cafêico no filme de PAG.

4.4.2.2.1. INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARREDURA

Em seguida, estudou-se o efeito da velocidade de varredura sobre o sinal voltamétrico para o filme PAG/ácido cafêico incorporado por ciclagem eletroquímica e sob circuito aberto entre valores de v de 10 a 100 mV s^{-1} .

Na Figura 42A, os voltamogramas obtidos após a incorporação eletroquímica por 10 ciclos sucessivos mostram que os potenciais de pico sofrem pequenos deslocamentos para valores mais positivos e as correntes do pico anódico são proporcionais a $v^{1/2}$ (Figura 42B), seguindo a equação: $I_{pa} (\mu\text{A}) = -2,60 + 1,19 v^{1/2}$ $R = 0,99$, $n = 10$, demonstrando que a oxidação do ácido cafêico é controlada por difusão através do filme.

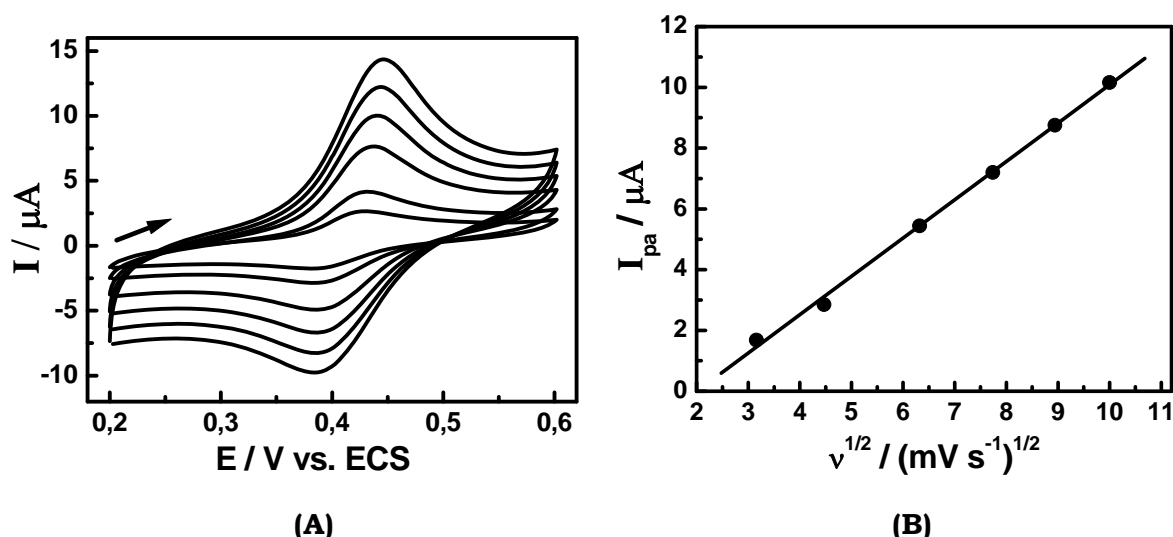


Figura 42 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo da velocidade de varredura em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 sobre ECV modificado após incorporação eletroquímica do ácido cafêico. (B) Gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$.

O efeito da velocidade de varredura na oxidação do ácido caféico incorporado sobre o EQM com PAG em circuito aberto (1 minuto de tempo de acúmulo) foi também investigado (Figura 43A) e a corrente de pico aumenta linearmente com $v^{1/2}$, sendo $I_{pa} (\mu A) = -3,01 + 1,28 v^{1/2}$, $R = 0,99$, $n = 10$ sugerindo que também na incorporação do ácido caféico em circuito aberto, a oxidação do analito ocorre segundo um processo controlado por difusão através do filme (Figura 43B).

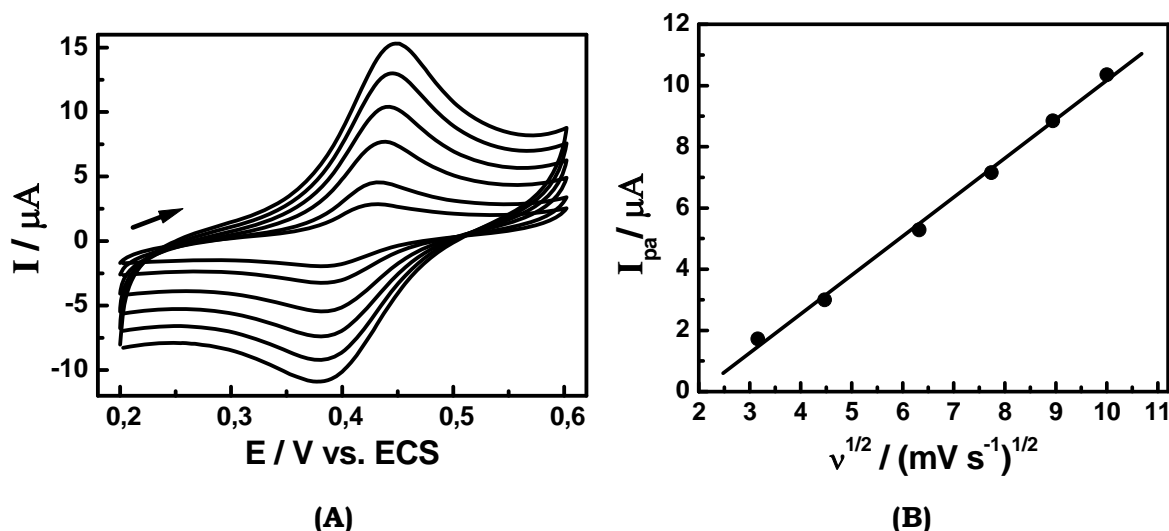


Figura 43 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo da velocidade de varredura em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 sobre ECV modificado após incorporação do ácido caféico por circuito aberto. **(B)** Gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$.

4.4.2.2.2. CURVA ANALÍTICA PARA O ÁCIDO CAFÊICO

Após estudo do comportamento voltamétrico do ácido caféico sobre eletrodo modificado com PAG pela técnica de voltametria cíclica, em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5, investigamos a dependência do EQM na variação da concentração de ácido caféico.

Considerando que a técnica voltamétrica de onda quadrada poderia aumentar a sensibilidade do método proposto, devido às características inerentes da técnica, investigou-se a seguir a oxidação do ácido caféico incorporado no filme de PAG através da técnica de voltametria de onda quadrada.

Um voltamograma típico de onda quadrada é mostrado na Figura 44, o qual correspondente à oxidação de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido caféico incorporado sobre filmes de PAG na superfície do ECV em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 utilizando uma frequência de 30 Hz, amplitude de pulso de 50 mV e incremento de potencial de 2,0 mV .

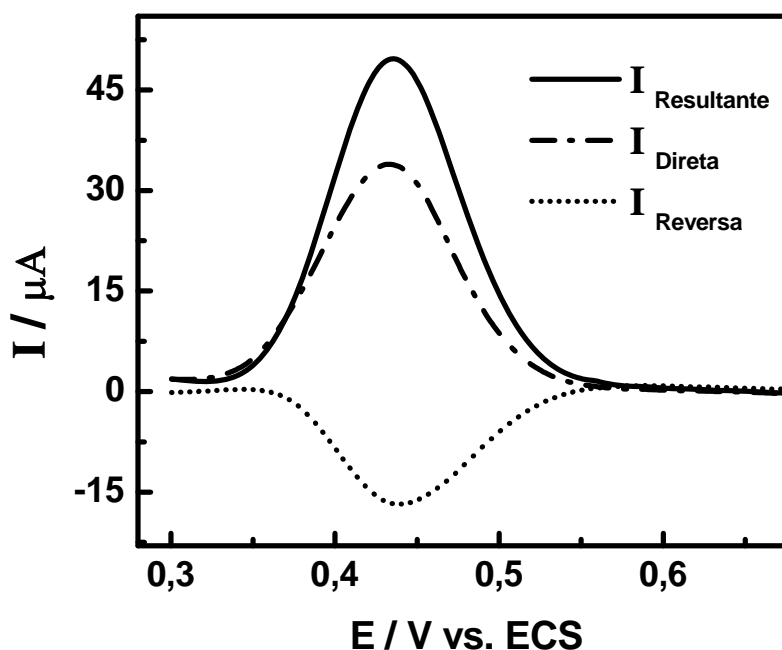


Figura 44 – Voltamograma de onda quadrada obtido para $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafêico incorporado no filme de PAG na superfície do ECV em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5. $f = 30 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$.

Um pico de oxidação é observado em $+0,44 \text{ V}$, cuja intensidade da corrente de pico resultante mostrou-se superior quando comparada à voltametria cíclica.

O efeito da frequência (f) e da amplitude de potencial (ΔE) foi variado de $10 - 100 \text{ Hz}$ e de 10 a 120 mV , respectivamente. Melhores resultados foram obtidos em $f = 30 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$, os quais foram escolhidos como as melhores condições experimentais para obtenção da curva analítica.

Usando as melhores condições experimentais para análise de ácido cafêico sobre eletrodo recoberto por filmes de PAG pela técnica de voltametria de onda quadrada foi possível construir uma curva analítica no intervalo de $9,0 \times 10^{-7}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os respectivos voltamogramas são mostrados na Figura 45A.

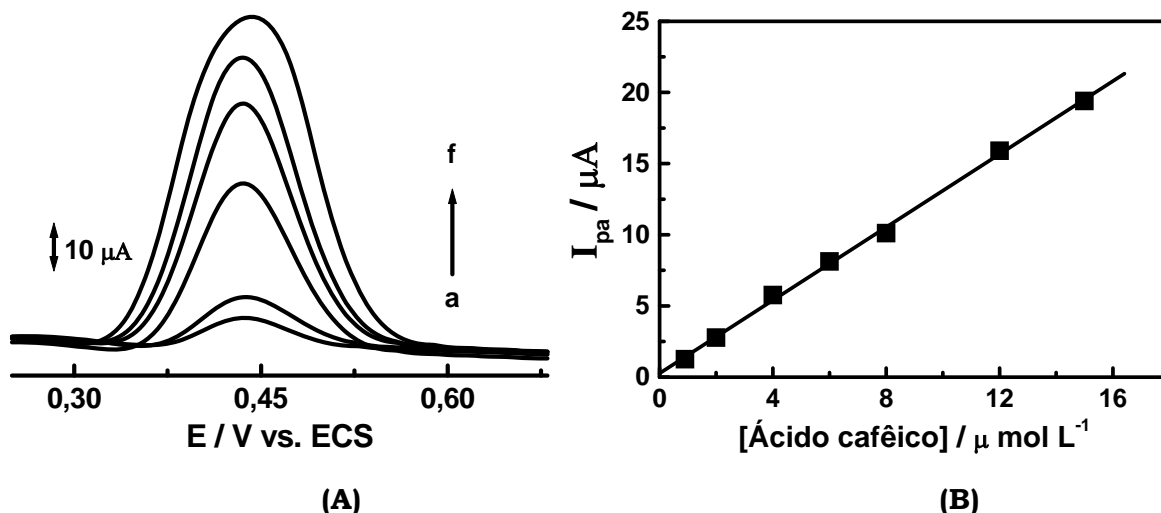


Figura 45 - (A) Voltamogramas obtidos para determinação de ácido cafêico em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 em diferentes concentrações: (a) = 0,04; (b) = 0,08; (c) = 0,3; (d) = 0,5; (e) = 0,7 e (f) = 2,0 ($\times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). (B) Curva analítica. $f = 30 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$.

A corrente de pico aumenta linearmente no intervalo de 0,9 a $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, seguindo a equação: $I_{pa} (\mu\text{A}) = 0,27 + 1,28 C$ ($C = \mu\text{mol L}^{-1}$) $R = 0,99$, $n = 7$, Figura 45B. O limite de detecção [$3 \times (\text{desvio padrão do branco})/\text{sensibilidade}$] obtido com a voltametria de onda quadrada foi de $4,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

4.4.2.3. INTERFERÊNCIA DE OUTROS ÁCIDOS FENÓLICOS NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFÊICO

Os principais interferentes que foram levados em consideração neste trabalho foram os outros ácidos hidroxicinâmicos, uma vez que estes compostos são portadores de substituintes fenólicos oxidáveis presentes no anel aromático e podem ser determinados voltametricamente (CHRISTOFERSEN; CARDWELL, 1996). Dentre os escolhidos estão: o ácido clorogênico, ascórbico, sinápico, ferúlico e *p*-cumárico, cujas estruturas foram mostradas na Figura 5.

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido cafêico, o qual, associado ao ácido quínico, origina o ácido clorogênico que é o principal metabólito da família dos ésteres formados.

Deste modo, o comportamento eletroquímico do ácido clorogênico foi investigado sobre ECV modificado com filme PAG. Os voltamogramas cíclicos

obtidos para a oxidação do ácido clorogênico em solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ no ECV antes e após modificação com filme PAG estão apresentados na Figura 46.

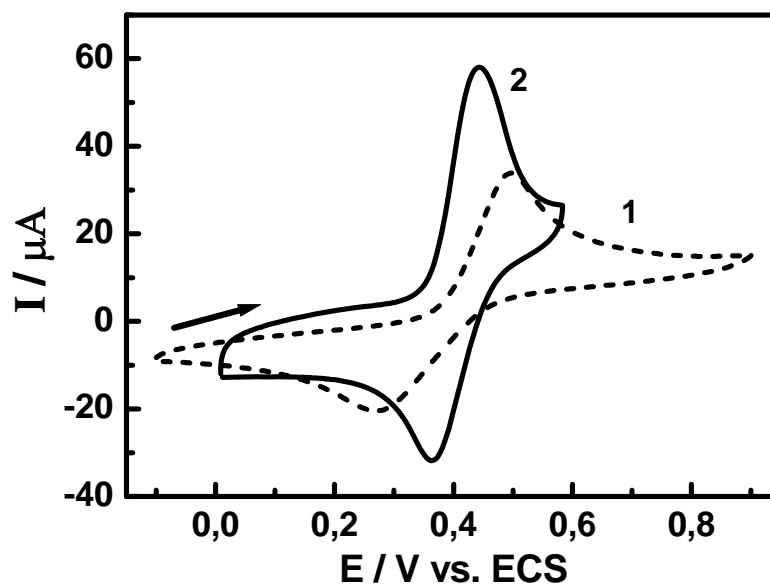


Figura 46 - Voltamogramas cíclicos obtidos para $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorogênico em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 no ECV antes (1) e após (2) modificação com filme PAG. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O ácido clorogênico no ECV convencional (Figura 46 curva 1) é oxidado em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 em $E_{pa} = +0,49 \text{ V}$. Um pico catódico é observado na varredura reversa em $E_{pc} = +0,27 \text{ V}$. No eletrodo modificado a corrente de pico é maior (Figura 46 curva 2) e o potencial de pico catódico desloca-se ligeiramente para potencial mais positivo, com um par de pico em $+0,48/+0,34 \text{ V}$. Portanto o comportamento do ácido clorogênico sobre o EQM é essencialmente o mesmo verificado para o ácido cafêico, este fato possivelmente se deve à presença dos grupos hidroxilas presentes no anel na posição *orto*, as mesmas encontradas na estrutura do ácido cafêico. Deste modo, os resultados obtidos são indicativos de que ambos os derivados fenólicos podem ser quantificados via eletrodo modificado por filmes de PAG, porém a determinação da contribuição relativa de cada um é limitada.

A quantificação de ácido cafêico na presença dos outros ácidos hidroxicinâmicos foi realizada por múltiplas adições de padrão de ácido cafêico na célula eletroquímica contendo solução de cada ácido hidroxicinâmico em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 sobre ECV modificado com filme PAG. Primeiramente realizou-se a varredura somente na presença dos possíveis interferentes e em seguida foram adicionadas diferentes concentrações de ácido cafêico.

O pico no potencial de +0,47 V característico do pico de oxidação do ácido cafêico e/ou clorogênico foi observado na presença de todos os possíveis interferentes investigados, o qual aumentou com a quantidade de ácido cafêico adicionado como solução padrão. Os potenciais de pico dos ácidos investigados em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5 sobre ECV modificado com filme PAG na ausência e presença de ácido cafêico são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados obtidos para a determinação de ácido cafêico sobre ECV modificado com filme PAG na presença de possíveis interferentes.

Interferentes	E_{pa} (mV)	$C_{interferente}/C_{analito}$	% I_p
Ferúlico	708	1	91,8
Sinápico	650	1	90,6
<i>p</i> -Cumárico	908	1	94,3
Ascórbico	273	1	95,4

O valor da corrente de pico obtida para o ácido cafêico na ausência dos outros ácidos hidroxicinâmicos em solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato pH 3,5 é em torno de $32,9 \mu\text{A}$. Na Tabela 8 podemos verificar a porcentagem de corrente de pico para o ácido cafêico na presença de cada interferente investigado.

Portanto nas soluções dos ácidos ascórbico, sinápico, ferúlico e *p*-cumárico o método permite a determinação de ácido cafêico sem interferência dos demais derivados, indicando que o eletrodo modificado tem exibido alta seletividade para determinação de ácido cafêico e/ou ácido clorogênico.

A ausência de grupos hidroxilas na posição *orto* do anel na estrutura química ou a irreversibilidade do processo que possivelmente não estabiliza intermediários semiquinona (HOTTA, et al., 2002) observado durante a oxidação eletroquímica dos ácidos *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e ascórbico, provavelmente impede esta interação com o filme de PAG, reduzindo assim a utilidade do ECV modificado com filme PAG para pré-concentrar estes compostos fenólicos em $\text{pH} \leq 3,0$.

Assim, levando em consideração que em $\text{pH} 3,5$ há uma interação seletiva entre a oxidação do ácido cafêico e/ou ácido clorogênico no ECV modificado sem interferência dos ácidos ferúlico, sinápico, *p*-cumárico e ascórbico, a aplicabilidade do método foi testada em amostra de vinho tinto.

4.4.2.4. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFÊICO EM VINHO TINTO

A quantificação do conteúdo de ácido cafêico em amostras de vinho tinto foi realizada pela técnica de voltametria de onda quadrada por múltiplas adições de padrão da solução de ácido cafêico adicionada diretamente na amostra de vinho tinto sem qualquer tipo de pré-tratamento (Figura 47). Como melhor descrito na parte experimental, o ECV modificado com filme PAG foi imerso na célula voltamétrica contendo 10 mL de vinho tinto e 5 mL de uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de EDTA sob agitação.

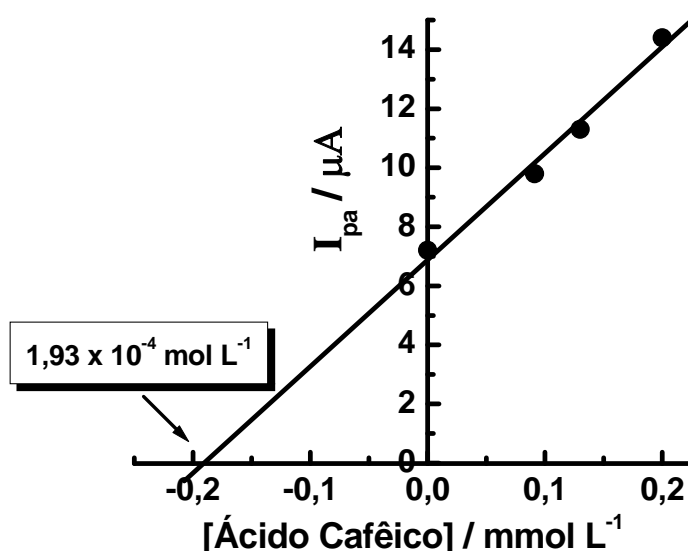


Figura 47 – Determinação da quantidade de ácido cafêico na amostra de vinho tinto obtida pelo método da adição de padrão.

Os resultados mostram uma concentração de $1,93 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ou seja, $34,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ obtida pela extrapolação da reta conforme mostra a Figura 47, apresentando um coeficiente de correlação linear de 0,993. A equação da reta obtida foi $I_{pa} (\mu\text{A}) = 6,910 + 35,8 C$ ($C = \text{mmol L}^{-1}$), $n = 4$.

Os resultados obtidos usando o método proposto estão de acordo com os valores fornecidos pela literatura (DELGADO, et al., 2002; SANZA, et al., 2004) que mostra que o ácido cafêico entre os ácidos hidroxicínicos é o que se apresenta em maior quantidade quando utilizado em bebidas como antioxidante natural.

4.5. COMPOSTOS FARMACÊUTICOS

4.5.1. AMOXICILINA (AMX)

4.5.1.1. OXIDAÇÃO DA AMX SOBRE ECV

Visando obter informações a respeito do comportamento eletroquímico da AMX registrou-se voltamogramas cíclicos para soluções $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AMX em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,2 sobre ECV. Os voltamogramas cíclicos para o ECV na ausência (curva 1) e na presença de AMX (curva 2) são apresentados na Figura 48.

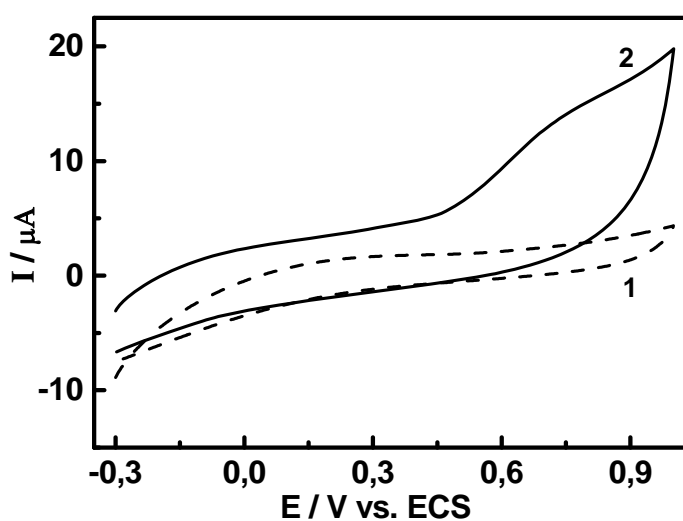


Figura 48 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,2 na (1) ausência e na (2) presença de AMX em solução $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

No intervalo de varredura de potencial entre -0,3 a +1,0 V, a oxidação da AMX sobre o ECV caracteriza-se por uma onda mal definida, de pequena intensidade em potencial de +0,7 V, como mostra a Figura 48, curva 2. Esse pico é atribuído a oxidação do grupo $R-OH \leftrightarrow R=O + 2e + H^+$ presente na estrutura molecular do fármaco segundo a literatura (USLU; BIRYOL, 1999).

A influência da velocidade de varredura no comportamento do fármaco sobre o ECV foi investigado no intervalo de 20 a 100 $mV s^{-1}$, como mostra os voltamogramas na Figura 49A.

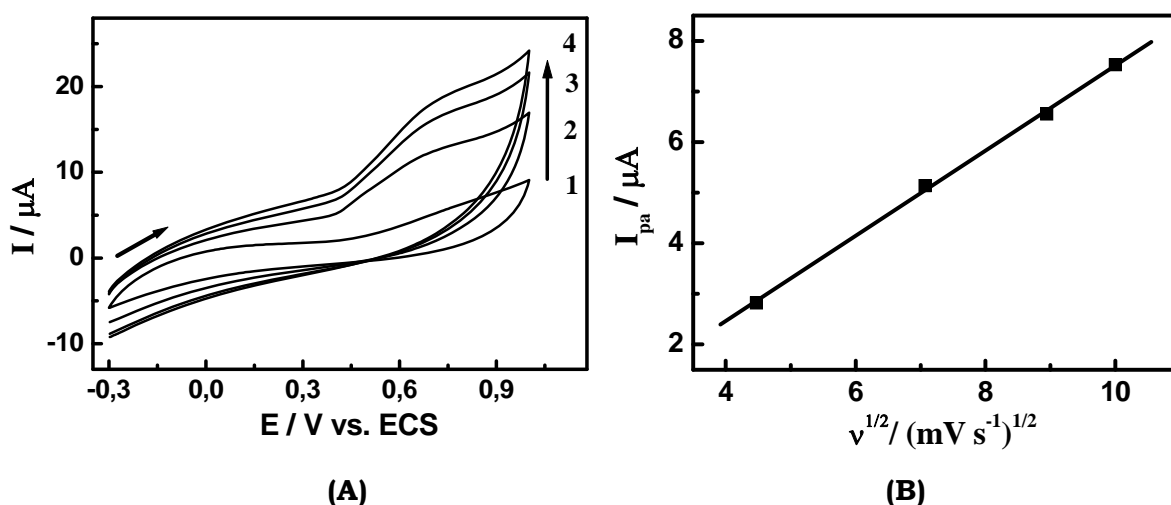


Figura 49 – (A) Voltamogramas cíclicos da oxidação $5,0 \times 10^{-4} mol L^{-1}$ de AMX em tampão acetato $0,1 mol L^{-1}$ pH 5,2 sobre ECV em diferentes velocidades de varredura: (1) = 20; (2) = 50; (3) = 80 e (4) = 100 $mV s^{-1}$. (B) Gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$.

Uma relação linear foi observada entre a raiz quadrada da velocidade e a corrente de pico em +0,7 V, conforme a relação entre i_{pa} vs. $v^{1/2}$ mostrada na Figura 49B, sendo $I_{pa} (\mu A) = -0,91 + 0,84 v^{1/2}$, $R = 0,99$, $n = 4$, porém a relação não cruza a origem sugerindo que a oxidação da AMX pode não ser um processo simplesmente controlado por difusão (USLU; BIRYOL, 1999).

No estudo da oxidação da AMX sobre ECV não se observou nenhum pico em potenciais menos positivo após varreduras sucessivas, sendo assim investigou-se o comportamento da AMX frente aos eletrodos modificados com filmes de PAG buscando uma melhor resposta na oxidação da AMX.

4.5.1.2. OXIDAÇÃO DA AMX SOBRE ECV MODIFICADO POR FILMES DE PAG

A influência das diferentes formas de obtenção dos filmes de PAG sobre a superfície do eletrodo na oxidação de AMX foi investigada registrando-se voltamogramas cíclicos para a oxidação de AMX sobre eletrodos recobertos por filme de PAG obtidos por: 1) eletropolimerização do ácido glutâmico (MONO); 2) adição de PAG 100% e 3) adição da solução mista PAG:GLU (50%:50%) conforme descrito na parte experimental. Voltamogramas cíclicos correspondentes à oxidação de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AMX em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,2 sobre os eletrodos recobertos com os diferentes filmes são mostrados na Figura 50.

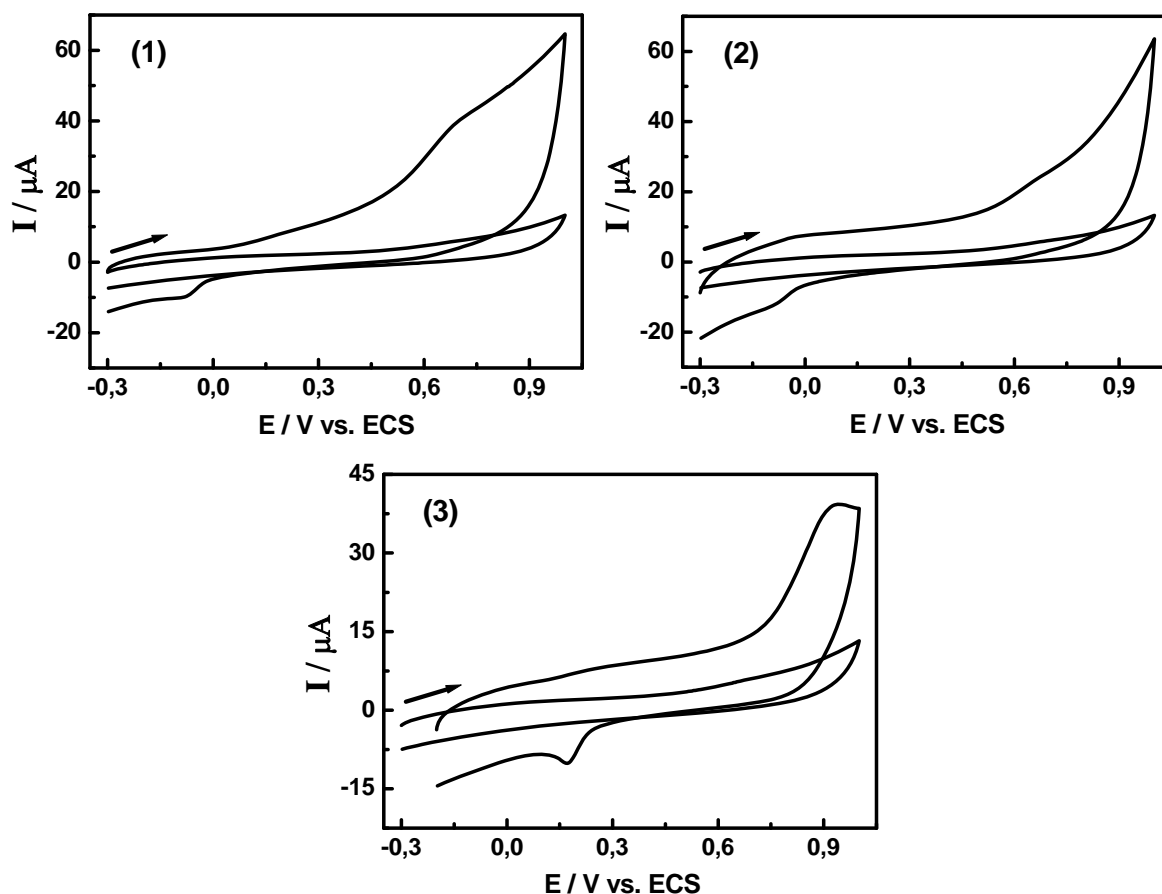


Figura 50 - Voltamogramas cíclicos da oxidação de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AMX em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,2 sobre ECV modificado por filmes: (1) MONO; (2) PAG, (3) PAG:GLU (50%:50%). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Na Figura 50 podemos observar pelos voltamogramas obtidos para os diferentes filmes o aparecimento de um pico atribuído à oxidação do grupo fenólico da AMX sobre a superfície eletródica modificada pelos filmes.

A Figura 50-3 mostra que no filme PAG:GLU, a AMX é oxidada em $E_{pa} = +0,9$ V e reduzida em $E_{pc} = +0,15$ V. A ocorrência do pico na varredura reversa também é observado no filme obtido pela eletropolimerização do ácido glutâmico (Figura 50-1) em potencial $E_{pc} = -0,08$ V e no filme PAG também em $E_{pc} = -0,08$ V, conforme mostra o voltamograma cíclico da Figura 50-2. Embora a oxidação da AMX ocorra em todos os eletrodos modificados, a corrente é maior e o pico de potencial é melhor definido em eletrodos com filme PAG:GLU. Este comportamento da AMX também foi observado por Uslu e Biryol (1999) para a oxidação do fármaco sobre eletrodo de pasta de carbono modificado com poli N-vinil imidazol e é atribuído à redução da quinona gerada após prévia oxidação do grupo fenólico. Estes resultados sugerem que a forma oxidada é mantida na superfície do filme.

A comparação entre os voltamogramas obtidos para oxidação da AMX sobre os ECVs modificados preparados conforme descrito na parte experimental, também mostra um aumento significativo na corrente de pico da oxidação do fármaco ($I_{pa} = 23 \mu\text{A}$) no filme PAG:GLU (Figura 51 curva 2) em relação à sua corrente de pico ($I_{pa} = 10 \mu\text{A}$) no ECV (Figura 51 curva 1).

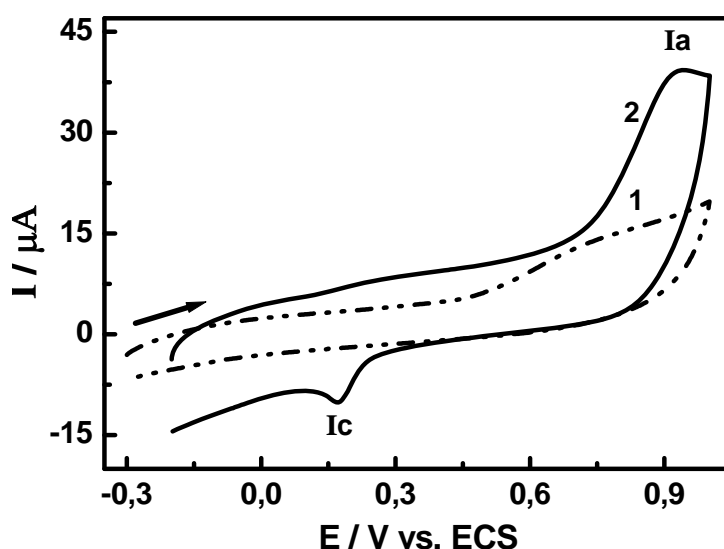


Figura 51 – Oxidação de $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 sobre ECV antes (1) e após (2) a modificação com filme PAG:GLU (50%:50%). $v = 50$ mV s⁻¹.

Um deslocamento no potencial de pico atribuído à oxidação da AMX também é observado sobre o ECV com filme PAG:GLU em relação ao eletrodo convencional ($E_{pa} = +0,75$ V). Segundo Bergamini et al. 2006 a AMX em pH 5,5 encontra-se predominantemente na forma *zwitterion* (composto químico que está eletricamente neutro, mas com carga positiva e negativa em átomos diferentes), com o grupo carboxila desprotonado e o grupo amino protonado, portanto pelos resultados obtidos a AMX em pH 5,2 é pré-concentrada na superfície do eletrodo, provavelmente, devido à interação entre o grupo amino do fármaco e os grupos carboxílicos livres ($pK_a = 4,07$) no filme.

A redução do produto de oxidação da AMX retido no filme e identificado pelo pico em +0,17 V na varredura reversa (Figura 51 curva 2), sugere que a redução do produto de oxidação (Ia) poderia formar uma espécie, a qual é reoxidada em potencial menos positivo podendo ser utilizado para fins analíticos e monitoramento indireto do fármaco.

Deste modo, considerando a comparação dos resultados obtidos para o comportamento da AMX sobre o ECV antes e após modificação por filmes de PAG:GLU investigou-se a seguir as melhores condições para o monitoramento do produto redox da AMX sobre o eletrodo modificado com filmes de PAG:GLU.

Voltamogramas com varreduras sucessivas correspondente á oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 sobre o ECV modificado com filme PAG:GLU são apresentados na Figura 52.

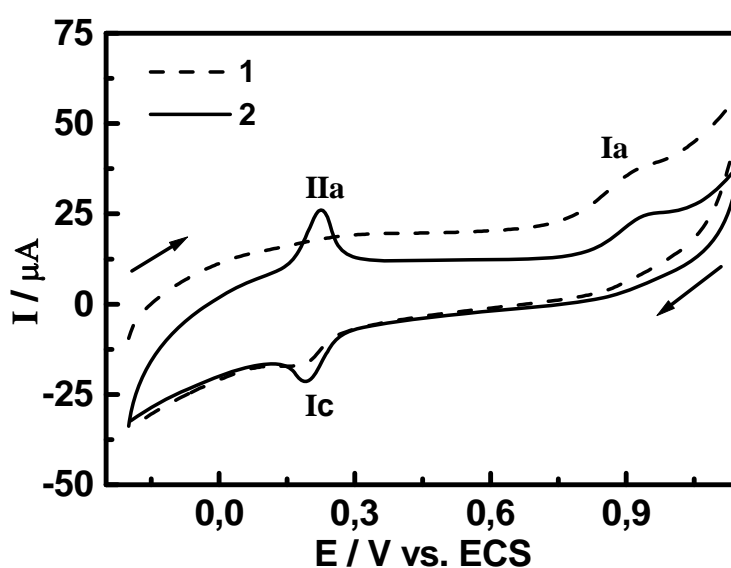


Figura 52 – Voltamogramas cíclicos sucessivos obtidos para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 sobre ECV modificado por filme PAG:GLU (50%:50%). (1) 1^a e (2) 2^a varredura. $v = 100$ mV s⁻¹.

Na primeira varredura de potencial observa-se a oxidação de AMX em valores de potencial de $E_{pIa} = +0,9$ V (pico Ia) e o pico correspondente a redução do produto em $E_{pc} = +0,17$ V (pico Ic da Figura 52). Na segunda varredura de potencial, conforme mostra a curva 2 da Figura 52, ocorre o surgimento de um novo pico anódico em potencial de $+0,23$ V (pico IIa) provavelmente atribuído a reoxidação do material reduzido (pico Ic) na varredura reversa da AMX.

Estes resultados indicam que há uma dependência entre o processo de oxidação que ocorre em potencial de $+0,9$ V e o surgimento do novo pico (IIa) na segunda varredura, mostrando que a quinona gerada após oxidação do grupo fenólico (pico Ia) é reduzida em $E_{pc} = +0,17$ V e reoxidada à intermediário semiquinona em $E_{pIIa} = +0,23$ V. A diferença entre $E_{pa} - E_{pc}$ para o par de pico Ic/IIa é igual a 60 mV, indicando que 1 elétron é envolvido no processo. Assim o comportamento observado para o ECV modificado sugere que na redução da quinona formada e incorporada no filme durante a redução gera o radical semiquinona que é também retido no filme e oxidado na segunda varredura de potencial em valores menos positivo.

4.5.1.2.1. INFLUÊNCIA DO pH

O efeito da variação de pH no comportamento do fármaco no intervalo de pH de 4,0 a 12,0 sobre o eletrodo modificado com filme PAG:GLU (50%:50%) em função dos potenciais de pico e das correntes de pico é mostrado na Figura 53 para a primeira varredura de potencial.

Os eletrodos modificados primeiramente foram imersos na solução do eletrólito suporte para todos os valores de pH onde os voltamogramas foram registrados e em seguida imersos na solução de AMX registrando a primeira e a segunda varredura de potencial a uma velocidade de 100 mV s^{-1} no intervalo de $-0,3$ a $+1,0$ V.

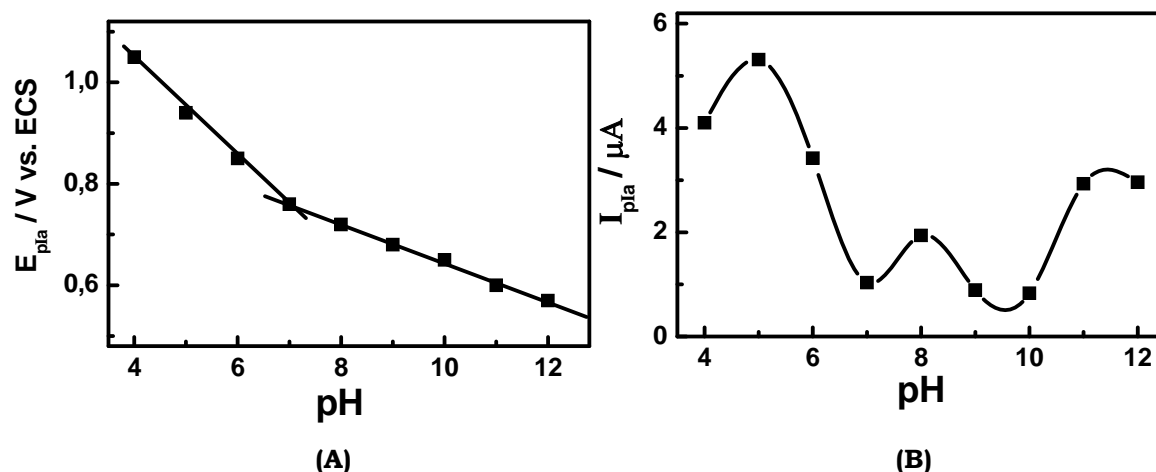


Figura 53 - Efeito da variação de pH observado para a oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX sobre o ECV modificado com filme PAG:GLU (50%:50%) na primeira varredura de potencial sobre (A) E_{pia} e (B) I_{pia} . $v = 100$ mV s⁻¹.

O comportamento da amoxicilina em função do pH e da corrente de pico pode estar relacionado com a espécie em solução como relatado por Shoukry em 1992. Pela Figura 53A observamos que a AMX é oxidada em todos os valores de pH com máxima intensidade de pico em pH ácido ($4,0 \leq \text{pH} \leq 6,0$) e um deslocamento do potencial de pico anódico é observado para valores menos positivos, apresentando dois segmentos lineares com intersecção em pH 7,0. Em seu estudo Shoukry investigou os valores de pK_a (2,41/7,10 e 9,38) da AMX possibilitando a presença de três diferentes espécies ácidas. Em pH ácido a AMX encontra-se na forma zwitterion, onde se tem também a maior intensidade nos valores da corrente (Figura 53B). Quando o valor de pH é aumentado ocorre a desprotonação do grupo amino presente em sua estrutura ($pK_a = 7,19$).

Os valores dos parâmetros obtidos do comportamento da AMX em diferentes pHs são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros voltamétricos obtidos de voltamogramas cíclicos em diferentes valores de pH na oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX em tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ sobre ECV modificado com filmes de PAG:GLU.

pH	E _{pIa} (mV)	I _{pIa} (μA)	E _{pIIa} (mV)	I _{pIIa} (μA)
2	36	2,6	-	-
3	32	3,4	-	-
4	108	16,0	35	10,6
5	99	12,8	22	12,3
6	90	10,6	17	4,1
7	86	4,9	-	-
8	76	3,3	-	-
9	74	0,9	-	-
10	68	1,2	-	-
11	62	2,1	-	-
12	57	2,8	-	-

Pelos dados apresentados na Tabela 9 podemos observar que a AMX é oxidável em todos os valores de pH investigados sobre ECV modificado por filme PAG:GLU, mas somente na região de pH entre 4,0 a 6,0 exibe o par de pico correspondente a oxidação da semiquinona em potencial de +0,23 V do produto resultante da oxidação da AMX na segunda varredura de potencial. Como podemos observar na Figura 54 o pico correspondente à oxidação da semiquinona é melhor definido em valor de pH 5,0.

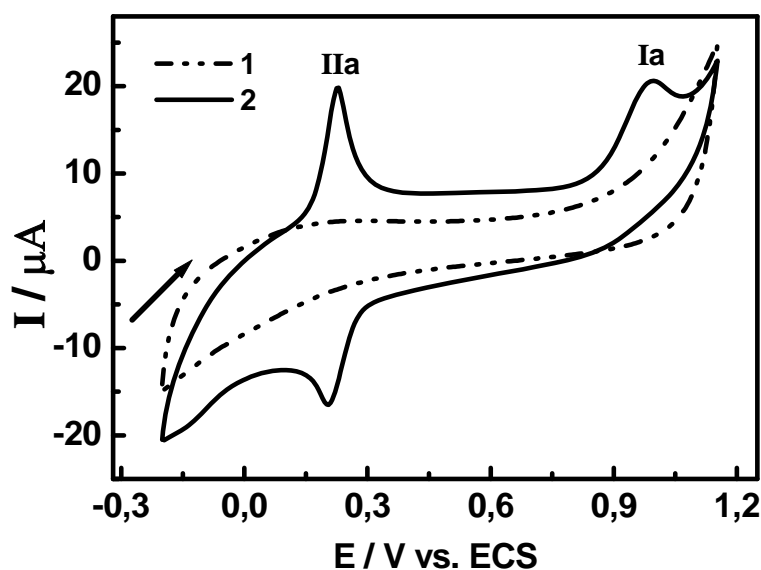


Figura 54 – Voltamogramas cíclicos sucessivos para oxidação da AMX em solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sobre ECV modificado com filme PAG:GLU (50%:50%) no (1) eletrólito suporte; (2) 2ª varredura em solução de AMX em tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma cíclico (curva 2 da Figura 54) obtido na segunda varredura de potencial em tampão $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 no intervalo de -0,3 a +1,0 V mostra um pico de oxidação em +0,9 V (Ia) atribuído a oxidação da AMX e também o aparecimento do pico em +0,22 V (IIa) referente a oxidação do produto gerado.

Considerando que o voltamograma registrado após a primeira varredura mostra a ocorrência do pico anódico em +0,2 V e que este é atribuído à semiquinona retida no filme após a redução da carbonila gerada na etapa prévia de oxidação do grupo fenólico em potencial de +1,0 V, investigou-se a possibilidade de monitorar a oxidação da AMX como método indireto em potencial menos positivo que o usual requerido para oxidação do seu grupo fenólico em $E = +1,0 \text{ V}$. Para que este comportamento realmente ocorra é necessário a oxidação da AMX em potencial de +1,0 V. Para isto, o eletrodo modificado com filmes PAG:GLU foi submetido à oxidação prévia fixando-se o potencial em +1,0 V promovendo a oxidação prévia da AMX sobre o eletrodo modificado sob tempo controlado para otimizar o produto gerado, de modo semelhante à técnica voltamétrica de redissolução anódica.

A ocorrência deste pico (IIa) permite o monitoramento da AMX utilizando-se um procedimento onde o eletrodo modificado é submetido à oxidação prévia sob potencial de +1,0 V, promove a formação da carbonila após prévia oxidação, a qual é incorporada no filme e responsável por um par de picos redox em

aproximadamente +0,2 V, o qual pode ser utilizado para análise do fármaco em potencial menos positivo que o obtido via oxidação direta, como mostra a Figura 55.

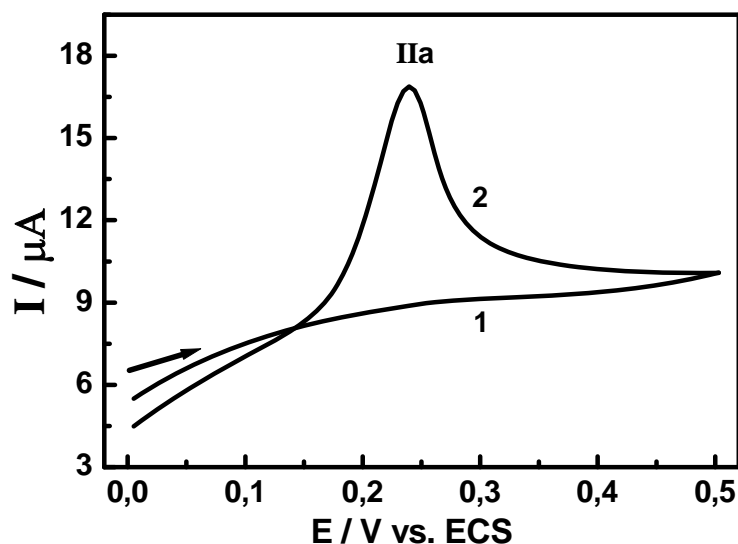


Figura 55 – Voltamogramas de varredura linear sobre ECV modificado com PAG:GLU (50%:50%) obtidos para oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AMX pré-oxidada em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,2 sob +1,0 V em (1) $t = 0$ e (2) $t = 60 \text{ s}$. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma da Figura 55 mostra a ocorrência de um pico voltamétrico de redissolução anódica para a AMX em $E_{p\text{IIa}} = +0,23 \text{ V}$ quando pré-oxidada no potencial de +1,0 V durante 60 segundos.

4.5.1.2.2. ANÁLISE INDIRETA DE AMX SOBRE ECV MODIFICADO COM FILME PAG:GLU

O efeito do potencial de oxidação da AMX em torno de +1,0 V mostrou-se uma etapa essencial para ocorrência do pico (IIa) correspondente ao produto previamente oxidado. Devido a esta dependência do pico de oxidação (I_a) investigou-se o efeito do tempo de acúmulo no $E_p = +1,0 \text{ V}$ sobre a corrente de pico no intervalo de 0 a 120 segundos. Neste estudo, o eletrodo modificado com PAG:GLU (50%:50%) foi imerso em solução de AMX $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,2 e os voltamogramas registrados após os diferentes tempos de acúmulo sob potencial de +1,0 V. A relação do tempo de acúmulo no potencial de +1,0 V em função da corrente de pico (IIa) é apresentada na Figura 56.

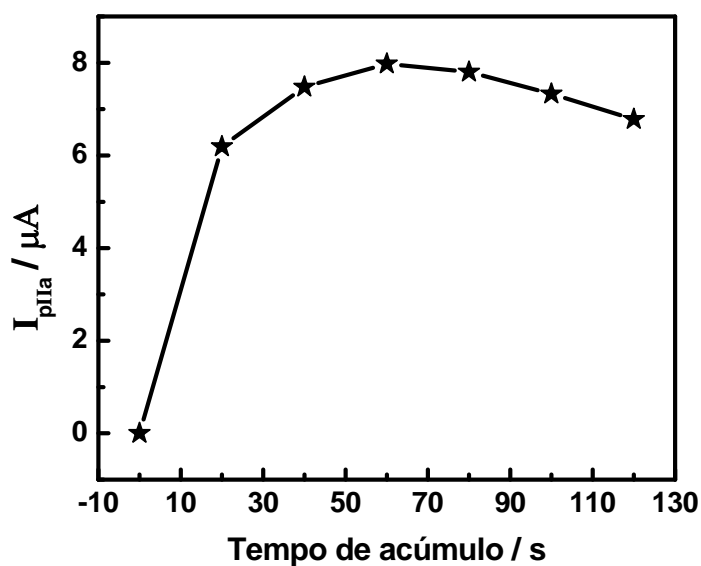


Figura 56 – Influência do tempo de acúmulo sobre a resposta voltamétrica da AMX no eletrodo modificado com filme PAG:GLU (50%:50%) depois de submetido à oxidação prévia em +1,0 V. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

A análise destes valores indica que um aumento da corrente em função do aumento do tempo de acúmulo do fármaco até 60 s e com uma leve diminuição em tempos superiores. Deste modo, escolheu-se $E_p = +1,0 \text{ V}$ e tempo de acúmulo de 60 s para as medidas voltamétricas posteriores.

4.5.1.2.3. INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARREDURA

A influência da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do eletrodo modificado com PAG:GLU (50%:50%) também foi estudada, no intervalo entre 10 a 100 mV s^{-1} , em solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AMX em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,2, usando pré-acúmulo durante 60 segundos a +1,0 V. Os respectivos voltamogramas são mostrados na Figura 57.

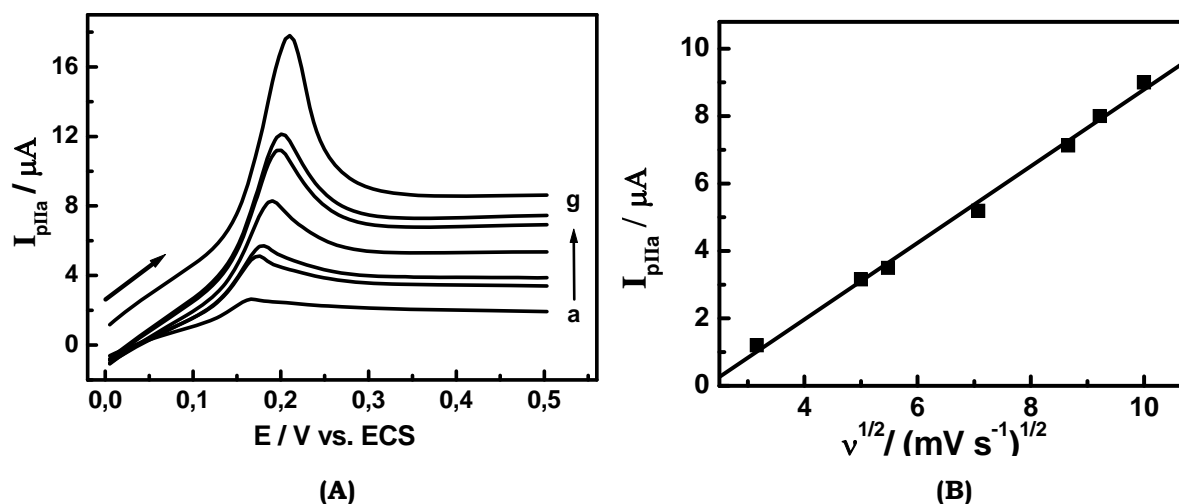


Figura 57 – (A) Influência da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do ECV modificado com filme PAG:GLU (50%:50%) em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,2 com $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AMX. Acúmulo de 60 s a + 1,0 V. (a) = 10; (b) = 25; (c) = 30; (d) = 50; (e) = 75; (f) = 85 e (g) = 100 mV s^{-1} . **(B)** Relação de I_{pIIa} vs. $v^{1/2}$.

Verificou-se um aumento no valor da corrente de pico anódico em função do aumento da velocidade de varredura, sendo $I_{pIIa} (\mu\text{A}) = -2,44 + 1,11 v^{1/2}$, $R = 0,99$, $n = 6$. Um deslocamento do potencial para valores mais positivo também foi observado. Nas velocidades abaixo de 50 mV s^{-1} o perfil voltamétrico não é bem definido, mas para valores maiores o pico torna-se mais definido, deste modo a velocidade de varredura adotada foi de 100 mV s^{-1} .

4.5.1.2.4. INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DOS FILMES DE PAG:GLU NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE AMX

Considerando que a reação entre PAG:GLU é responsável pela disponibilidade da quantidade de sítios livres no filme para interação com as espécies em solução e que o GLU estaria proporcionando maior aderência do filme sobre a superfície do ECV, investigou-se a seguir a melhor composição do filme usando PAG. As seguintes composições foram investigadas: 50%:50%; 62,5%:37,5%; 75%:25%; 87,5%:12,5% de PAG:GLU (v/v). A Figura 58 mostra o efeito na composição dos filmes de PAG:GLU na resposta para o pico de reoxidação (IIa) da AMX.

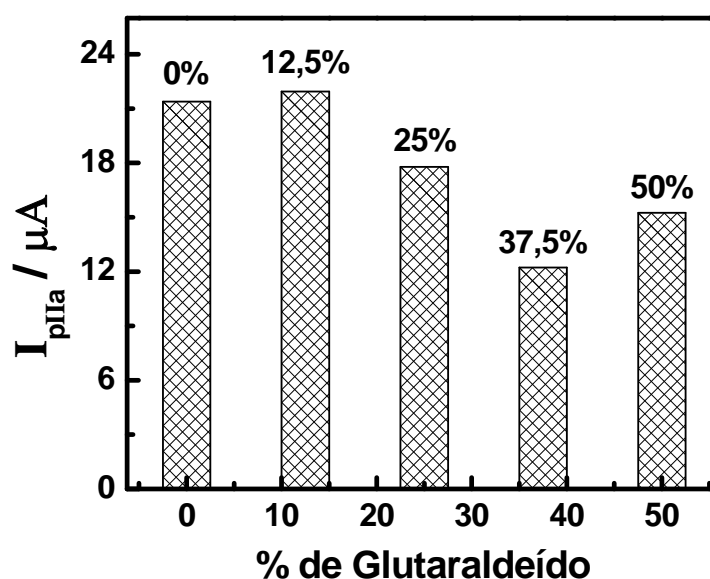


Figura 58 – Efeito da composição dos filmes de PAG:GLU na corrente de pico da oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de amoxicilina em tampão acetato pH 5,2 após acúmulo de 60 s a + 1,0 V. $v = 100$ mV s⁻¹.

Os resultados obtidos do estudo da composição dos filmes em relação ao pico de oxidação da AMX no potencial de +0,2 V após oxidação prévia no potencial de +1,0 V a 60 s, mostram que a diminuição no teor de GLU na composição dos filmes promove um aumento no valor da corrente de pico provavelmente devido ao maior número de sítios ativos do PAG disponível para a interação com o fármaco. No entanto, o filme de PAG na ausência de GLU apresenta também considerável valor da corrente de pico da AMX, mas o filme de PAG:GLU na proporção de 87,5 %:12,5% apresenta melhor aderência sobre a superfície eletródica e portanto foi adotado nas medidas posteriores.

4.5.1.2.5. CURVA ANALÍTICA PARA A AMX

4.5.1.2.5.1. VARREDURA LINEAR

Utilizando as melhores condições experimentais definidas previamente, construiu-se uma curva analítica (Figura 59) por meio de adições sucessivas da solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de AMX para sua determinação em intervalo de concentração entre $1,0 \times 10^{-6}$ a $2,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

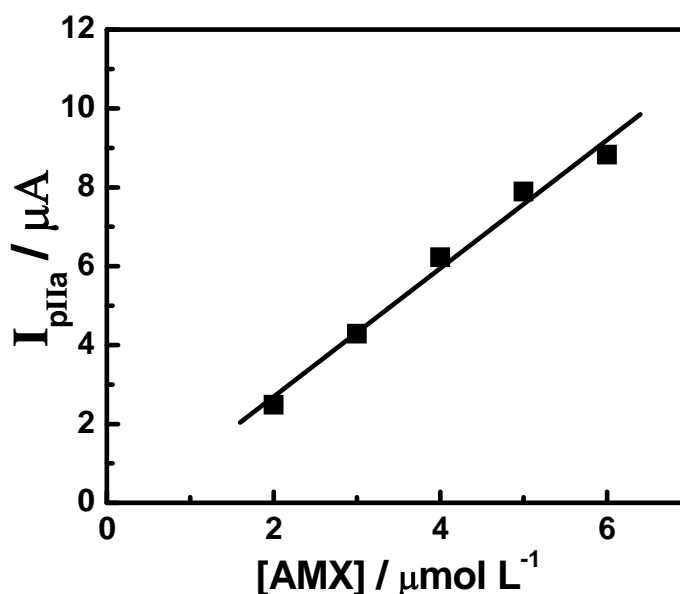


Figura 59 – Curva analítica obtida para a AMX no eletrodo modificado com PAG:GLU (87,5%:12,5%) em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Uma relação linear é obtida no intervalo de concentração entre 2,0 a 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um coeficiente de correlação de 0,993, de acordo com a equação: $I_{pIIa} (\mu\text{A}) = -0,57 + 1,63 C$ ($C = \mu\text{mol L}^{-1}$) para $n = 5$. Em concentrações superiores a 7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a corrente aumenta menos acentuadamente em função da concentração de AMX, sugerindo saturação dos sítios ativos disponíveis no filme de PAG. O limite de detecção [$3 \times (\text{desvio padrão do branco})/\text{sensibilidade}$] foi de $8,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

4.5.1.2.5.2. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

A seguir investigou-se a aplicação da técnica de voltametria de onda quadrada no intuito de melhorar o limite de detecção do método. Um voltamograma típico de onda quadrada registrado sobre ECV modificado PAG:GLU (87,5%:12,5%) no intervalo de $-0,2$ a $+0,5 \text{ V vs. ECS}$ para AMX pré-oxidada em $E_p = +1,0 \text{ V}$ durante 60 s em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 é mostrado na Figura 60. As condições utilizadas foram: frequência de 10 Hz, amplitude de pulso de 50 mV e incremento de potencial de 2,0 mV.

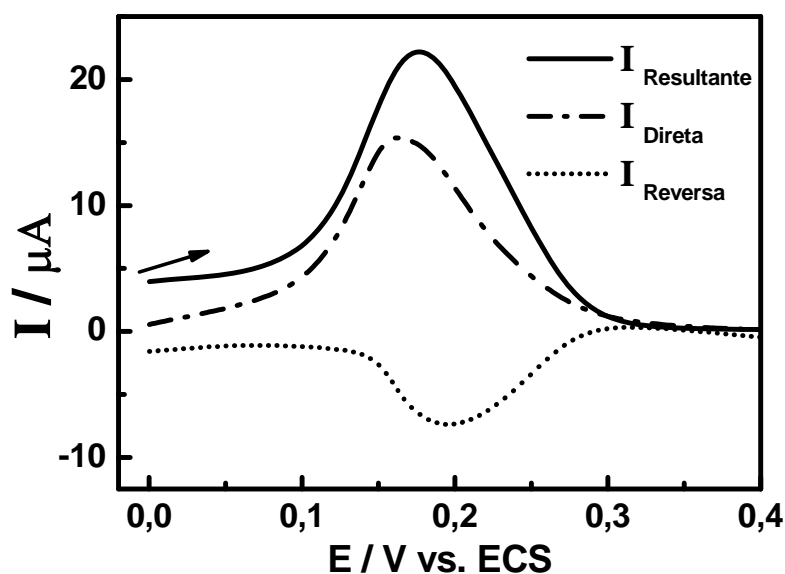


Figura 60 - Voltamograma de onda quadrada obtido para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AMX em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 sobre ECV modificado com filme PAG:GLU (87,5%:12,5%) após acúmulo de 60s a + 1,0 V. $f = 10$ Hz, $\Delta E = 50$ mV e $\Delta E_s = 2,0$ mV.

Os estudos de amplitude de pulso, frequência e incremento de potencial foram realizados para uma melhor otimização das condições experimentais na determinação de AMX por voltametria de onda quadrada após pré-acúmulo durante 60 s sob potencial de +1,0 V.

A influência da amplitude de pulso foi investigada no intervalo de 10 a 100 mV, empregando primeiramente uma frequência de 25 Hz. A corrente aumenta em função do aumento da amplitude de pulso (Figura 61), bem como ligeiros deslocamentos no potencial de pico são observados para valores menos positivos.

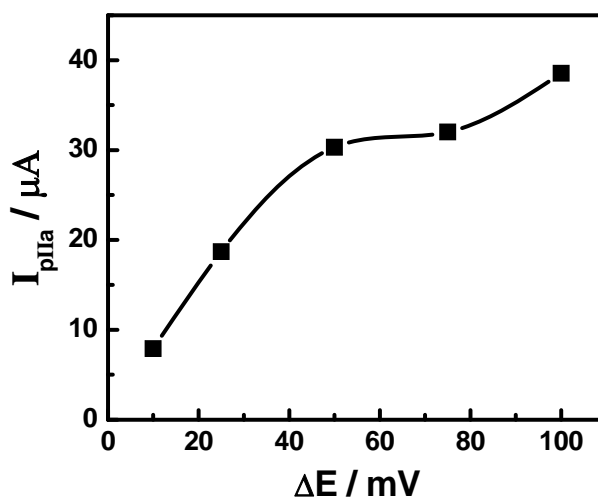


Figura 61 - Efeito da amplitude de pulso sobre os voltamogramas de onda quadrada registrados para o eletrodo de PAG:GLU (87,5%:12,5%) em solução tampão acetato

0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 contendo 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de AMX sem (1) e após acúmulo de +1,0 V a 60 s. $f = 25$ Hz e $\Delta E_s = 2,0$ mV.

A Figura 61 indica que a variação da amplitude de pulso aumenta a corrente de pico de forma linear entre 10 a 50 mV, a qual foi escolhida por apresentar alta intensidade de corrente sem deformação da onda.

Visando as melhores condições na determinação da AMX investigou-se também à influência da frequência no intervalo de 10 a 75 Hz aplicando uma amplitude de pulso de 50 mV e 2,0 mV no incremento de potencial. Os dados obtidos são apresentados na Figura 62.

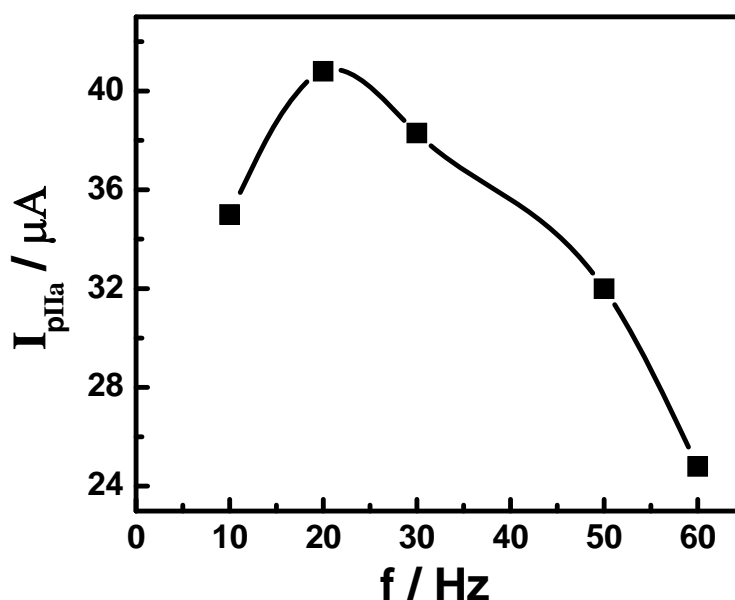


Figura 62 - Voltamogramas obtidos para o ECV modificado com filme PAG:GLU (87,50%:12,5%) em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 contendo 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de AMX após acúmulo de +1,0 V a 60 s na variação da frequência: (a) =10; (b) =20; (c) =30; (d) = 50 e (e) = 75 Hz. $\Delta E = 50$ mV e $\Delta E_s = 2,0$ mV.

Os resultados apresentados na Figura 62 mostra que a partir de 20 Hz há um decréscimo da corrente de pico devido a grande influência da corrente capacitiva que aumenta consideravelmente com o aumento da frequência. Sendo assim a frequência adotada foi de 20 Hz, pois apresentou a maior variação de corrente e um perfil bem definido.

Baseado nos parâmetros estudados construiu-se a curva analítica para o pico de reoxidação da AMX em +0,2 V após pré-tratamento em +1,0 V por 60 s usando a técnica de voltametria de onda quadrada. Os respectivos voltamogramas obtidos são mostrados na Figura 63A e na Figura 63B a curva analítica correspondente.

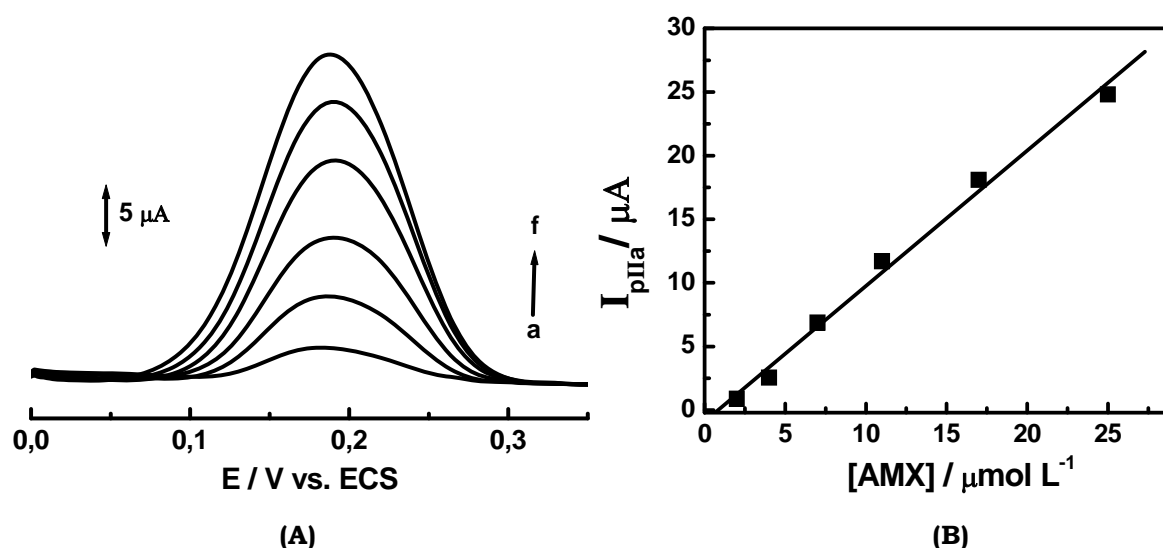


Figura 63 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a AMX no ECV modificado com filme PAG:GLU (87,5%:12,5%) em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2 em diferentes concentrações: a = 4,0; b = 7,0; c = 11,0; d = 17,0; e = 25,0 e f = 37,0 (μmol L⁻¹). f = 20 Hz, ΔE = 50 mV e ΔE_s = 2,0 mV. **(B)** Curva analítica.

Uma relação linear entre a corrente de pico e a concentração de AMX foi obtida no intervalo de 2,0 a 25 μmol L⁻¹, seguindo a equação: $I_{pIIa} (\mu A) = -0,89 + 1,07 C$ ($C = \mu mol L^{-1}$) $R = 0,99$ e $n = 6$. O limite de detecção [$3 \times$ (desvio padrão do branco)/sensibilidade] foi de $9,2 \times 10^{-7} mol L^{-1}$ (Figura 63).

4.5.1.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRA DE URINA

A aplicação do método desenvolvido em amostra de urina humana foi realizada após a coleta do material biológico, tratado conforme descrito na parte experimental. Uma alíquota de 120 μL da amostra de urina fortificada com $1,0 \times 10^{-3} mol L^{-1}$ de AMX foi adicionada à célula eletroquímica contendo apenas tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2, com concentração final de 6,0 μmol L⁻¹, ou seja, 2,5mg L⁻¹. O eletrodo modificado foi imerso na célula e submetido ao tempo de acúmulo de +1,0 V por 60 s. A seguir registrou-se o voltamograma de onda

quadrada mostrado na curva 1 da Figura 64 com o potencial de pico da AMX em +0,18 V. Posteriormente, foram adicionadas quantidades de AMX à célula eletroquímica segundo o método da adição de padrão (curvas 2, 3 e 4 da Figura 64). Entre cada adição de AMX o ECV com filme PAG:GLU (87,5%:12,5%) foi submetido ao pré-tratamento no potencial de +1,0 V por 60 s.

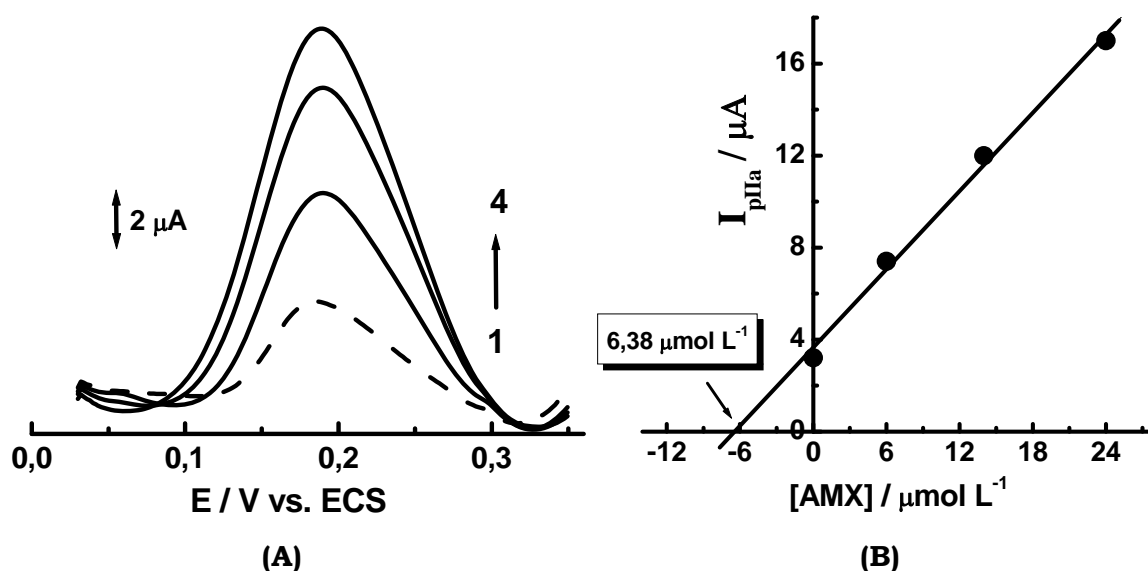


Figura 64 - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para (1) amostra de urina humana fortificada com 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMX; adições de padrão: (2) 6,0; (3) 14,0 e (4) 24,0 mg L^{-1} de AMX. (B) Curva da adição do padrão AMX.

Como podemos observar na Figura 64A, as correntes de pico aumentam proporcionalmente com as adições do padrão AMX. O ECV modificado com filme PAG:GLU (87,5%:12,5%) pode ser usado na determinação de AMX em amostra de urina pelo método da adição de padrão (Figura 64B). Este resultado mostra que o método proposto é viável para a determinação de AMX em amostra de urina humana, uma vez que após sua administração aproximadamente 60 a 70% é excretado em sua forma ativa (FURP – AMOXICILINA, 2007), com um nível de 300 a 350 mg L^{-1} . Desta forma o método se mostra adequado para fins analíticos, com recuperação média de 106,6% e desvio padrão de 2,52% para $n = 3$.

4.5.1.4. COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO POR ESPECTROFOTOMÉTRIA PARA DETERMINAÇÃO DE AMX EM AMOSTRA DE URINA

Para comparar o desempenho da metodologia proposta na determinação de AMX em amostra de urina humana, foi aplicado o método espectrofotométrico na região do UV-vis.

Segundo García-Reiriz, Damiani e Olivieri (2007) a AMX pode ser determinada na região do UV-vis após 15 minutos de reação com sulfato de cobre em meio ácido (pH 5,7). O mecanismo da hidrólise catalítica do íon Cu com a AMX envolve uma reação rápida produzindo um intermediário com uma estrutura provavelmente deslocada para a região do infravermelho em relação à absorção da AMX, seguido então de uma reação lenta com um produto final, o qual absorve em 325 nm devido à formação do complexo com os íons cobre.

A Figura 65 apresenta os espectros de UV-vis com a respectiva curva analítica para o antibiótico AMX na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A linearidade foi obtida em toda a faixa de concentração investigada com um coeficiente de correlação de 0,99, segundo a equação: $Abs = \epsilon b C = 0,007 + 0,005 C$, onde: Abs = absorvância (323 nm), ϵ = absortividade molar, b = caminho óptico e C = concentração de AMX em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

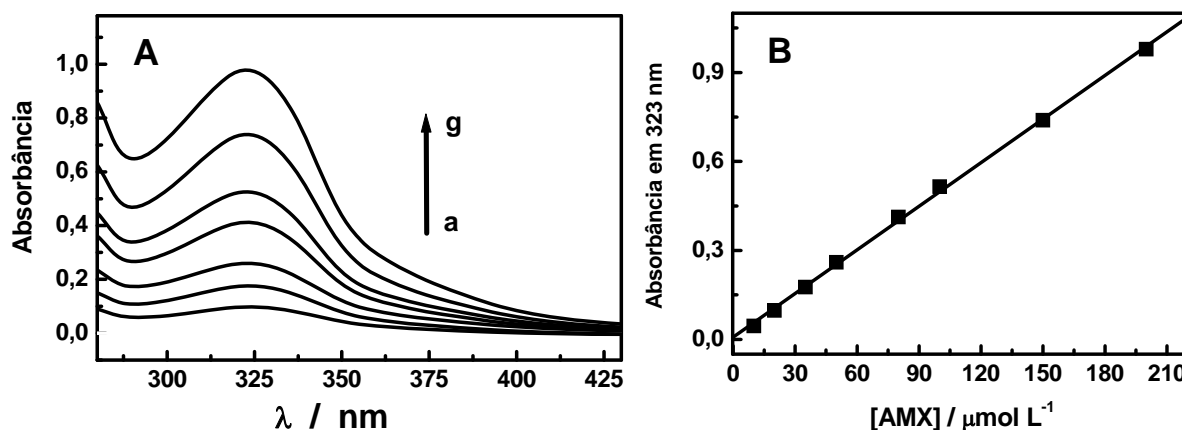


Figura 65 – **A)** Espectros de absorção da AMX em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,4 em diferentes concentrações: (a) 20; (b) 35; (c) 50; (d) 80; (e) 100; (f) 150 e (g) 200 ($\mu\text{mol L}^{-1}$). **B)** Curva analítica.

Após a obtenção da curva analítica para a determinação de AMX em $\lambda = 323$ nm pelo método espectrofotométrico, determinou-se a AMX em amostra de

urina humana pelo método da adição do padrão, conforme resultados mostrados na Figura 66.

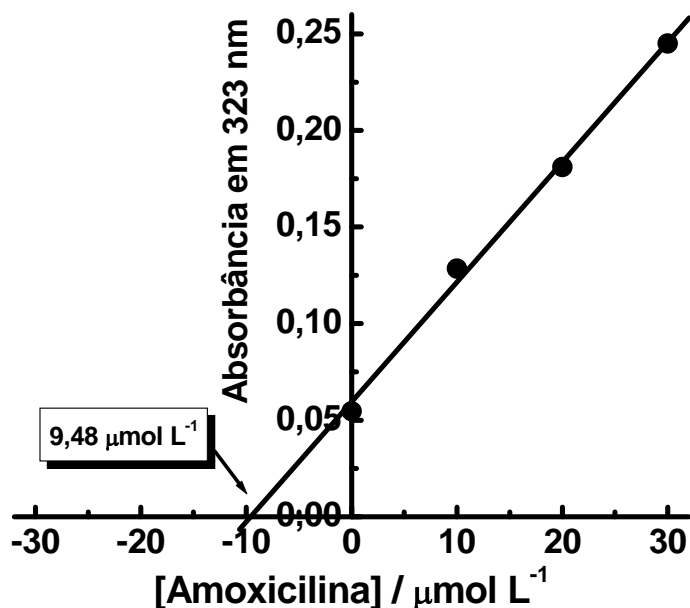


Figura 66 - Curva da adição do padrão AMX dos espectros obtidos de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AMX em amostra de urina humana. Adições de AMX: $10,0$; $20,0$ e $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Os dados espectrofotométricos obtidos reportam valores de recuperação de 94,8%, sendo a equação da reta correspondente igual: $\text{Abs}(323 \text{ nm}) = \epsilon bC = 0,06 + 0,006 C (\mu\text{mol L}^{-1})$, $R = 0,99$ e $n = 4$.

Os resultados do método proposto e espectrofotométrico para a determinação de AMX em amostra de urina foram comparados conforme os dados apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados obtidos para a determinação de AMX em amostra de urina.

Método	AMX adicionada	AMX encontrada	Recuperação* (%)
Voltamétrico (Proposto)	$6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$	$6,4 \mu\text{mol L}^{-1}$	$106,6 \pm 2,5$
Espectrofotométrico	$10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$	$9,5 \mu\text{mol L}^{-1}$	$96,2 \pm 1,4$

*(n = 3).

Pelos dados da Tabela 10 o método proposto utilizando eletrodo modificado com o poli aminoácido e a metodologia espectrofotométrica usada como metodologia comparativa comprovam ser viáveis para a aplicação em materiais biológicos.

4.5.2. DOXORRUBICINA (DXR)

4.5.2.1. OXIDAÇÃO DA DXR SOBRE ECV

O comportamento voltamétrico da DXR foi investigado em solução $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR tampão B-R $0,04$ mol L⁻¹ pH 5,0, conforme voltamograma apresentado na Figura 67. Sua estabilidade em solução é dependente do pH, sendo instável em pH menor que 3,0 e maior que 7,0 [Fármacos utilizados em neoplasia, 2007].

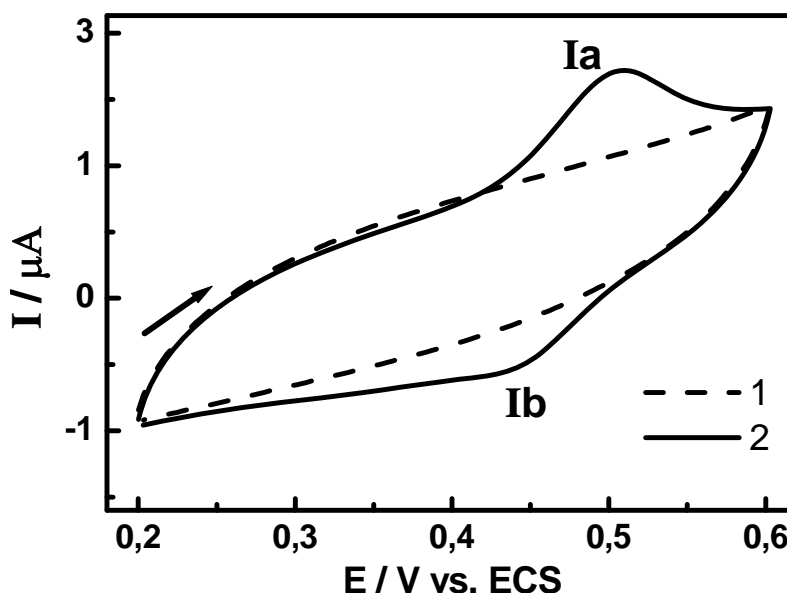
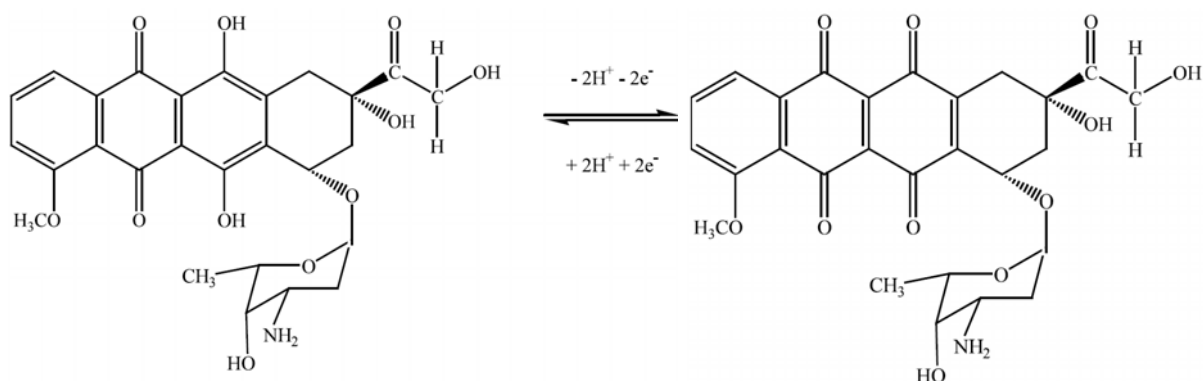


Figura 67 – Voltamogramas cíclicos sobre ECV em solução tampão B-R $0,04$ mol L⁻¹ pH 5,0 na ausência (1) e na presença (2) de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR. $v = 50$ mV s⁻¹

Pelo voltamograma cíclico apresentado na Figura 67 podemos observar um pico de oxidação em +0,50 V (Ia) e um pico reverso em +0,44 V (Ib), atribuído à oxidação do grupo funcional 6,11 diidroquinona presente na estrutura da DXR (Figura 9) para a forma quinona correspondente, processo o qual envolve dois elétrons e dois prótons conforme mostra o Esquema 7 proposto por Komorsky-Lovric (2006) e Brett et al. (2002).



Esquema 7 – Mecanismo para oxidação da DXR sobre ECV em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5. [BRETT, et al. 2002].

Os parâmetros voltamétricos obtidos dos voltamogramas cíclicos registrados para a DXR sob velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em diferentes valores de pH são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Efeito da variação de pH sobre a oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR em solução tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ sobre ECV. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

pH	E_{pa} (mV)	I_{pa} (μA)
3	700	0,3
4	610	0,3
5	500	0,9
6	480	0,1
7	440	0,1

Pelos dados apresentados na Tabela 11 a oxidação da DXR sobre o ECV é melhor definida em valor de pH 5,0; onde maior intensidade de corrente é observado. Em pH = 5,0 a DXR apresenta comportamento de processo reversível com valores de $E_{pa} - E_{pc} = 60 \text{ mV}$. No entanto, entre valores de $\text{pH} \leq 4,0$ e $6,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$, o comportamento da DXR sobre ECV convencional é diferenciado e apresenta perda de reversibilidade do processo.

4.5.2.2. OXIDAÇÃO DA DXR SOBRE ECV MODIFICADO COM FILMES DE PAG:GLU

A Figura 68 compara os voltamogramas cíclicos obtidos para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 sobre ECV antes e após modificação com filmes PAG:GLU (curva 1 e 2 da Figura 68).

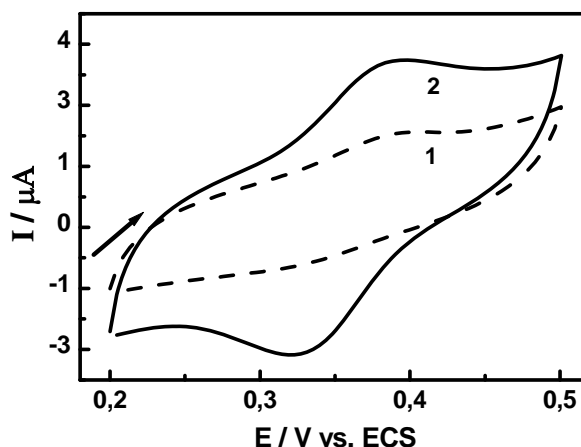


Figura 68 – Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 sobre ECV (1) antes e (2) após modificação com filmes de PAG:GLU. $v = 50$ mV s⁻¹.

No eletrodo modificado (curva 2 da Figura 68) observou-se também um par de pico em $E_{pa} = +0,38$ V e $E_{pc} = +0,32$ V, devido à oxidação das hidroquinonas presentes no anel B da DXR (Figura 9). Uma variação de $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 60$ mV é obtido, indicando que provavelmente no filme de PAG:GLU, a DXR é oxidada via transferência de 1 elétron.

Ambos os voltamogramas foram registrados quando os eletrodos foram imersos em soluções de DXR $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. Como pode ser observado, o par de pico característico do comportamento redox da DXR apresenta maior intensidade de corrente no eletrodo com filme de PAG:GLU, indicando que a oxidação da DXR na superfície do eletrodo é favorecida devido ao efeito de pré-concentração ou porque favorece o processo de transferência eletrônica. Do mesmo modo, observa-se um aumento do pico catódico na varredura reversa de potencial em relação ao voltamograma registrado no eletrodo convencional, sugerindo que a reversibilidade do processo de transferência de elétrons da DXR está sendo melhorada na superfície do eletrodo modificado com filme de PAG, uma vez que o produto de oxidação poderia estar sendo estabilizado pelo filme de PAG:GLU.

Estes resultados concordam com Baldwin, Packett e Woodcock (1981) que sugerem que a oxidação voltamétrica da DXR sobre eletrodo de pasta de carbono pode ocorrer via formação do intermediário semiquinona. A comparação entre os processos do ECV antes e após modificação com filme PAG:GLU indica claramente que no filme o intermediário semiquinona é estabilizado após transferência de 1 elétron, o qual é responsável pelas características de processo reversível observada para o comportamento da DXR.

A seguir, investigou-se a influência do pH na resposta da corrente de pico e do potencial de pico para o processo de oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR em tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ sobre ECV modificado por filmes de PAG:GLU. Os resultados obtidos do estudo de pH de 3,0 a 7,0 são apresentados na Tabela 11.

Os valores da razão i_{pa}/i_{pc} mostrados na Tabela 11 foram determinados segundo o método proposto por Nicholson (BARD; FAULKNER, 1980), o qual utiliza a equação 3 descrita a seguir:

$$\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = \frac{(i_{pa})_0}{i_{pc}} + \frac{0,485(i_{sp})_0}{i_{pc}} + 0,086 \quad (\text{eq. 3})$$

Onde: $(i_{pa})_0$ corresponde a corrente anódica com relação ao zero (não corrigida) e $(i_{sp})_0$ corresponde a corrente em relação ao zero no potencial de inversão da varredura.

Tabela 12 – Efeito da variação de pH em tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ para a oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR sobre ECV modificado com filmes PAG:GLU.

pH	E_{pa} (mV)	I_{pa} (μ A)	E_{pc} (mV)	$-I_{pc}$ (μ A)	ΔE_p (mV)	I_{pa}/I_{pc} (μ A)
3	700	5,3	430	6,8	270	1,0
4	610	1,4	470	1,9	140	1,0
5	540	3,0	400	4,5	140	1,0
6	460	1,5	340	1,6	100	1,1
7	380	0,7	320	0,8	60	1,2

Os voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de DXR em diferentes valores de pH, mostram um par de pico redox característico da oxidação da DXR, no intervalo de pH de 3,0 a 7,0, confirmando a importância do filme na reversibilidade do processo e estabilização do radical cátion formado, conforme valores apresentados na Tabela 12. Este pode então sofrer nova perda de elétron, o qual é protonado rapidamente formando o produto final 6,11-diquinona, envolvendo no processo global 2 prótons e 2 elétrons, conforme método proposto por Brett et al. (2002). No entanto, a reversibilidade do sistema observada para oxidação da DXR sobre o filme de PAG:GLU indica que provavelmente o filme está estabilizando o radical semiquinona e não estaria ocorrendo a geração da quinona correspondente no processo.

O efeito da variação de pH no comportamento da DXR sobre o ECV após modificação pelo filme PAG:GLU, em função dos potenciais de pico anódico é mostrado na Figura 69.

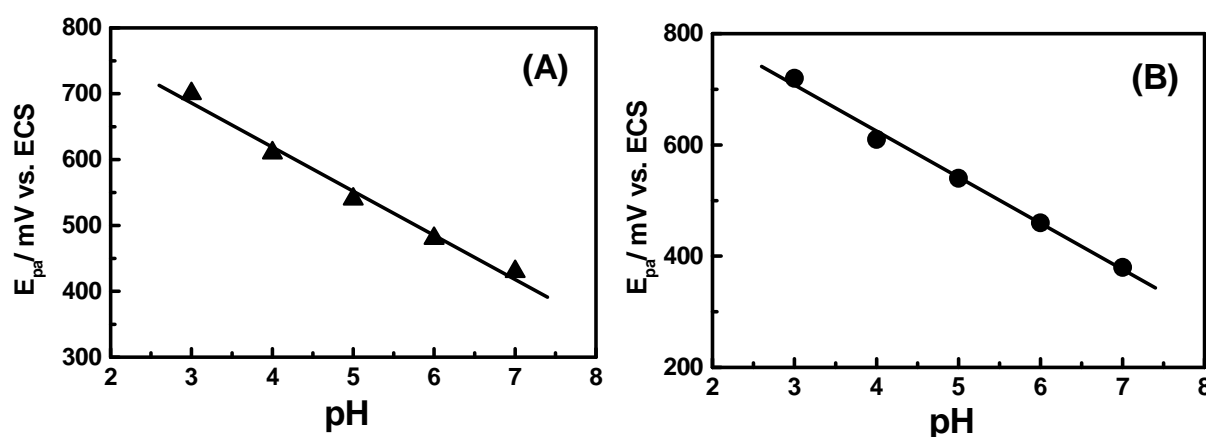


Figura 69 - Efeito da variação de pH sobre o ECV (A) antes e (B) após modificação com filme PAG:GLU para a oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR nos potenciais de pico anódico. $v = 50$ mV s⁻¹.

Pelos dados da Figura 69, pode-se observar que os valores dos potenciais de pico anódico deslocaram-se para valores menos positivos com o aumento do pH para o eletrodo modificado, confirmando a forte dependência do pH na oxidação da DXR. Zhang e Li (2000); Brett, Piedade e Chiorcea (2002); também relatam a influência do pH no comportamento voltamétrico da DXR.

A relação de E_p vs. pH segue uma relação linear no intervalo de $3,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$, tanto para o ECV convencional como o modificado segundo as equações 3 e 4, respectivamente:

$$\text{(ECV): } E_{pa} \text{ (mV)} = 887 - 67,0 \text{ pH; } R = 0,993 \text{ (n = 5)} \quad (\text{eq. 3})$$

$$\text{(PAG:GLU): } E_{pa} \text{ (mV)} = 957 - 83,0 \text{ pH; } R = 0,997 \text{ (n = 5)} \quad (\text{eq. 4})$$

De acordo com a literatura (BARD; FAULKNER, 1980), o número de prótons é obtido da relação $\Delta E_p / \Delta \text{pH} = 59 \text{ mV}^+ / n e^-$, onde pelos valores do coeficiente angular apresentados nas equações 3 e 4 para o ECV antes e após modificação, obtém-se o número de prótons envolvidos no sistema é de aproximadamente 1 para ambos os eletrodos. Assim os resultados obtidos para o comportamento da DXR sobre o ECV convencional e modificado com filmes de PAG estão concordantes com os trabalhos encontrados na literatura.

Assim, o comportamento voltamétrico da DXR sobre ECV convencional e modificado por filmes PAG:GLU estão concordantes, comprovando a possível estabilização do radical semiquinona pelo filme PAG:GLU, melhorando a reversibilidade e sensibilidade na determinação de DXR.

O efeito do pH sobre os valores da corrente de pico anódica da DXR sobre ECV antes e após modificação com filmes de PAG:GLU em diferentes valores de pH são mostrados na Figura 70.

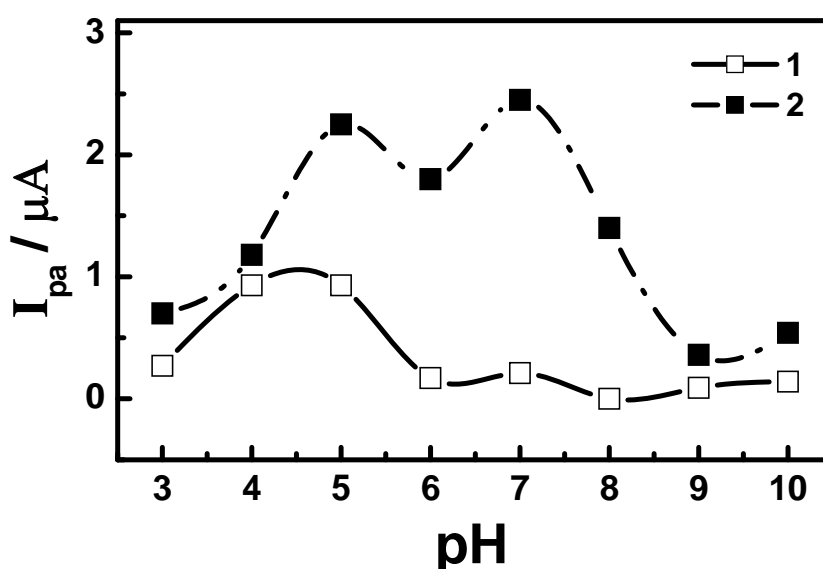


Figura 70 - Efeito da variação de pH observado para a oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR sobre ECV antes (1) e após (2) modificação com filmes de PAG:GLU na intensidade das correntes de pico anódica (I_{pa}). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A análise da Figura 70 mostra que a corrente de pico é fortemente dependente do pH. O filme de PAG promove um aumento no valor da corrente de pico no intervalo de $4,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$, intervalo no qual pode estar ocorrendo uma interação eletrostática entre o grupo amina do resíduo de açúcar da DXR ($\text{p}K_a = 8,2$) e o grupo carboxílico do PAG carregado negativamente ($\text{p}K_a = 4,2$). Esta interação também foi observada por Zhang e Li (2000) na interação da DXR com o DNA. Para valores de pH menor que 3,0 e maior que 7,0 a DXR torna-se instável, uma vez que sua estabilidade é dependente do pH [Fármacos utilizados em neoplasia, 2007].

A seguir, investigou-se as melhores condições experimentais para pré-concentração e monitoramento do sinal analítico da DXR sobre eletrodo modificado por filmes de PAG:GLU, visando desenvolver um método analítico para determinação do fármaco.

4.5.2.2.1. INFLUÊNCIA DO ELETRÓLITO SUPORTE

A seguir avaliou-se a influência do eletrólito suporte no valor da corrente de pico, para uma solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR utilizando-se tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ambos pH 7,0. A Figura 71 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para as diferentes soluções tampões.

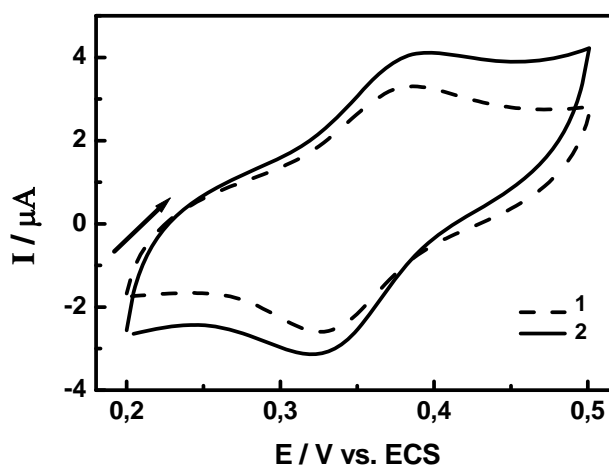


Figura 71 - Voltamogramas cíclicos obtidos do eletrodo de carbono vítreo modificado com filmes de PAG em $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR (1) tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e (2) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Pode-se observar pelas curvas da Figura 71, que para ambos os eletrólitos não ocorre deslocamento dos potenciais de pico anódico e catódico em +0,38/0,32 V, mas a intensidade de corrente é melhorada quando em tampão fosfato, sendo este o eletrólito suporte escolhido para as investigações posteriores.

4.5.2.2.2. INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARREDURA (v)

A influência da velocidade de varredura de potencial sobre a resposta voltamétrica do eletrodo modificado com filmes PAG:GLU também foi estudada, no intervalo entre 10 e 100 mV s^{-1} , no intervalo de potencial de +0,2 a +0,5 V. A relação entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade é mostrada na Figura 72.

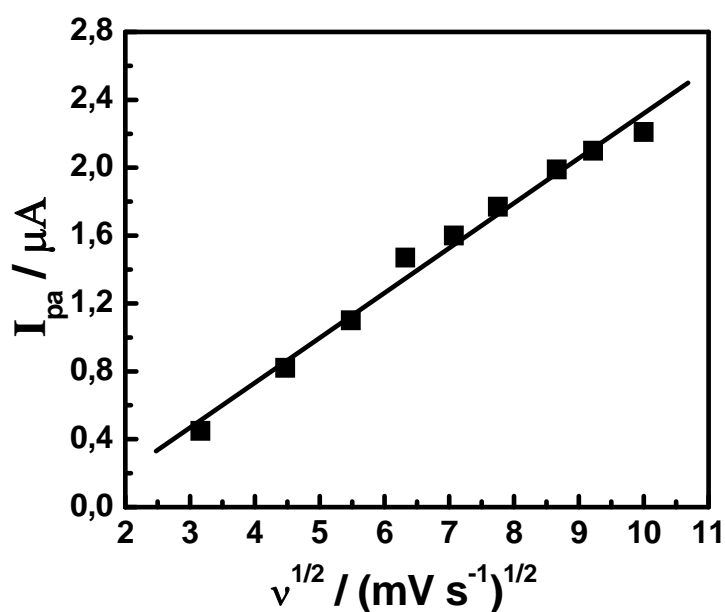


Figura 72 – Gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$ obtido em solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 sobre ECV modificado com filme PAG:GLU.

Pelos dados apresentados Figura 72 verifica-se que a corrente de pico anódica aumenta gradativamente com a raiz quadrada da velocidade de varredura sugerindo uma oxidação controlada por difusão através do filme. Os parâmetros voltamétricos obtidos dos voltamogramas cíclicos estão apresentados na Tabela 13. A velocidade de varredura escolhida para fins analíticos foi de 50 mV s^{-1} .

Tabela 13 – Parâmetros voltamétricos obtidos de voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades para oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 sobre ECV modificado com filmes PAG:GLU.

v (mV s ⁻¹)	I_{pa} (μ A)	E_{pa} (mV vs. ECS)	$-I_{pc}$ (μ A)	E_{pc} (mV vs. ECS)	$I_{pa}/-I_{pc}$ (μ A)
10	0,4	377	0,4	342	1,0
20	0,7	381	0,9	337	1,0
30	1,0	381	1,3	333	1,1
40	1,4	386	1,8	328	1,1
50	1,5	390	2,1	324	1,1
60	1,6	395	2,5	324	1,1
75	1,7	395	2,8	320	1,2
85	1,8	399	3,4	315	1,2
100	1,8	404	3,7	311	1,3

4.4.2.2.3. ESTABILIDADE DO FILME PAG:GLU

A capacidade de pré-concentração da DXR no filme de PAG foi investigada em uma solução $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ por ciclagem eletroquímica (20 ciclos) e sob circuito aberto. A ciclagem eletroquímica foi realizada em uma solução $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 no intervalo de potencial de +0,2 a +0,5 V ($v = 50$ mV s⁻¹) por 20 ciclos. Em circuito aberto a DXR foi incorporada controlando o tempo de imersão do eletrodo modificado em solução $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DXR em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. Em ambos os casos, o eletrodo após lavagem com água foi transferido para uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. Os voltamogramas cíclicos registrados após 20 ciclos na solução de DXR e após imersão no eletrólito suporte são mostrados na Figura 73.

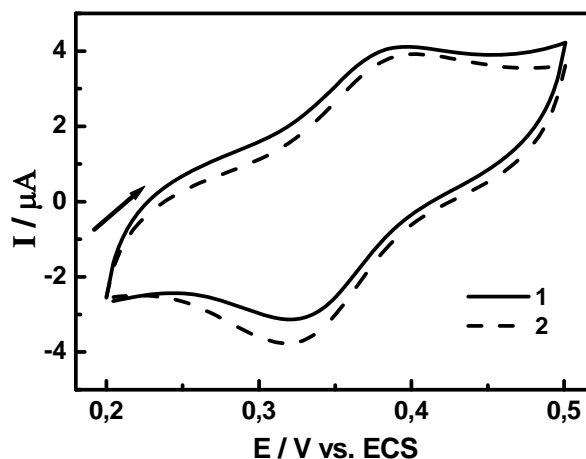


Figura 73 – Voltamogramas cíclicos obtidos para ECV modificado com filme PAG:GLU em (1) solução $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} de DXR tampão fosfato $0,1$ mol L^{-1} pH 7,0 após ciclagem de 20 ciclos e (2) no eletrólito suporte. $v = 50$ mV s^{-1} .

Os voltamogramas cíclicos obtidos do eletrodo modificado imerso no eletrólito suporte registrados após incorporação da DXR apresentam características similares ao verificado para o eletrodo modificado imerso diretamente na solução de DXR, conforme representado na Figura 73.

Os voltamogramas cíclicos obtidos para a pré-concentração da DXR sobre ECV modificado com filme PAG:GLU após 20 ciclos sucessivos são mostrados na Figura 74A.

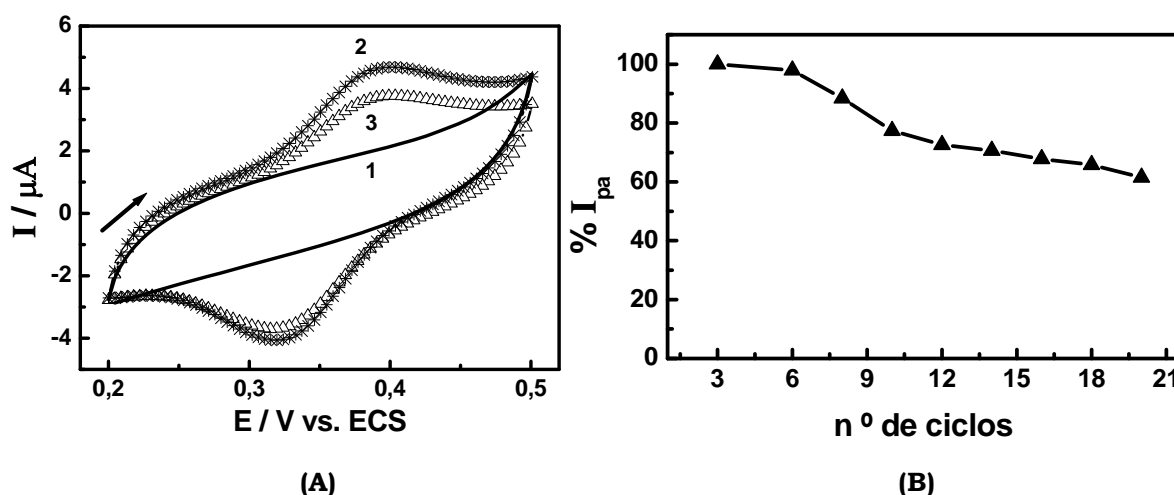


Figura 74 – (A) Voltamogramas cíclicos da pré-concentração por ciclagem sucessiva (20 ciclos) de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} em tampão fosfato $0,1$ mol L^{-1} pH 7,0 de DXR no ECV modificado com filme PAG:GLU. (1) = eletrólito suporte; (2) 3° ciclo e (3) 20° ciclo. (B) Gráfico $\%I_{pa}$ vs. n° de ciclos $v = 50$ mV s^{-1} .

Como observado na Figura 74 os valores da corrente de pico são quase inalterados e sem deslocamento significativo nos potenciais de pico anódico e catódico da DXR sobre o eletrodo modificado. Este comportamento indica que o uso de eletrodo modificado com filme de PAG retêm fortemente a droga na superfície eletródica, atingindo uma perda de apenas 2% nas primeiras 6 varreduras e 38,6% após 20 ciclos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0; conforme podemos verificar na Figura 74B. Deste modo, o eletrodo poderia ser utilizado com até seis repetições.

A pré-concentração de DXR sob circuito aberto foi investigada, imergindo o eletrodo modificado com filme PAG:GLU em uma solução de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ sob agitação branda por um tempo de 0 a 360 segundos. O eletrodo foi então removido, lavado e transferido para a célula voltamétrica contendo somente tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, cujo os voltamogramas cíclicos obtidos são mostrados na Figura 75A. O gráfico que ilustra os valores de corrente *vs.* tempo de acúmulo é mostrado na Figura 75B.

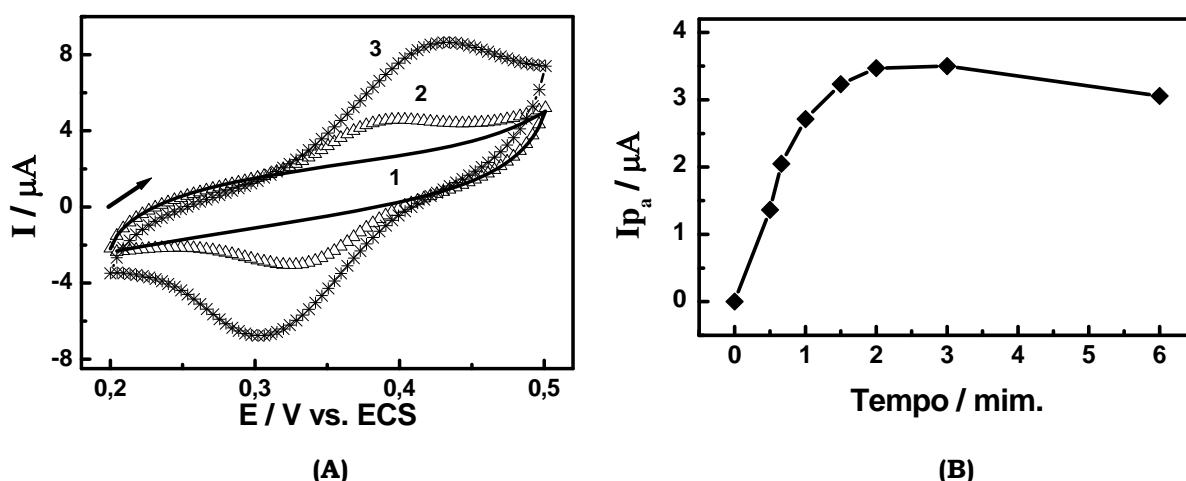


Figura 75 - (A) Voltamogramas cíclicos do ECV modificado com filme PAG:GLU na pré-concentração por circuito aberto de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DXR em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. (1) no eletrólito suporte, (2) após 30 segundos e (3) após 3 minutos. **(B)** Gráfico de I_{pa} *vs.* tempo de acúmulo. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se que a corrente de pico aumenta linearmente com o tempo de permanência do eletrodo na solução, alcançando um valor máximo após 3 minutos de pré-acúmulo. Estes resultados indicam que o analito é incorporado no filme sobre a superfície do eletrodo até um tempo máximo onde ocorre saturação dos sítios disponíveis.

Os resultados obtidos para a pré-concentração de DXR sobre ECV modificado com filme PAG:GLU mostram que a adsorção do fármaco sobre a superfície modificada é mais eficiente pelo método de acúmulo *in situ*, conforme proposto por Brett, Piedade e Chiorcea (2002); Chaney e Baldwin (1982). Portanto a adsorção da DXR possibilita a aplicação do EQM com filme de PAG:GLU na determinação de DXR sob tempo controlado de 3 minutos de acúmulo para fins analíticos.

Considerando que algumas vezes o modo de varredura utilizado permite ampliação da potencialidade analítica do método pela maior sensibilidade, investigou-se a seguir a resposta da DXR sobre eletrodos modificados por filmes de PAG:GLU usando a técnica de voltametria de onda quadrada que é uma técnica que apresenta maior sensibilidade que a técnica de voltametria cíclica.

Um voltamograma típico de onda quadrada correspondente à oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sobre ECV modificado com filme PAG:GLU na superfície do ECV em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 é mostrado na Figura 76, utilizando $f = 20$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$.

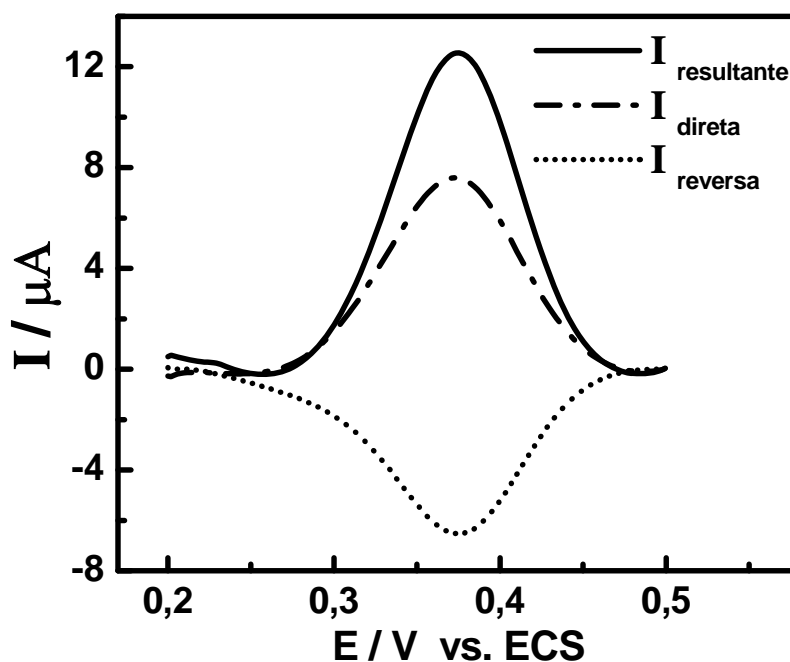


Figura 76 - Voltamogramas de onda quadrada de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 no eletrodo modificado com PAG:GLU (87,5%:12,5%). $f = 20 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$.

O pico de oxidação é observado em +0,37 V, cuja intensidade de corrente de pico mostrou-se 10 vezes superior quando comparada à voltametria cíclica ou varredura linear.

Estudos de frequência e amplitude de pulso foram realizados para otimizar as melhores condições experimentais para a técnica de voltametria de onda quadrada na determinação de DXR.

A Figura 77 mostra a influência frequência em relação ao pico de oxidação da DXR para uma solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, sob amplitude de pulso de 50 mV e incremento de potencial de 2,0 mV, porém submetido a variação de frequência entre 8 a 75 Hz.

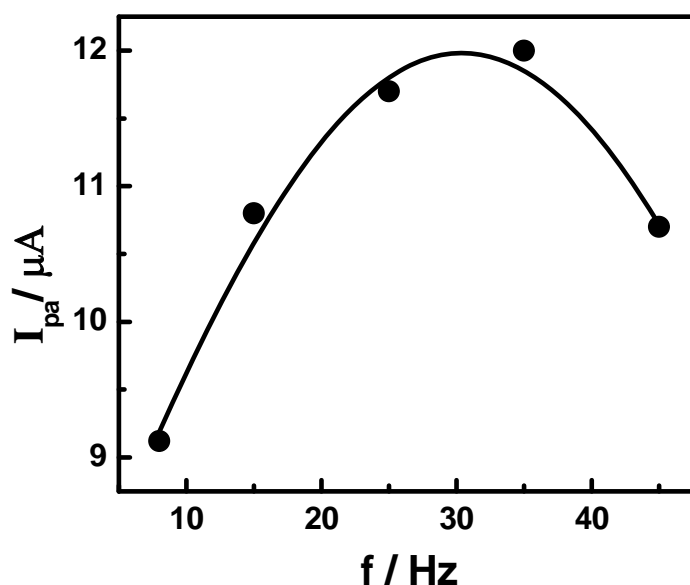


Figura 77 – Influência da variação da f sobre o pico de oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 no ECV modificado com filmes PAG:GLU. $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$.

Verifica-se que os valores da corrente de pico aumentam com o aumento da f até o valor de 35 Hz, e acima deste valor observa-se uma diminuição no valor da corrente, e os voltamogramas apresentaram uma deformação da onda com sinais de ruídos. Sendo assim a frequência adotada foi de 10 Hz, pois apresentou considerável valor de corrente e um perfil bem definido.

A influência da amplitude de pulso foi investigada no intervalo de 10 a 100 mV, empregando uma frequência de 10 Hz e incremento de potencial de 2,0 mV (Figura 78).

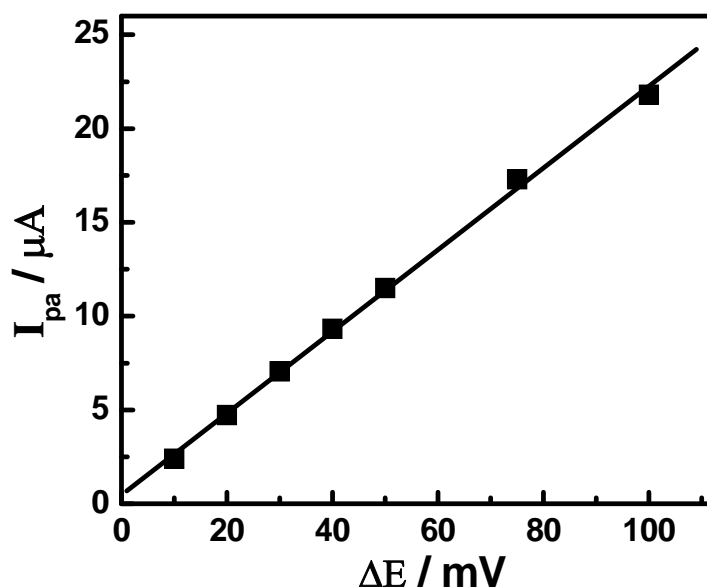


Figura 78 - Influência da variação da ΔE sobre o pico de oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 no ECV modificado com filme PAG:GLU (87,5%:12,5%). (a) = 10; (b) = 20; (c) = 30; (d) = 40; (e) = 50; (f) = 75 e (g) = 100 mV. $f = 10 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$.

Como podemos observar pelos dados apresentados na Figura 78 a corrente aumenta em função do aumento da amplitude de pulso, sendo o valor de 50 mV a amplitude de pulso escolhida por apresentar alta intensidade de corrente e pequena deformação da onda, pois acima deste valor a corrente de pico é alta, porém observaram-se deformações consideráveis nos voltamogramas.

Após a otimização dos melhores parâmetros inerentes da técnica de voltametria de onda quadrada para a determinação da DXR sobre ECV modificado foi possível a construção da curva analítica.

Adições sucessivas da solução estoque $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR para sua determinação em intervalo de concentração entre $5,0 \times 10^{-7}$ a $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram utilizadas para a construção da curva analítica, conforme dados apresentados na Figura 79. A cada adição de DXR o tempo de 3 minutos era requerido para a pré-concentração da DXR antes do registro dos voltamogramas.

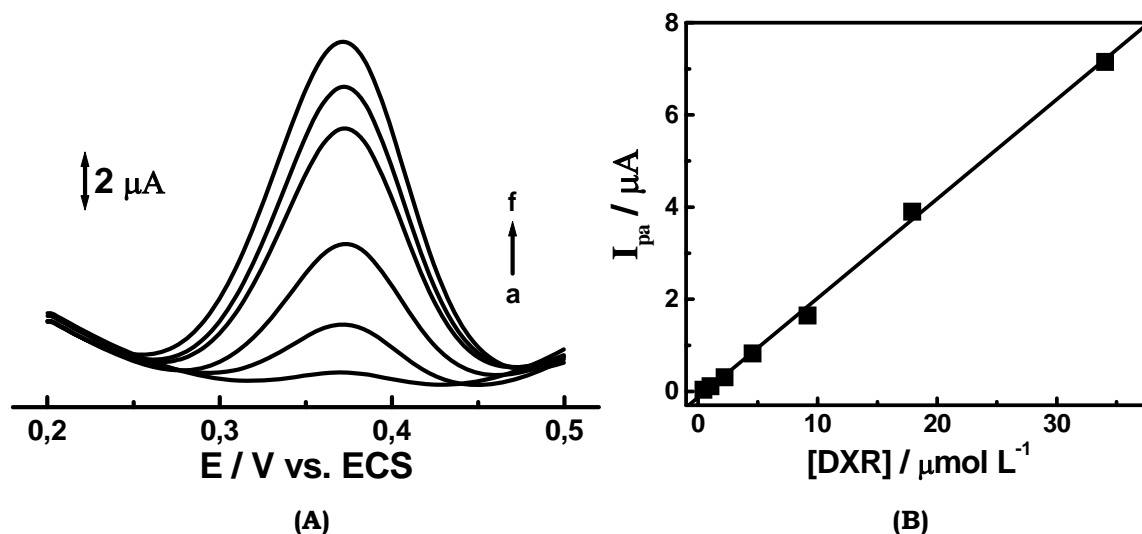


Figura 79 - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para determinação de DXR em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 em diferentes concentrações: (a) = 2,23; (b) = 9,16; (c) = 17,9; (d) = 34,0; (e) = 37,5 e (f) = 44,5 ($\mu\text{mol L}^{-1}$). **(B)** Curva analítica. $f = 10 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$.

Uma relação linear é obtida no intervalo de concentração de $1,0$ a $34,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ com um coeficiente de correlação de $0,99$ para $n = 7$ seguindo a equação: $I_{pa} (\mu\text{A}) = -0,14 + 0,22 C$ ($C = \mu\text{mol L}^{-1}$). O limite de detecção [$3 \times$ (desvio padrão do branco)/sensibilidade] foi de $4,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 79).

A seguir investigou-se a possível aplicação do método proposto utilizando ECV modificado com filme PAG:GLU para a determinação de DXR em amostra de urina humana.

4.5.2.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRA DE URINA

A aplicação do eletrodo modificado com filme de PAG:GLU para a determinação de DXR em amostra de urina humana fortificada propositalmente com o fármaco, seguida da adição de soluções do padrão foi investigada em triplicata.

O método utilizado foi a fortificação da amostra de urina com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR e uma adição de $100 \mu\text{L}$ desta urina foi transferida para a célula eletroquímica em 20 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, com concentração final de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Após o registro do voltamograma adições de 100 , 200 e $300 \mu\text{L}$ de uma solução padrão de DXR $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram realizadas, conforme mostra a Figura 80.

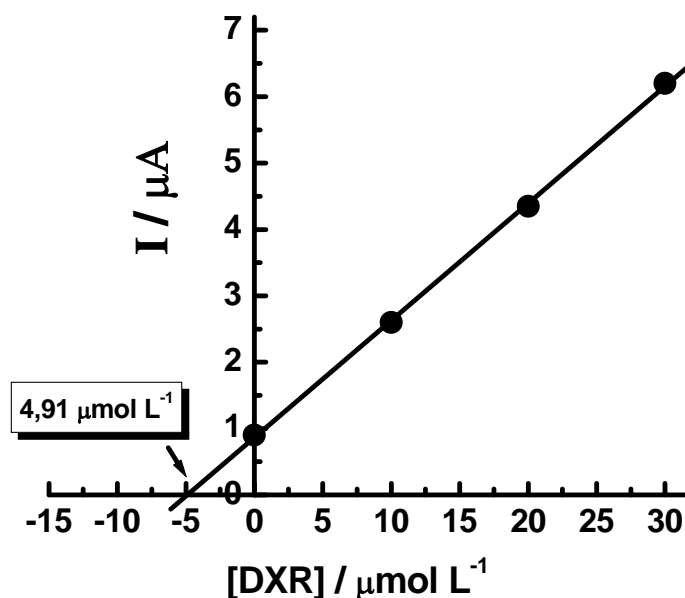


Figura 80 – Curva da adição do padrão para a determinação de DXR em amostra de urina humana fortificada com $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DXR.

Pela Figura 80 podemos observar que as adições do padrão da solução de DXR sobre a amostra de urina fortificada aumentam proporcionalmente o valor da corrente de pico. A recuperação média para 3 determinações foi 99,2% com um desvio padrão de 5,56 pelo método da adição do padrão, o que mostra que o fármaco pode ser monitorado pelo método proposto dentro dos níveis encontrados em amostra de urina, uma vez que de 5 a 12% do fármaco e seus metabólitos são encontrados na urina durante o período de até 5 dias após sua ingestão, ou seja, concentrações em torno de $2,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para uma quantidade de 50 mg de DXR ingerida.

4.5.2.4. COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO POR ESPECTROFOTOMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DE DXR EM AMOSTRA DE URINA

A metodologia proposta para a determinação de DXR em amostra de urina foi comparada com o método espectrofotométrico na região do UV-vis para a determinação do respectivo fármaco. O espectro de absorção de UV-vis para uma solução $2,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR em meio aquoso e para a solução de água (branco) são apresentados na Figura 81.

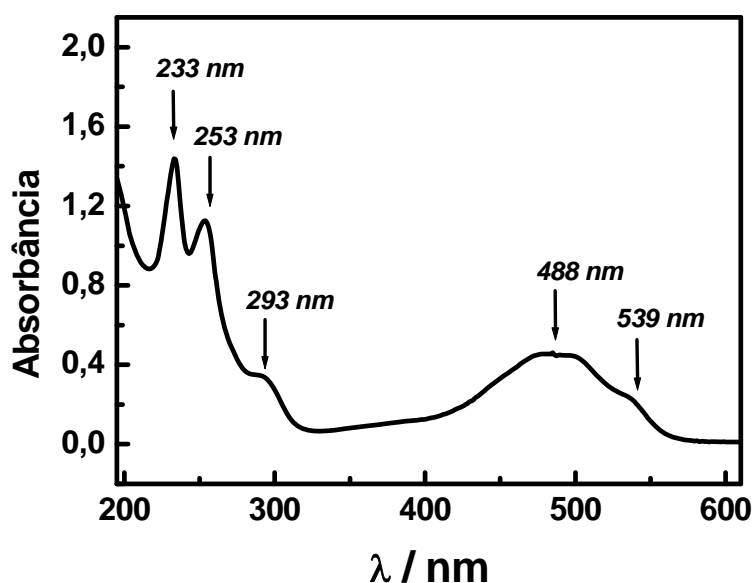


Figura 81 – Espectro de absorção em Uv-vis para (a) água e (b) solução de $2,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DXR em água.

A DXR exibe cinco bandas de absorbância em 233, 253, 293, 488 e 539 nm, sendo o mesmo verificado por Çakır, Biçer e Çakır (2003). Pelos espectros de absorção no comprimento de onda de 488 nm obtidos para a DXR em diferentes concentrações observa-se linearidade em toda a faixa de concentração investigada conforme mostra a Figura 82.

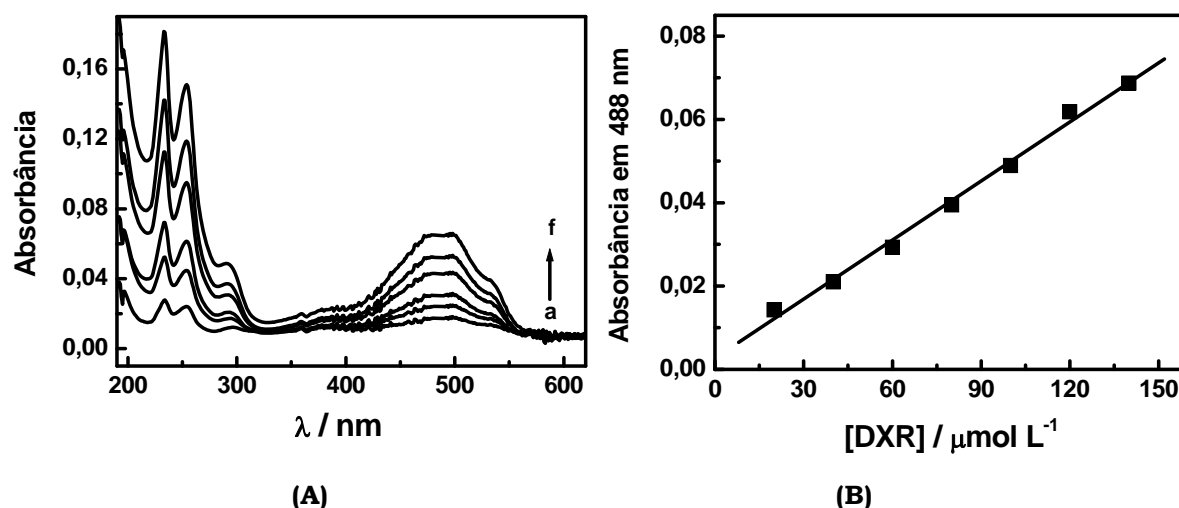


Figura 82 – **(A)** Espectros de absorção da DXR em solução aquosa em diferentes concentrações: (a) 20; (b) 40; (c) 60; (d) 80; (e) 100 e (f) 120 ($\mu\text{mol L}^{-1}$). **(B)** Curva analítica.

Uma relação linear é obtida entre 20 a 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com um coeficiente de correlação de 0,997 ($n = 7$), segundo a equação: $\text{Abs} = \epsilon b C = 0,003 + 4,72 \times 10^{-4} C$, onde: C = concentração de DXR em $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 82B.

Assim sendo, a Figura 83 mostra a determinação de DXR em amostra de urina realizada pelo teste de recuperação através do método de adição de padrão. Adição de 100 μL de uma solução de urina fortificada com 8,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DXR foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL e o mesmo completado com água. Três adições de padrão foram utilizadas.

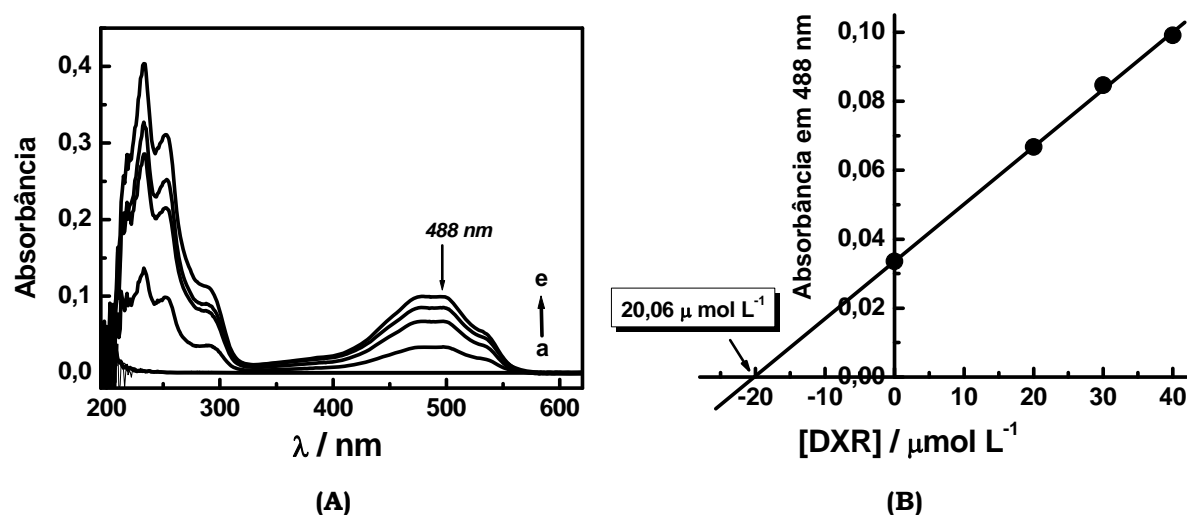


Figura 83 – (A) Espectros de absorção da DXR. (a) branco; (b) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DXR na amostra de urina; adições de padrão: (c) 20; (d) 40 e (e) 60 ($\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Método da adição de padrão da DXR.

Observamos que o composto farmacêutico apresenta as cinco bandas de absorção, as quais aumentam em função da concentração da DXR, conforme Figura 83A.

A análise dos resultados mostra um valor de recuperação média de 100,5% e desvio padrão de 3,51. A equação correspondente a Figura 83B é representada por $\text{Abs} (488 \text{ nm}) = 0,03 + 1,65 \times 10^{-3} C$, $R = 0,99$ para $n = 4$, sendo C = concentração de DXR em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os dados obtidos para a determinação de DXR em amostra de urina através do método proposto e do espectrofotométrico como método comparativo são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados obtidos para a determinação de DXR em amostra de urina.

Método	DXR adicionada	DXR encontrada	Recuperação* (%)
Voltamétrico (Proposto)	5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$	99,2 \pm 5,6
Espectrofotométrico	20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	20,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100,5 \pm 3,5

*(n = 3).

Os resultados obtidos na determinação de DXR em amostra de urina tanto para o método proposto utilizando eletrodo modificado com filme de PAG:GLU como o método espectrofotométrico usado como método comparativo apresentaram bons níveis de recuperação, mostrando ser viável o uso de poliaminoácidos como camada modificadora sobre a superfície eletródica na quantificação de DXR em amostra de urina.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que eletrodos de carbono vítreo podem ser modificados com filmes de poli ácido glutâmico usando três diferentes procedimentos. Estes filmes foram caracterizados por voltametria, microscopia de força atômica e impedância eletroquímica. Os filmes do poli ácido glutâmico mostram claramente que os eletrodos modificados apresentam filmes com espessuras diferenciadas e dependentes do modo de preparação. O filme PAG apresenta estrutura uniforme característica de uma cadeia polimérica de nanotubos sobre a superfície eletródica com propriedades eletrocatalíticas e também incorporação do analito tornando-se muito útil para aplicações analíticas envolvendo pré-concentração. No entanto, filmes formados por eletropolimerização apresentam-se finos e com boa aplicabilidade em eletrocatalise. Filmes formados com PAG:GLU apresentam-se na forma de membranas espessas apresentando poros com boa retenção do analito e útil para pré-concentração do mesmo.

A aplicabilidade dos eletrodos modificados pela adição direta de PAG mostrou-se eficaz na pré-concentração de rutina e ácido cafêico sobre a superfície eletródica, no qual a metodologia proposta para a determinação de rutina foi aplicada na formulação farmacêutica Novarrutina[®] e em amostra de vinho tinto da marca Sinuelo[®] para a quantificação de ácido cafêico. Os valores encontrados foram concordantes com os apresentados na literatura e com o método espectrofotométrico usado para validação da metodologia analítica proposta, confirmando a sensibilidade do método.

Os filmes de PAG:GLU sobre eletrodo de carbono vítreo mostraram-se eficientes na pré-concentração e determinação de AMX e DXR em amostra de urina humana. A pré-concentração através da interação do grupo carboxílico do PAG com o grupo amina presente nas estruturas dos respectivos fármacos possibilitou o desenvolvimento da metodologia proposta para a determinação dos fármacos em amostra de urina humana com índices de recuperação semelhante ao método espectrofotométrico usado como método comparativo. Uma característica marcante ao uso do eletrodo modificado com o poli ácido glutâmico foi à oxidação da AMX monitorada no potencial de +0,2 V, pico este obtido após a redução da carbonila gerada pela etapa prévia de oxidação da AMX no potencial de +1,0 V por 60 segundos, possibilitando assim sua determinação em potencial menos positivo

que o obtido via oxidação direta, uma vez que a determinação da AMX relatada na literatura é efetuada em altos valores de potencial.

Assim os eletrodos modificados com o poli aminoácido revelaram uma excelente alternativa para a determinação voltamétrica diante da diversidade de compostos analisados, sendo de fácil preparação e baixo custo.

REFERÊNCIAS

- ABOU-DONIA, A. H.; TOAIMA, S. M.; HAMMODA, H. M.; SHAWKY, E. Determination of rutin in *Amaryllis belladonna* L. flowers by HPLC and spectrophotometry. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 64, n. 1/2, p. 109-112, July 2006.
- AGHAZADEH, A.; KAZEMIFARD, G. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in pharmaceutical dosage forms by LC with amperometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 325-329, May 2001.
- AL-ABACHI, M. Q.; HADDI, H.; AL-ABACHI, A. M. Spectrophotometric determination of amoxicillin by reaction with N, N-dimethyl-p-phenylenediamine and potassium hexacyanoferrate (III). **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 554, n.1/2, p. 184-189, Dec. 2005.
- ALLMAN, T.; LENKINSKI, R. E. Adriamycin complexes of Pd (II) and Pt (II). **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 30, n. 1, p. 35-43, May 1987.
- ANSON, F. C.; OHSAKA, T.; SAVEANT, J. M. Diffusional pathways for multiply charged ions incorporated in polyelectrolyte coatings on graphite electrodes. $\text{CO}(\text{C}_2\text{O}_4)_3^{3-}$ in coatings of protonated polylysine. **Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 87, n. 4, p. 640-647, 1983.
- ANSON, F. C.; SAVEANT, J.; SHIGEHARA, 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. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 105, n. 5, p. 1096-1106, 1983.
- BACKHEET, E. Y.; EMARA, K. M.; ASKAL, H. F.; SALEH, G. A. Selective spectrophotometric method for the determination of ascorbic-acid in pharmaceutical preparations and fresh fruit juices. **Analyst**, Cambridge, v. 116, n. 8, p. 861-865, Aug. 1991.
- BAI, Y.; RUAN, X.; MO, J.; XIE, Y. Potentiometric stripping analysis of copper using cysteine modified mercury film electrode. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 373, n. 1, p. 39-46, Nov. 1998.
- BALDWIN, R. P.; PACKETT, D.; WOODCOCK, T. M. Electrochemical behavior of adriamycin at carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 53, n. 3, p. 540-542, 1981.
-

BAO, X.; ZHU, Z.; LI, N. Q.; CHEN, J. Electrochemical studies of rutin interacting with hemoglobin and determination of hemoglobin. **Talanta**, Amsterdam, v. 54, n. 4, p. 591-596, May 2001.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1980. 833 p.

BELAL, F.; EL-KERDAWY, M. M.; EL-ASHRY, S. M.; EL-WASSEEF, D. R. Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms. **IL Fármaco**, Lausanne, v. 55, n.11/12, p. 680-686, Nov./Dec. 2000.

BERGAMINI, M. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; DOCKAL, E. R.; BOCCHI, N.; CAVALHEIRO, E. T. G. Evaluation of different voltammetric techniques in the determination of amoxicillin using a carbon paste electrode modified with [N,N'-ethylenebis(salicylideneaminato)] oxovanadium(IV). **Journal of the Electrochemical Society**, Pennington, v. 153, n. 5, E94-E98, 2006.

BIANCO, P.; HALADJIAN, J.; DEROCLES, G. S. Ion-exchange properties of poly (L-lysine) coatings on pyrolytic-graphite electrodes. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v. 6, n. 1, p. 67-74, Jan. 1994.

BIRYOL, I.; USLU, B.; KUCUKYAVUZ, Z. Voltammetric determination of amoxicillin using a carbon paste electrode modified with poly(4-vinyl pyridine). **STP Pharma Sciences**, Paris, v. 8, n. 6, p. 383-386, Nov./Dec. 1998.

BOCCHI, C.; CARERI, M.; GROPPI, F.; MANGIA, A.; MANINI, P.; MORI, G. Comparative investigation of UV, electrochemical and particle beam mass spectrometric detection for the high performance liquid chromatographic determination of benzoic and cinnamic acids and of their corresponding phenolic acids. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 753, n. 2, p. 157-170, Nov. 1996.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Livraria Almedina, 1993. 471 p.

BRETT, A. M. O.; CHIORCEA, A. M. Atomic force microscopy of DNA immobilized onto a highly oriented pyrolytic graphite electrode surface. **Langmuir**, Washington, v. 19, n. 9, p. 3830-3839, Apr. 2003.

BRETT, A. M. O.; PIEDADE, J. A. P.; CHIORCEA, A. M. Anodic voltammetry and AFM imaging of picomoles of adriamycin adsorbed onto carbon surfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 538-539, p. 267-276, Dec. 2002.

BRETT, A. M. O.; VIVAN, M.; FERNANDES, I. R.; PIEDADE, J. A. P. Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA. **Talanta**, Amsterdam, v. 56, n. 5, p. 959-970, Apr. 2002.

BRUNO, F.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of beta-lactam antibiotics in bovine milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 7, p. 3463-3470, July 2001.

ÇAKÍR, S.; BIÇER, E.; COSKUN, E.; ÇAKÍR, O. Electrochemical monitoring of the interaction of doxorubicin with nicotinamide and Fe(III) ions under aerobic and anaerobic conditions. **Bioelectrochemistry**, Lausanne, v. 60, n. 1/2, p. 11-19, Aug. 2003.

CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; MONTEMAYOR, C.; FATÁS, E.; PINGARRÓ, J. M. Characterization of alkanethiol-self-assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 586, p. 112-121, Jan. 2006.

CAO, Y. H.; WANG, Y.; YUAN, Q. Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 59, n. 1/2, p. 135-140, Jan. 2004.

CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M. Spectrophotometric and coulometric detection in the highperformance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, n. 1/2, p. 449-460, June 2000.

CHA, S. K.; AHN, B. K.; HWANG, J. U.; ABRUNA, H. D. Determination of mercury at electrodes modified with polymeric films of [Ru(v-bpy)₃]²⁺ incorporating amino acids. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 65, n. 11, p. 1564-1569, June 1993.

CHANEY, E. N.; BALDWIN, R. P. Electrochemical determination of adriamycin compounds in urine by preconcentration at carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 54, n. 14, p. 2556-2560, 1982.

CHANEY, E. N.; BALDWIN, R. P. Voltammetric determination of doxorubicin in urine by adsorptive preconcentration and flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 176, p. 105-112, Oct. 1985.

CHEN, G.; DING, X. H.; YE, J. N. Determination of rutin and L-ascorbic acid in pharmaceutical preparations and fruit juices by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. **Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese**, Beijing, v. 21, n. 9, p. 1364-1368, Sept. 2000.

CHEN, G.; ZHANG, H.; YE, J. Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 423, n. 1, p. 69–76, Oct. 2000.

CHEN, H. Y.; YU, A. I.; XU, D. K. Development of an amperometric detector for the determination of phenolic compounds. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 359, n. 7/8, p. 542-545, Dec. 1997.

CHEN, H. Y.; YU, A. M.; ZHANG, H. L. Electrocatalytic oxidation of dopamine at the polyglycine chemically modified carbon fiber bundle electrode and its voltammetric resolution with uric acid. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 358, n. 7/8, p. 863-864, Aug. 1997.

CHEN, H.; HENG, C. K.; PUIU, P. D.; ZHOU, X. D.; LEE, A. C.; LIM, T. M.; TAN, S. N. Detection of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on self-assembled monolayer (SAM) of alkanethiolate using electrochemical impedance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 554, n. 1/2, p. 52–59, Dec. 2005.

CHENG, Z.; TEOH, S. H. Surface modification of ultra thin poly (ϵ -caprolactone) films using acrylic acid and collagen. **Biomaterials**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1991-2001, May 2004.

CHRISTOPHERSEN, M. J.; CARDWELL, T. J. Determination of total phenols in waters and wastewaters using flow injection with electrochemical detection, an alternative to the standard colorimetric procedure. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v. 323, n. 1/3, p. 39-46, Apr. 1996.

DE BAERE, S.; CHERLET, M.; BAERT, K.; DE BACKER, P. Quantitative analysis of amoxicillin and its major metabolites in animal tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 74, n. 6, p. 1393-1401, Mar. 2002.

DELGADO, M. A. R.; HERNANDEZ, G. G.; GONZÁLEZ, J. E. C.; TRUJILLO, J. P. P. Principal component analysis of polyphenol content in young red wines. **Food Chemistry**, Oxford, v. 78, n. 4, p. 523-532, Sept. 2002.

ENSAFI, A. A.; HAJIAN, R. Determination of rutin in pharmaceutical compounds and tea using cathodic adsorptive stripping voltammetry. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 18, n. 6, p. 579–585, Mar. 2006.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v. 427, n. 1, p. 119-127, Jan. 2001.

FANG, F.; LI, J. M.; PAN, Q. H.; HUANG, W. D. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. **Food Chemistry**, Oxon, v. 101, n. 1, p. 428-433, 2007.

FÁRMACOS utilizados em neoplasia: Doxorrubicina. Disponível em: http://www.usoracional.com.br/index_arquivos/Neoplasia.html. Acesso em: 10 mar. 2007.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.; BADÍA, R.; DÍAZ-GARCÍA, M. E. Insights into the reaction of b-lactam antibiotics with copper (II) ions in aqueous and micellar media: kinetic and spectrometric studies. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 341, n. 1, p. 113-121, June 2005.

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. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 384, n. 2, p. 159-166, Mar. 1999.

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

FURP: Amoxicilina. Disponível em: ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/novo_site/medicamentos/AMOXICILINA_MEMENTO_SREP_SAC.pdf. Acesso em: 24 jan. 2007.

GAMBA, V.; DUSI, G. Liquid chromatographic with fluorescence detection of amoxicillin and ampicillin in feeds using pre-column derivatization. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 483, n. 1/2, p. 69-72, Apr. 2003.

GAMELLA, M.; CAMPUZANO, S.; REVIEJO, A. J.; PINGARRON, J. M. Electrochemical estimation of the polyphenol index in wines using a laccase biosensor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 21, p. 7960-7967, Oct. 2006.

GARCÍA-REIRIZ, A.; DAMIANI, P. C.; OLIVIERI, A. C. Different strategies for the direct determination of amoxicillin in human urine by second-order multivariate analysis of kinetic-spectrophotometric data. **Talanta**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 806-815, Feb. 2007.

GHICA, M. E.; BRETT, A. M. O. Electrochemical oxidation of rutin. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 17, n. 4, p. 313-318, Mar. 2005.

GOLABI, S. M.; ZARE, H. R. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at glassy carbon electrode modified with electrodeposited film derived from caffeic acid. **Electroanalysis**, Berlin, v. 11, n. 17, p. 1293-1300, Nov. 1999a.

GOLABI, S. M.; ZARE, H. R. Electrocatalytical oxidation of hidrazine at a chlorogenic acid (CGA) modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 465, n. 2, p. 168-176, Apr. 1999b.

GOLABI, S. M.; ZARE, H. R.; HAMZEHLOO, M. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at a pyrocatechol violet (PCV) chemically modified electrode. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 111-121, June 2001.

GOUGNON, C. Modelling by impedance measurements of screen printing electrodes containing different ratio of poly(vinyl chloride) and cellulose acetate. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 51, n. 20, p. 4142-4147, May 2006.

GREENAWAY, F. T.; DABROWIAK, J. C. The binding of copper ions to daunomycin and adriamycin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 16, n. 2, p. 91-107, 1982.

GUAN, J. G.; MIAO, Y. Q.; ZHANG, Q. J. Impedimetric biosensors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 97, n. 4, p. 219-226, Apr. 2004.

HALADJIAN, J.; THIERRYCHEF, I.; BIANCO, P. Permselective-membrane pyrolytic graphite electrode for the study of microvolumes of [2Fe-2S] ferredoxin. **Talanta**, Amsterdam, v. 43, n. 7, p. 1125-1130, July 1996.

HAPIOT, P.; NEUDECK, A.; PINSON, J.; FULCRAND, H.; NETA, P.; ROLANDO, C. Oxidation of caffeic acid and related hydroxycinnamic acids. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 405, n. 1/2, p. 169-176, Apr. 1996.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2001. 862 p.

HASHIDA, M.; AKAMATSU, K.; NISHIKAWA, M.; YAMASHITA, F.; TAKAKURA, Y. Design of polymeric prodrugs of prostaglandin E-1 having galactose residue for hepatocyte targeting. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 253-262, Nov. 1999.

HASSAN, H. N. A.; BARSOUM, B. N.; HABIB, I. H. I. Simultaneous spectrophotometric determination of rutin, quercetin and ascorbic acid in drugs using a Kalman Filter approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 20, n. 1/2, p. 315-320, June 1999.

HE, J. L.; YANG, Y.; YANG, X.; LIU, Y. L.; LIU, Z. H.; SHEN, G. L.; YU, R. Q. β -cyclodextrin incorporated carbon nanotube-modified electrode as an electrochemical sensor for rutin. **Sensors and Actuators B-Chemical**, Lausanne, v. 114, n. 1, p. 94–100, Mar. 2006.

HENDRICKSON, H. P.; KAUFMAN, A. D.; LUNTE, C. E. Electrochemistry of catechol-containing flavonoids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 325-334, Mar. 1994.

HOIZEY, G.; LAMIABLE, D.; FRANCES, C.; TRENQUE, T.; KALTENBACH, M.; DENIS, J.; MILLART, H. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 661-666, Oct. 2002.

HOLSTEGE, D. M.; PUSCHNER, B.; WHITEHEAD, G.; GALEY, F. D. Screening and mass spectral confirmation of beta-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 2, p. 406-411, Jan. 2002.

HOTTA, H.; UEDA, M.; NAGANO, S.; TSUJINO, Y.; KOYAMA, J.; OSAKAI, T. Mechanistic study of the oxidation of caffeic acid by digital simulation of cyclic voltammograms. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 303, n. 1, p. 66-72, Apr. 2002.

HOU, Y.; HELALI, S.; ZHANG, A.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELET, C.; MINIC, J.; GOROJANKINA, T.; MARIE-ANNICK, P.; PAJOT-AUGY, E.; SALESSE, R.; BESSUEILLE, F.; SAMITIER, J.; ERRACHID, A.; AKIMOV, V.; REGGIANI, L.; PENNETTA, C.; ALFINITO, E. Immobilization of rhodopsin on a self-assembled multilayer and its specific detection by electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 1393–1402, Jan. 2006.

HU, G.; LIU, Y.; ZHAO, J.; CUI, S.; YANG, Z.; ZHANG, Y. Selective response of dopamine in the presence of ascorbic acid on L-cysteine self-assembled gold electrode. **Bioelectrochemistry**, Lausanne, v. 69, n. 2, p. 254–257, Oct. 2006.

HUSAIN, N.; AGBARIA, R. A.; WARNER, I. M. Spectroscopic analysis of the binding of doxorubicin to human alpha-1-acid glycoprotein. **Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 97, n. 41, p. 10857-10861, Oct. 1993.

JIMÉNEZ, M. S.; VELARTE, R.; CASTILLO, J. R. Direct determination of phenolic compounds and phospholipids in virgin olive oil by micellar liquid chromatography. **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, n. 1, p. 8–14, 2007.

KANG, J. W.; LU, X. Q.; ZENG, H. J.; LIU, H. D.; LU, B. Q. Investigation on the electrochemistry of rutin and its analytical application. **Analytical Letters**, New York, v. 35, n. 4, p. 677-686, 2002.

KAROVICOVÁ, J.; SIMKO, P. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 882, n. 1/2, p. 271-281, June 2000.

KATZ, E.; WILLNER, I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-Sensors, and enzyme biosensors. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 15, n. 11, p. 913-947, July 2003.

KIYOMIYA, K.; MATSUO, S.; KURUEBE, M. Differences in intracellular sites of action of Adriamycin in neoplastic and normal differentiated cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, New York, v. 47, n. 1, p. 51-56, Jan. 2001.

KOPROWSKI, L.; KIRCHMANN, E.; WELCH, L. E. The electrochemical oxidation of penicillins on gold electrodes. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v. 5, n. 5/6, p. 473-482, June/July 1993.

KOMORSKY-LOVRIC, S. Redox kinetics of adriamycin adsorbed on the surface of graphite and mercury electrodes. **Bioelectrochemistry**, Lausanne, v. 69, n. 1, p. 82-87, Sept. 2006.

LABUDA, J.; PLASKOŇI, V. Determination of mercury ions on a diphenylcarbazone bulk modified graphite electrode. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 228, n. 2, p. 259-263, Jan. 1990.

LANE, R. F.; HUBBARD, A. T. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. **Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 77, n. 11, p. 1401-1410, 1973a.

LANE, R. F.; HUBBARD, A. T. Electrochemistry of chemisorbed molecules. II. The influence of charged chemisorbed molecules on the electrode reactions of platinum complexes. **Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 77, n. 11, p. 1411-1420, 1973b.

LEHENKARI, P. P.; CHARRAS, G. T.; NYKANEN, A.; HORTON, M. A. Adapting atomic force microscopy for cell biology. **Ultramicroscopy**, Amsterdam, v. 82, n. 1/4, p. 289-295, Feb. 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

LEUBOLT, R.; KLEIN, H. Ion-exchange high-performance liquid- chromatography in the brewing industry. **Journal Chromatography**, Amsterdam, v. 640, n. 1/2, p. 271-277, June 1993.

LI, C. Poly (L-glutamic acid) anticancer drug conjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 54, n. 5, p. 695-713, Sept. 2002.

LI, G.; CHEN, L.; ZHU, J.; ZHU, D.; UNTEREKER, D. F. Histidine modified electrode and its application to the electrochemical studies of heme proteins. **Electroanalysis**, Berlin, v. 11, n. 2, p. 139-142, Feb. 1999.

LI, X. J.; ZHANG, Y. P.; YUAN, Z. B. Separation and determination of rutin and vitamin C in compound rutin tablets by capillary electrophoresis with amperometric detection. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, Beijing, v. 30, n. 7, p. 815-818, July 2002.

LIN, X. Q.; HE, J. B.; ZHA, Z. G. Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry. **Sensors and Actuators B-Chemical**, Lausanne, v. 119, n. 2, p. 608-614, Dec. 2006.

LIU, A. C.; CHEN, D. C.; LIN, C. C.; CHOU, H. H.; CHEN, C. H. Application of cysteine monolayers for electrochemical determination of sub-ppb copper (II). **Analytical Chemistry**, Washington, v. 71, n. 8, p. 1549-1552, Apr. 1999.

LIU, D. J.; ZHANG, A. M.; TIAN, L. Q. Catalytic kinetic spectrophotometric determination of rutin by potassium periodate-butyl rhodamine B system. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, Beijing, v. 31, n. 10, p. 1224-1227, Oct. 2003.

LONG, Y. T.; CHEN, H. Y. Electrochemical regeneration of coenzyme NADH on a histidine modified silver electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 440, n. 1/2, p. 239-242, Dec. 1997.

LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; BECK, J.; KUBOTA, L. T. Development of a voltammetric sensor for catechol in nanomolar levels using a modified electrode with Cu(phen)₂(TCNQ)₂ and PLL. **Sensors and Actuators B-Chemical**, Lausanne, v. 117, n. 1, p. 274-281, Sept. 2006a.

LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; BECK, J.; KUBOTA, L. T. Development of a sensor based on tetracyanoethylene (LiTCNE)/poly-L-lysine (PLL) for dopamine determination. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 50, n. 13, p. 2675-2683, Apr. 2005.

LUZ, R. C. S.; MOREIRA, A. B.; DAMOS, F. S.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Cobalt tetrasulphonated phthalocyanine immobilized on poly-L-lysine film onto glassy carbon electrode as amperometric sensor for cysteine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 184–191, Sept. 2006b.

LYLE, S. J.; YASSIN, S. S. Polarographic studies of metal ion complexes of ampicillin and amoxycillin. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 274, n. 2, p. 225-230, Mar. 1993.

MALAGUTTI, A. R.; ZUIN, V. G.; CAVALHEIRO, E. T. G.; MAZO, L. H. Determination of rutin in green tea infusions using square-wave voltammetry with a rigid carbon-polyurethane composite electrode. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 18, n. 10, p. 1028–1034, May 2006.

MATAR, K. M. Simple and rapid LC method for the determination of amoxicillin in plasma. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 64, n. 5/6, p. 255-260, Sept. 2006.

MATOS, R. C.; AUGELLI, M. A.; LAGO, C. L.; ANGNES, L. Flow injection analysis-amperometric determination of ascorbic and uric acids in urine using arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 404, n. 1, p. 151–157, Jan. 2000.

MOHAMED, G. G. Spectrophotometric determination of ampicillin, dicloxacin, flucloxacillin and amoxicillin antibiotic drugs: ion-pair formation with molybdenum and thiocyanate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 561-567, Feb. 2001.

MONTERROSO, S. C. C.; CARAPUÇA, H. M.; DUARTE, A. C. Mixed polyelectrolyte coatings on glassy carbon electrodes: Ion-exchange, permselectivity properties and analytical application of poly-L-lysine-poly (sodium 4-styrenesulfonate)-coated mercury film electrodes for the detection of trace metals. **Talanta**, Amsterdam, v. 68, n. 5, p. 1655–1662, Feb. 2006.

MOREIRA, J. C.; FOGG, A. G. Modification of electrodes with adsorbed polyamino acids. Part 2. Adsorptive stripping voltammetric determination of hexacyanoferrate(III) at a hanging mercury drop electrode in the presence of an adsorbed layer of copper-modified poly-L-lysine. **Analytist**, Cambridge, v. 115, n. 12, p. 1565-1568, Dec. 1990.

MOREIRA, J. C.; ZHAO, R.; FOGG, A. G. Modification of electrodes with adsorbed polyamino acids. Part 1. Cathodic stripping voltammetric determination of copper(II) at a hanging mercury drop electrode using adsorptive accumulation on an adsorbed layer of poly-L-histidine. **Analytist**, Cambridge, v. 115, n. 12, p. 1561-1564, Dec. 1990.

MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975.

MOUSTY, C.; COSNIER, S.; LOPEZ, M. S. P.; LOPEZ-CABARCOS, E.; LOPEZ-RUIZ, B. Rutin determination at an amperometric biosensor. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 19, n. 2/3, p. 253-258, Jan. 2007.

MURRAY, R. W. **Electroanalytical chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1984. 191 p.

NAKAO, M.; YAMAZAKI, C.; TOMINAGA, H.; YAMAGUCHI, T.; FUJITA, Y. Spectrophotometric determination of anthracycline anticancer agents with aluminum(III) and chromazurol S in a nonionic surfactant micellar medium. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 22, n. 2, p. 313-316, Feb. 2006.

NARASIAH, D.; MITRA, C. K. A polytryptophan-modified electrode. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v. 5, n. 7, p. 589-594, Aug. 1993.

NARASIAH, D.; MITRA, C. K. A polytyrosine modified conducting electrode. **Analytical Letters**, New York, v. 25, n. 3, p. 443-452, 1992.

NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; MENCARELLI, D.; COMISSO, A.; SCACCINI, C. Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. **Food Chemistry**, Oxford, v. 79, n. 1, p. 119-124, Oct. 2002.

NIELSEN, S. E.; SANDSTRÖM, B. Simultaneous determination of hydroxycinnamates and catechins in human urine samples by column switching liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 787, n. 2, p. 369-379, Apr. 2003.

NIWA, M.; MATSUI, M.; KOIDE, K.; HIGASHI, N. Enantioselective adsorption of ferrocene-modified glutamic acids on helical poly-glutamic acid self assemblies at gold electrodes. **Journal of Materials Chemistry**, Cambridge, v. 7, n. 11, p. 2191-2192, Nov. 1997.

ODACI, D.; TIMUR, S.; PAZARLIOGLU, N.; MONTEREALI, M. R.; VASTARELLA, W.; PILLOTON, R.; TELEFONCU, A. Determination of phenolic acids using *Trametes versicolor* laccase. **Talanta**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 312-317, Jan. 2007.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 366–372, May 2006.

OSSOWSKI, T.; PIPKA, P.; LIWO, A.; JEZIOREK, D. Electrochemical and UV-spectrophotometric study of oxigen and superoxide anion radical interaction with anthraquinone derivatives and their radical anions. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 45, n. 21, p. 3581-3587, 2000.

PAJCHEL, G.; PAWŁOWSKI, K.; TYSKI, S. CE versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 29, n. 1/2, p. 75–81, June 2002.

PASAMONTES, A.; CALLAO, M. P. Determination of amoxicillin in pharmaceuticals using sequential injection analysis (SIA). Evaluation of the presence of interferents using multivariate curve resolution. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 485, n. 2, p. 195–204, June 2003.

PEDROSA, V. A.; MALAGUTTI, A. R.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A. The use of boron-doped diamond electrodes for the amperometric determination of flavonoids in a flow injection system. **Analytical Letters**, Philadelphia, v. 39, n. 14, p. 2737-2748, 2006.

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

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. 1439-1443, Sept. 2004.

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.

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 cromoclycate ânion. **Talanta**, Amsterdam, v. 60, n. 5, p. 1023-1032, July 2003.

-
- PETRUCCI, R.; ASTOLFI, P.; GRECI, L.; FIRUZI, O.; SASO, L.; MARROSU, G. A. Spectroelectrochemical and chemical study on oxidation of hydroxycinnamic acids in aprotic medium. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 52, n. 7, p. 2461-2470, Feb. 2007.
- PEYRAT-MAILLARD, M. N.; BONNELLY, S.; BERSET, C. Determination of antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. **Talanta**, Amsterdam, v. 51, n. 4, p. 709-716, Apr. 2000.
- 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. 1994a.
- 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 poly-L-lysine modification. **Analyst**, Cambridge, v. 119, n. 5, p. 963-968, May 1994b.
- QIAN, L.; GAO, Q.; SONG, Y.; LI, Z.; YANG, X. Layer-by-layer assembled multilayer films of redox polymers for electrocatalytic oxidation of ascorbic acid. **Sensors and Actuators B-Chemical**, Lausanne, v. 107, n. 1, p. 303-310, May 2005.
- REIS, A. P.; TARLEY, C. R. T.; MANIASSO, N.; KUBOTA, L. T. Exploiting micellar environment for simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid and dopamine. **Talanta**, Amsterdam, v. 67, p. 829-835, Oct. 2005.
- RESEARCH equipment and services. Disponível em:
<<http://www.tkk.fi/Units/Paper/equipment.html>>. Acesso em: 29 jan. 2006.
- RICHARD, A.; MARGARITIS, A. Poly (glutamic Acid) for biomedical applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 21, n. 4, p. 219-232, 2001.
- RIEDIKER, S.; STADLER, R. H. Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 73, n. 7, p. 1614-1621, Apr. 2001.
- ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. Amperometric biosensors for phenolic compounds determination in the environmental interest samples. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 77-86, Jan./Feb. 2001.
-

-
- ROY, P. R.; SAHA, M. S.; OKAJIMA, T.; OHSAKA, T. Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid by $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redox couple electrostatically trapped in cationic *N,N*-dimethylaniline polymer film electropolymerized on diamond electrode. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 51, n. 21, p. 4447-4454, June 2006.
- SALEM, H. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics in pure forms and in their pharmaceutical formulations. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 515, n. 2, p. 333-341, July 2004.
- SALEM, H.; SALEH, G. A. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 1205-1213, June 2002.
- SANTOS, S. M.; HENRIQUES, M.; DUARTE, A. C.; ESTEVES, V. I. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 731-737, Feb. 2007.
- SANZA, M. A.; DOMINGUEZ, I. N.; CÁRCEL, L. M. C.; GRACIA, L. N. Analysis of low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v. 513, n. 1, p. 229-237, June 2004.
- SASTRY, C. S. P.; RAO, J. S. V. M. L. Determination of doxorubicin hydrochloride by visible spectrophotometry. **Talanta**, Amsterdam, v. 43, n. 11, p. 1827-1835, Nov. 1996.
- SHAHRZAD, S.; BITSCH, I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 741, n. 2, p. 223-231, Aug. 1996.
- SHOUKRY, M. M. Potentiometric studies of binary and ternary complexes of amoxicillin. **Talanta**, Amsterdam, v. 39, n. 12, p. 1625-1628, Dec. 1992.
- SOUZA, M. F. B. Chemically modified electrodes applied to electroanalysis: a brief presentation. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 191-195, Mar./Apr. 1997.
- STERNSON, L. A.; THOMAS, G. Differential pulse polarographic analysis of adriamycin in plasma. **Analytical Letters**, New York, v. 10, n. 2, p. 99-109, 1977.
- STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 159-173, Mar./Apr. 2003.
-

-
- TANG, J. L.; WU, Z. Y.; WANG, J. G.; WANG, E. K. Electrocatalytic oxidation of NADH by rutin in biomembrane-like films on glassy carbon electrode. **Electrochemistry Communications**, New York, v. 2, n. 11, p. 796-799, Nov. 2000.
- TANG, J. L.; WU, Z. Y.; WANG, J. G.; WANG, E. Oxidation of ascorbic acid by rutin at a glassy carbon electrode modified with lipid films. **Electroanalysis**, Berlin, v. 13, n. 16, p. 1315-1318, Nov. 2001.
- TEMERK, Y. M.; IBRAHIM, H. S. M.; SCHUHMANN, W. Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of the antitumor drug rutin in pharmaceuticals, human urine, and blood serum. **Microchimica Acta**, Vienna, v. 153, n. 1/2, p. 7-13, Feb. 2006.
- TJADEN, U. R.; BRUIJN, E. A. Chromatographic analysis of anticancer drugs. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 531, p. 235-294, Oct. 1990.
- USLU, B.; BIRYOL, I. Voltammetric determination of amoxicillin using a poly (N-vinyl imidazole) modified carbon paste electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 591-598, July 1999.
- 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. 145-152, 2006.
- VOLIKAKIS, G. J.; EFSTATHIOU, C. E. Determination of rutin and other flavonoids by flow-injection/adsorptive stripping voltammetry using nujol-graphite and diphenylether-graphite paste electrodes. **Talanta**, Amsterdam, v. 51, n. 4, p. 775-785, Apr. 2000.
- WALT, D. R.; AGAYN, V. I.; The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 425-430, Nov./Dec. 1994.
- WANG, J.; TAHA, Z.; NASER, N. Electroanalysis at modified carbon-paste electrodes containing natural ionic polysaccharides. **Talanta**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 81-88, Jan. 1991.
- WANG, S. H.; DU, L. Y.; YAO, X. J.; NIU, X. L.; ZHUANG, H. S. Kinetic spectrophotometric determination of rutin by its inhibitory effect on the oxidation of amaranth by potassium periodate. **Annali di Chimica**, Rome, v. 95, n. 1/2, p. 87-94, Jan./Feb. 2005.
-

WANG, S.; DU, D. Differential pulse voltammetry determination of ascorbic acid with ferrocene-l-cysteine self-assembled supramolecular film modified electrode. **Sensors and Actuators B-Chemical**, Lausanne, v. 97, n. 2/3, p. 373–378, Feb. 2004.

WARING, M. J. DNA modification and cancer. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 50, p. 159-192, 1981.

WIBAWA, J. I. D.; FOWKES, D.; SHAW, P. N.; BARRETT, D. A. Measurement of amoxicillin in plasma and gastric samples high performance liquid chromatographic with fluorimetric detection. **Journal Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 774, n. 2, p. 141-148, July 2002.

WU, T.; GUAN, Y.; YE, J. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Food Chemistry**, Oxon, v. 100, n. 4, p. 1573–1579, 2007.

XU, Q.; WANG, R.; LU, Q. Y.; YE, W. B.; CAO, X. W.; WU, X. Q. Direct determination of rutin with Au electrode modified by 2-aminoethanethiol self-assembled monolayer. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, Beijing, v. 34, n. 7, p. 971-974, July 2006.

YANG, L. J.; RUAN, C. M.; LI, Y. B. Detection of viable Salmonella typhimurium by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. **Biosensors & Bioelectronics**, Oxon, v. 19, n. 5, p. 495-502, Dec. 2003.

YAU, H. C. M.; CHAN, H. L.; YANG, M. Electrochemical properties of DNA-intercalating doxorubicin and methylene blue on n-hexadecyl mercaptan-doped 5'-thiol-labeled DNA-modified gold electrodes. **Biosensors & Bioelectronics**, Oxon, v. 18, n. 7, p. 873-879, July 2003.

YOON, K. H.; LEE, S. Y.; KIM, W.; PARK, J. S.; KIM, H. J. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC-ESI mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 813, n. 1/2, p. 121-127, Dec. 2004.

YU, A. M.; CHEN, H. Y. Electrocatalytic oxidation and determination of ascorbic acid at poly (glutamic acid) chemically modified. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 344, n. 3, p. 181-185, June 1997b.

YU, A. M.; CHEN, H. Y. Electrocatalytic oxidation of hidrazine at the poly (glutamic acid) chemically modified electrode and its amperometric determination. **Analytical Letters**, New York, v. 30, n. 3, p. 599-607, 1997a.

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 voltametric resolution of ascorbic acid and dopamine. **Analytical Letters**, New York, v. 29, n. 15, p. 2633-2643, 1996.

YU, A. M.; ZHANG, H. L.; CHEN, H. Y. Catalytic oxidation of uric acid at the polyglycine chemically modified electrode and its trace determination. **Analyst**, Cambridge, v. 122, n. 8, p. 839-841, Aug. 1997b.

YU, A. M.; ZHANG, H. L.; CHEN, H. Y. Fabrication of a polyglycine chemically modified Electrode and its electrocatalytic oxidation to ascorbic acid. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 9, n. 10, p. 788-790, June 1997a.

ZAGOTTO, G.; GATTO, B.; MORO, S.; SISSI, C.; PALUMBO, M. Anthracyclines: recent developments in their separation and quantitation. **Journal Chromatography B**, Amsterdam, v. 764, n. 1/2, p. 161-171, Nov. 2001.

ZENG, B.; WEI, S.; XIAO, F.; ZHAO, F. Voltammetric behavior and determination of rutin at a single-walled carbon nanotubes modified gold electrode. **Sensors and Actuators B-Chemical**, Lausanne, v. 115, n. 1, p. 240-246, May 2006.

ZHANG, H. M.; LI, N. Q. Electrochemical studies of the interaction of adriamycin to DNA. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 67-73, Feb. 2000.

ZHANG, L.; LIN, X. Covalent modification of glassy carbon electrodes with glycine for voltammetric separation of dopamine and ascorbic acid. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 370, n. 7, p. 956-962, Aug. 2001b.

ZHANG, L.; LIN, X. Covalent modification of glassy carbon electrode with glutamic acid for simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid. **Analyst**, Cambridge, v. 126, n. 3, p. 367-370, 2001a.

ZHANG, L.; SUN, Y. M.; LIN, X. Separation of anodic peaks of ascorbic acid and dopamine at an α -alanine covalently modified glassy carbon electrode. **Analyst**, Cambridge, v. 126, n. 10, p. 1760-1763, Oct. 2001.

ZHAO, P.; DASH, A. K. A simple HPLC method using a microbore column for the analysis of doxorubicin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 543-548, July 1999.

ZHENG, J. B.; SUO, Z. R.; LIU, L. Simultaneous determination of four phenolic compounds and tanshinone IIA in Guanxintong tablets by LC using combined electrochemical detection and DAD. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 63, n. 1/2, p. 39-44, Jan. 2006.

ZHOU, S. Y.; STARKOV, A.; FROBERG, M. K.; LEINO, R. L.; WALLACE, K. B. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. **Cancer Research**, Birmingham, v. 61, n. 2, p. 771-777, Jan. 2001.

ZOULIS, N. E.; EFSTATHIOU, C.; E. Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 320, n. 2/3, p. 255-261, Feb. 1996.
