



**Ministério da Educação
Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas
Programa de Pós-Graduação em Química**



**DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE CITRATO DE SILDENAFILA EMPREGANDO
ELETRODO IMPRESSO ACOPLADO A SISTEMAS BIA E FIA**

RAFAEL BACKES DOS SANTOS

**Dourados - MS
Agosto/2016**



Ministério da Educação
Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas
Programa de Pós-Graduação em Química



**DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE CITRATO DE SILDENAFILA EMPREGANDO
ELETRODO IMPRESSO ACOPLADO A SISTEMAS BIA E FIA**

RAFAEL BACKES DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química, da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia- Universidade Federal da Grande Dourados, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva

Dourados - MS
Agosto/2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S231d Santos, Rafael Backes dos.

Determinação rápida de Citrato de Sildenafil empregando eletrodo impresso acoplado a sistemas BIA e FIA. / Rafael Backes dos Santos. – Dourados, MS : UFGD, 2016.

60f.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Citrato de Sildenafil. 2. Viagra®. 3. Eletrodo Impresso. 4. BIA. 5. FIA. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Determinação Rápida de Citrato de Sildenafil empregando eletrodo impresso acoplado a sistemas BIA e FIA", de autoria de Rafael Backes dos Santos, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva (Orientador-UFU)
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Adriana Evaristo de Carvalho
Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. Antonio Rogério Fiorucci
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 26 de agosto de 2016

*Dedico este Mestrado à toda a minha família
por me darem força e estarem sempre ao meu
lado.*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a DEUS por sempre estar presente em todos os momentos e a NOSSA SENHORA APARECIDA mãe do céu onde sou seu devoto. Neste momento agradeço pela conquista desta vitória.

A minha esposa Andressa Letícia Pires Pavão e ao filho Miguel Pavão dos Santos, o grande motivo desta conquista é vocês.

A toda minha família sendo mencionado o nome de meus pais Mario Batista dos Santos e Marlize Ana Backes onde todo o incentivo, motivação e apoio.

A Claudia Regina Pires Pavão que disponibiliza seu tempo para cuidar do Miguel enquanto eu e a Andressa estudamos.

Aos meus parceiros de trabalho do Laboratório LME.

Agradeço aos professores do PPGQ, que compartilharam seus conhecimentos e que contribuíram para minha formação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva pela paciência, amizade, confiança, humildade e conhecimentos adquiridos nestes dois anos que se passaram.

Ao Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos e seu aluno de mestrado Tiago de Jesus Guedes pela disponibilidade de realização das análises de Citrato de Sildenafil por HPLC.

Ao Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade e ao Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos pelas grandes contribuições na qualificação.

Ao Prof. Dr. Antônio Rogério Fiorucci e Prof^a. Dr^a. Adriana Evaristo de Carvalho pelo aceite na participação na banca de mestrado e contribuições na conclusão deste trabalho.

Aos órgãos Fundect e CNPq por financiar os equipamentos utilizados neste projeto e a CAPES pela bolsa concedida.

A todos os servidores da Universidade Federal da Grande Dourados pelas grandes contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas três metodologias eletroanalíticas empregando eletrodos impressos (SPE) para determinar o citrato de sildenafil (CS) em medicamentos para tratamento de disfunção erétil: Viagra[®] e genéricos. Na primeira o CS foi quantificado por voltametria de onda quadrada (SWV) em uma célula eletroquímica estacionária. Nas outras duas metodologias, o CS foi quantificado por detecção amperométrica nos sistemas hidrodinâmicos de Análise por Injeção em Batelada (BIA-AMP) e Análise por Injeção em Fluxo (FIA-AMP). Foram avaliados cinco SPE distintos: carbono não modificado (C), modificado com nanotubos de parede simples (SWCNT), modificado com nanotubos de parede múltipla (MWCNT), grafeno e Polianilina. O SPE-C e SPE-MWCNT apresentaram sinais analíticos e precisão similares, sendo escolhido SPE-C para detecção de CS devido ao custo três vezes inferior. Os maiores sinais para CS foram obtidos em meio de tampão Britton Robinson 0,04 mol L⁻¹ pH 2, no qual foi observado um pico de oxidação irreversível em +1,05 V. Na detecção por SWV, foi avaliado o efeito de surfactantes catiônico Brometo de Cetil Trimetil Amônia (CTAB), neutro Triton X e aniônico Dodecil sulfato de sódio (SDS) na resposta voltamétrica. Dentre estes o SDS aumentou três vezes a sensibilidade para CS porém diminuiu a precisão devido ao aumento da adsorção de CS na superfície do SPE-C. Logo, as determinações de CS foram realizadas no SPE-C na ausência de surfactante, no qual foi obtida uma estreita faixa linear (1,0 a 7,0 μmol L⁻¹) e sensibilidade de 0,63 μA mol⁻¹ L. Nos sistemas hidrodinâmicos o CS foi detectado no SPE-C por amperometria aplicando +1,1 V (vs PRE). No sistema BIA as maiores correntes de pico, precisão e frequência analítica foram obtidas injetando-se 50 μL de solução na célula numa vazão de 100 μL s⁻¹ e utilizando agitação mecânica na célula BIA a 700 rpm. No FIA essa melhor performance foi obtida injetando-se 150 μL a uma vazão de 75 μL s⁻¹. Avaliando-se as figuras de mérito observou-se que o BIA apresentou maior sensibilidade (0,312 vs. 0,241 μA μmol⁻¹L) e frequência analítica teórica (730 vs 550 h⁻¹), porém uma pior precisão (RSD = 3,8 % vs 1,4 %). As dosagens de CS nas formulações farmacêuticas empregando BIA e FIA não apresentaram diferenças significativas do método de HPLC. Os métodos propostos empregando SPE-C em sistemas BIA e FIA são os mais rápidos propostos na literatura. Além disso, são práticos e de baixo custo, características interessantes para análises de rotina na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Citrato de Sildenafil, Viagra[®], Eletrodo Impresso, BIA, FIA.

ABSTRACT

In this work we were developed three electroanalytical methodologies employing screen-printed electrodes (SPE) to quantify sildenafil citrate (CS) in erectile dysfunction drugs (Viagra[®] and generic). In the first method CS was measured by square wave voltammetry (SWV) in a stationary electrochemical cell. In the other, CS was detected by amperometric detection in hydrodynamic systems of Batch Injection Analysis (BIA-AMP) and Flow Injection Analysis (FIA -AMP). For CS detection were evaluated five SPE's: unmodified carbon (C), modified with single-wall carbon nanotubes (SWCNT), multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) , polyaniline (PA) and graphene (Gr). The SPE-C and SPE- MWCNT showed similar performance in currents and precision, being chosen the SPE-C due to the lower cost (three times smaller). The best signal for CS was obtained in 0.04 mol L⁻¹ Britton-Robinson buffer in pH 2, condition that was obtained an irreversible anodic peak at +1.05 V. In SWV detection the effect of surfactants on voltammetric response was evaluated: cationic CetylTrimethylAmmonium Bromide (CTAB), anionic sodium dodecylsulfate (SDS) and neutral Triton-X (TX-100). Among these SDS increased three times the CS sensitivity, but reduces the precision due to the increased adsorption in the SPE-C surface. Therefore, the CS determinations were performed on SPE-C in the absence of surfactant, in which a narrow linear range was obtained (1.0 to 7.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and sensitivity of 0.63 $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{L}$. In hydrodynamic systems CS was detected in the SPE-C by amperometry at + 1.1 V (vs PRE). In BIA the higher peak currents, precision and analytical frequency were obtained injecting 50 μL of CS solution at flow rate of 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ and low mechanical stirring of electrolyte in the BIA cell (700 rpm). In the FIA the best performance was achieved by injecting 150 μL at a flow rate of 75 $\mu\text{L s}^{-1}$. Comparing both, BIA showed higher sensitivity (0.312 vs. 0.241 $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{L}$) and theoretical analytical frequency (730 vs 550 h^{-1}), but a worse precision (RSD = 3.8 % vs. 1.4%). The CS analysis in pharmaceutical formulations using BIA and FIA showed no significant differences in the HPLC method. The BIA-SPE and FIA-SPE methods proposed here are the fastest when compared with others in the literature. Furthermore, they are simple and low cost, good features for routine analysis in the pharmaceutical industry.

Keywords: Sildenafil Citrate, Viagra[®], Screen-Printed Electrode, BIA, FIA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas dos inibidores da PHD5.....	13
Figura 2. Imagem de uma célula eletroquímica convencional (A) e de uma célula contendo três eletrodos impressos (B1 e B2).	17
Figura 3. (A) Componentes de um sistema FIA típico de linha única. (B) Esquema do gradiente de concentração da solução injetada observado em distintos momentos no fluxo transportador e os (C) respectivos sinais analíticos transientes.....	20
Figura 4. Esquema de uma célula eletroquímica de BIA na configuração “walljet”.....	22
Figura 5. Etapas operacionais de um sistema BIA com detecção amperométrica.	23
Figura 6. Figura dos componentes dos sistemas BIA (A: Micropipeta eletrônica;B: Agitador mecânico), FIA (A: Bomba peristáltica; B: Injetor comutador) e componentes em comum para ambos sistemas (C: Célula eletroquímica “walljet”; D:Potenciostato portátil; E: Notebook...)	32
Figura 7. Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de CS $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ no SPE-C em distintos tampões BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2 a 10). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}	33
Figura 8. Curva de distribuição das espécies de sildenafil em função do pH.	34
Figura 9. (A) CV's para ferrocianeto de potássio $xx \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $xx \text{ mol L}^{-1}$ em distintas velocidades de varredura ($n = 3$) e dependência da corrente de pico anódica média ($\pm \text{RSD}$) obtida com a velocidade de varredura (B) e raiz quadrada de varredura (C).....	36
Figura 10. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em meio de solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de TBR pH 2 para distintos SPE's	38
Figura 11. Correntes de pico médias ($\pm \text{RSD}$) para os distintos SPE's obtidas para dez voltamogramas sucessivos de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de TBR pH 2.	39
Figura 12. Estrutura química dos surfactantes SDS, TX-100 e CTAB.....	40
Figura 13. SWV's obtidos em solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência e presença dos surfactantes SDS, CTAB e TX-100 em TBR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$	40
Figura 14. SWV's obtidos em solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em TBR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) na ausência e presença de SDS em distintas concentrações	42
Figura 15. Correntes de pico médias para concentrações crescentes de CS em meio de TBR pH 2,0 com e sem SDS.....	43
Figura 16. SWV's para vinte medidas de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência (A) e na presença de SDS (B). Eletrólito: TBR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2).....	43

Figura 17. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos plotando as correntes de pico médias (\pm SD) relativas a três injeções da solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema BIA em cada potencial avaliado. Volume injetado: $100 \mu\text{L}$; Vazão: $134 \mu\text{L s}^{-1}$	45
Figura 18. Correntes de pico médias (\pm SD) para três injeções de solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ na célula BIA sob distintos volumes injetados (A) e vazões (B). Eletrólito: Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2). $E = +1,1 \text{ V}$. Vazão: $134 \mu\text{L s}^{-1}$ (A); Volume injetado: $50 \mu\text{L}$	46
Figura 19. Correntes de pico médias (\pm SD) para três injeções de solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em distintas agitações na célula BIA. Eletrólito: TBR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2); $E: + 1,1 \text{ V}$; Volume injetado: $50 \mu\text{L}$. Vazão: $83 \mu\text{L s}^{-1}$	47
Figura 20. Correntes de pico médias (\pm SD) para três injeções de solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ variando o volume injetado (A) e a vazão (B) do sistema FIA. Eletrólito: Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2); $E: +1,1 \text{ V}$; Vazão (A): $66 \mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado (B): $75 \mu\text{L}$	48
Figura 21. Biagrama (A) e Fiagrama (B) obtido para injeções em triplicata de solução soluções padrão de CS ($1,67$ a 15 mg L^{-1}) e soluções dos cinco medicamentos de CS (Viagra e genéricos). Condições: (A) Volume injetado: $50 \mu\text{L}$ (A) e $150 \mu\text{L}$ (B); Vazão: $100 \mu\text{L s}^{-1}$ (A) e $75 \mu\text{L s}^{-1}$ (B). Eletrólito: Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2); $E: +1,1 \text{ V}$	49
Figura 22. Biagrama (A) e Fiagrama (B) obtidos após dez injeções de solução de CS	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados sobre os medicamentos inibidores da PHD5 (Viagra, Cialis e Levitra).....	11
Tabela 2. Coeficientes angulares das curvas i_p vs $v^{1/2}$ e respectivas áreas eletroquimicamente ativas (AEA) para os distintos SPE's.	34
Tabela 3. Intervalos estudados e condição otimizada para cada variável da SWV (frequência, amplitude e incremento de potencial). Condições: CS 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, TBR (pH2) e SPE-C.....	35
Tabela 4. Parâmetros de confiabilidade analítica para a detecção de CS por SWV.....	41
Tabela 5. Parâmetros de confiabilidade analítica para detecção de CS por BIA e FIA amperométrico.	47
Tabela 6. Doseamento de CS nas cinco formulações comerciais obtidos por SWV, BIA, FIA e HPLC.	49
Tabela 7. Comparação de alguns parâmetros de confiabilidade analítica dos métodos propostos por FIA e BIA com detecção amperométrica com outros métodos eletroanalíticos da literatura para a determinação de CS.	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AE:** Eletrodo Auxiliar (Do Inglês “AuxiliaryElectrode”)
- AMP:** Amperometria
- BIA:** Análise por Injeção em Batelada (Do inglês “Batch InjectionAnalysis”)
- CS:** Citrato de Sildenafil
- CTAB:** Brometo de CetilTrimetil Amônia (Do inglês “CetylTrimethylAmmonium Bromide”)
- Epa:** Potencial de pico anódico
- FIA:** Análise por Injeção em Fluxo (Do inglês “Flow Injection Analysis”)
- Gr:** Grafeno
- HPLC:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Do inglês “High Perfomance Liquid Chromatography”)
- Ipa:** Corrente de pico anódica
- LOD:** Limite de Detecção (Do inglês “Limit of detection”)
- LOQ:** Limite de Quantificação (Do inglês “Limit of quantification”)
- MWCNT:** Nanotubos de Paredes Múltiplas (Do inglês “Multi-Walled Nanotubes”)
- PA:** Polianilina.
- PRE:** Eletrodo de Pseudo Referência (Do inglês “Pseudo Reference Electrode”)
- RE:** Eletrodo de Referência
- RSD:** Desvio Padrão Relativo (Do inglês “Relative Standard Deviation”)
- SD:** Desvio Padrão (Do inglês “Standard Deviation”)
- SDS:** Dodecil Sulfato de Sódio (Do inglês “Sodium Dodecyl Sulfate”)
- SPE:** Eletrodo Impresso (Do inglês “Screen-Printed Electrodes”)
- SWCNT:** Nanotubos de Paredes Simples (Do inglês “Single-Walled CarbonNanotubes”)
- SWV:** Voltametria de Onda Quadrada (Do inglês “Square Wave Voltammetry”)
- CV:** Voltametria Cíclica (Do inglês “Cyclic Voltammetry”)
- VI:** Viagra®.
- WE:** Eletrodo de Trabalho (Do inglês “Working Electrode”)
- TBR:** Tampão Britton Robinson.
- TX-100:** Triton X 100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:	12
1.1 Visão Geral:	12
1.2 Medicamentos de disfunção erétil e Citrato de Sildenafil (CS):	13
1.3 Química Eletroanalítica	15
1.3.1. Células Eletroquímicas	15
1.3.2 Técnicas eletroanalíticas	18
1.4 Análise por injeção em Fluxo (FIA)	19
1.5 Análise por Injeção em Batelada (BIA)	22
1.6 Eletrodos impressos acoplados em sistemas FIA e BIA	25
1.7 Revisão Bibliográfica: Métodos para a determinação de CS em medicamentos	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. PARTE EXPERIMENTAL	30
3.1 Reagentes, soluções e amostras	30
3.2 Instrumentação	30
3.3 Sistemas BIA e FIA	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
4.1 Estudo de pH	33
4.2 Detecção de CS empregando a SWV estacionária	37
4.3 Detecção de CS empregando BIA com detecção amperométrica	45
4.4 Detecção de CS empregando FIA com detecção amperométrica	48
4.5 Curvas de calibração com amostra e parâmetros de confiabilidade analítica por BIA e FIA com detecção amperométrica	49
4.6 Determinação de CS em medicamentos pelos métodos propostos e HPLC	52
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO:

1.1. Visão Geral:

O citrato de sildenafila (CS) é o princípio ativo do Viagra® (VI), medicamento genuíno e mais vendido no mundo para o tratamento da disfunção erétil masculina. VI, bem como o Cialis® e o Levitra® atuam no organismo inibindo a enzima fosfodiesterase tipo 5 (PHD5), o que causa o aumento na circulação sanguínea e o relaxamento muscular peniano [1]. Após expirar a patente do VI (laboratório Pfizer®) no Brasil em 2010, hoje em dia aproximadamente dez empresas fabricam formulações genéricas do VI [2], fora outras inúmeras manipuladas.

Devido à grande presença dessas formulações de CS, o controle de qualidade é de suma importância. As análises deste fármaco geralmente é realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), devido à sua confiabilidade e robustez. Logo, utilizando métodos baseados na análise por injeção em fluxo (FIA) ou em batelada (BIA) com detecção eletroquímica são vantajosos.

FIA é uma técnica na qual a solução de interesse é injetada em um fluxo que a transporta até um detector que registra um pico transiente proporcional à concentração do analito [3], Sendo assim, as análises são realizadas de modo contínuo e reproduzível, desde que os parâmetros experimentais (vazão, volume injetado, etc.) sejam mantidos constantes. BIA é um sistema alternativo ao FIA, no qual um injetor introduz a solução do analito diretamente sobre a superfície de um detector localizado num recipiente que contém uma solução inerte (célula BIA) [4]. Ambos sistemas apresentam elevada frequência analítica, precisão e baixo consumo de amostras/reagentes. Entretanto, o sistema BIA apresenta menos componentes (em geral apenas o injetor e a célula), sendo mais portátil podendo ser utilizado na própria farmácia ou em laboratórios com pouca infra-estrutura.

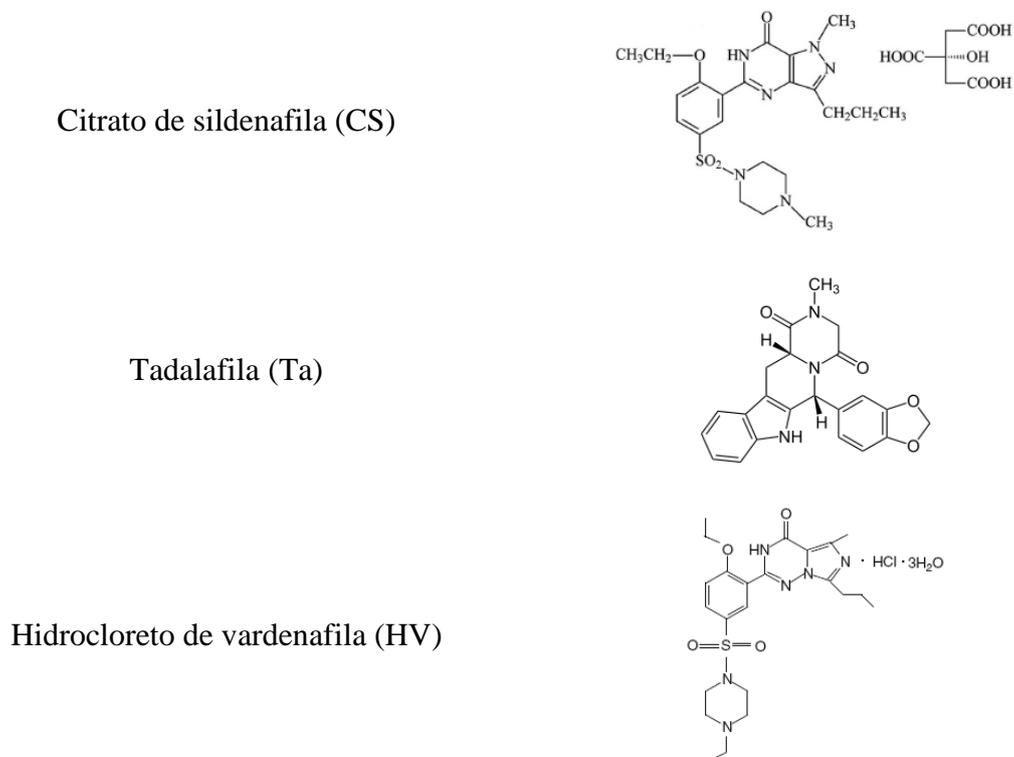
Além da rapidez associada aos sistemas hidrodinâmicos de análise por BIA e FIA, os métodos eletroanalíticos são vantajosos no que tange à elevada sensibilidade, baixo custo e portabilidade. Nesta perspectiva, os eletrodos impressos (SPE's) descartáveis tem sido mais utilizados recentemente, comprovados por artigos de revisão na literatura reportando sobre o uso de SPE's na área ambientais [5], biológica e farmacêutica [6, 7].

1.2 Medicamentos de disfunção erétil e Citrato de Sildenafil (CS):

A disfunção erétil masculina, também conhecida como impotência sexual, é definida como a persistência ou incapacidade recorrente de um homem para obter e / ou manter uma ereção peniana suficiente para um desempenho sexual satisfatório [8]. De acordo com a “*Massachusetts Male Aging Study*” é estimado que em 322 milhões de homens apresentem disfunção erétil em 2025 [8].

Em 1998, a introdução no mercado de um medicamento oral causou revolução no tratamento para impotência [9]. Este medicamento (Viagra®) ficou sendo por cerca de três anos a única opção de tratamento via oral, até o lançamento do Uprima, no final do ano 2000. Atualmente, o tratamento com medicamentos inibidores da enzima fosfodiesterase tipo 5 (PHD5) é considerado como o mais eficiente para tal finalidade. Existem três inibidores da PHD5 disponíveis, a citrato de sildenafil (CS), tadalafila (Ta) e hidrocloreto de vardenafila (HV)[9]. Na figura 1 são apresentadas as estruturas químicas destes três compostos.

Figura 1. Estruturas químicas dos inibidores da PHD5.



Na tabela 1 são apresentadas algumas informações sobre os medicamentos inibidores da PHD5 comercializados nas drogarias brasileiras, de acordo com informações da bula dos respectivos laboratórios fabricantes [10]. Conforme observado, a diferença básica entre estes três é a duração no efeito do tratamento. De acordo com o “IMS Health”, o Viagra[®] tem cerca de 49% do mercado para tratamentos de disfunção sexual, seguido pelo Cialis[®], que detém 39,7% e o Levitra[®], com 8,6% [11].

Tabela 1. Dados sobre os medicamentos inibidores da PHD5 (Viagra[®], Cialis[®] e Levitra[®])

Medicamento	Laboratório fabricante	Princípio ativo	Dosagens disponíveis	Duração do efeito no organismo
Viagra	Pfizer [®]	CS	25, 50 e 100 mg	Até 5 horas.
Cialis	Lilly Icos [®]	Ta	10 e 20 mg	Até 36 horas.
Levitra	Bayer [®]	HV	5, 10 e 20 mg	Até 5 horas.
Cialis diário	Lilly Icos [®]	Ta	2,5 e 5 mg	Ação constante.
Levitra OD	Bayer [®]	HV	10 mg	Até 5 horas.

Após expirar a patente do Viagra no Brasil em 2010, atualmente existem dez empresas fabricam formulações genéricas do VI aproximadamente, de acordo com um portal de busca de medicamentos comercializados nas drogarias brasileiras [2]. Além disso, atualmente outras inúmeras farmácias de manipulação são credenciadas a comercializar formulações contendo CS. Apesar da entrada dos medicamentos genéricos e manipulados a partir de 2010, o consumo de formulações de CS contrabandeados (do Paraguai, Bolívia, etc.) é muito recorrente no Brasil [12]. Este problema se deve a fatores como o custo bastante reduzido, desnecessidade de receita médica e fácil acessibilidade aos medicamentos por qualquer cidadão (websites da internet e drogarias clandestinas).

Devido à grande presença de formulações farmacêuticas contendo CS, o controle de qualidade é de suma importância. No entanto, não existem métodos analíticos oficiais para a análise de CS em medicamentos, tanto na Farmacopeia Brasileira quanto em outros compêndios internacionais. No entanto, na prática muitas vezes as dosagens de princípios ativos em medicamentos são realizadas por métodos que empregam alguma separação prévia do(s) princípio(s) ativo(s) na formulação, principalmente as metodologias baseadas na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), devido à sua confiabilidade e robustez. Entretanto, o elevado custo por análise (aquisição do cromatógrafo, uso de grandes volumes

de solventes de elevada pureza) e o tempo requerido nas separações cromatográficas instrumentais são inconvenientes em análises de rotina e que podem limitar as análises em muitos laboratórios brasileiros de menor poder aquisitivo (farmácias de manipulação, por exemplo). Neste sentido, a análise de fármacos em medicamentos por métodos eletroanalíticos sem separação prévia dos analitos é uma alternativa bastante viável, devido ao uso de potenciostatos de menor custo, a maior rapidez das análises e à menor quantidade de resíduos gerados por análise.

1.3 Química Eletroanalítica

A química eletroanalítica compreende a um grupo de métodos analíticos baseados nas medidas de propriedades elétricas em solução (Exemplo: corrente, resistência, diferença de potencial, carga elétrica), sendo que alguma que uma destas propriedades deve ter uma relação proporcional com a quantidade do analito a ser monitorado. Em geral, a detecção eletroquímica oferece algumas vantagens frente à detecção com técnicas analíticas de detecção, como [13]:

- As medidas podem ser normalmente realizadas sem purificações ou separações prévias;
- O analito pode interagir diretamente com a superfície do eletrodo de trabalho, tornando desnecessária a adição de reagentes;
- É possível a análise de amostras contendo partículas sólidas dispersas;
- As determinações são realizadas com elevada sensibilidade (baixo limite de detecção);
- Baixo custo de aquisição e manutenção dos equipamentos e materiais utilizado;
- Possibilidade do uso de materiais alternativos de baixo custo e dispositivos miniaturizados.

1.3.1 Células eletroquímicas

Para a realização das medidas eletroquímicas é necessário o uso de um potenciostato para a medida da propriedade elétrica de interesse conectado a uma célula eletroquímica, que pode ser composta basicamente de um reservatório para a acomodação da solução de medida, dos eletrodos de referência (RE), auxiliar (AE) e de trabalho (WE). Usualmente é utilizada uma célula eletroquímica convencional, na qual podem ser usados eletrodos de trabalho sólidos comerciais de diferentes materiais (ouro, carbono vítreo, platina)[14] ou eletrodos alternativos de compósitos de carbono. Em ambos casos, os eletrodos possuem corpo cilíndrico de maiores diâmetros. A Figura 2A apresenta a imagem de uma célula

eletroquímica convencional, na qual possui um volume interno de 20 mL e com tampa adaptável para eletrodos com 6 mm de diâmetro. Como vantagens a célula permite o polimento do WE entre medidas, e a realização de medidas em meio orgânico devido ao material do corpo da célula (vidro) e do corpo do WE. Como desvantagem o conjunto (reservatório e eletrodos) apresenta um maior custo e dimensões maiores, não sendo muito práticos para medidas fora do laboratório.

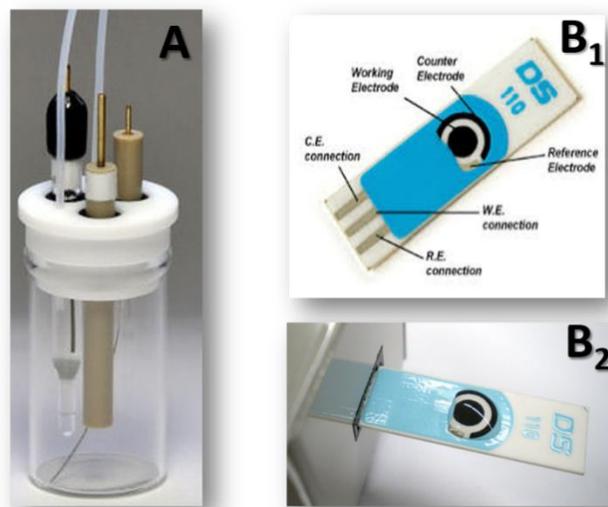
Mais recentemente, o uso de três eletrodos impressos em um mesmo suporte (SPE's) tem sido mais aplicado no atual cenário da eletroanalítica (apesar da tecnologia de "screen-printing" ter sido empregada com sucesso na fabricação de eletrodos desde a década de 90 [15]). Estes SPE's são filmes de tintas ou compósitos condutores após tratamento térmico (cura) depositados sobre um suporte inerte (geralmente de PVC ou cerâmica), sendo parcialmente cobertos por uma segunda camada de um isolante para definir uma área de contato elétrico numa extremidade e outra área para ser a superfície do eletrodo na outra extremidade [15].

Atualmente várias empresas internacionais comercializam SPE's fabricados por máquinas específicas em diferentes configurações de acordo com a aplicação de interesse do cliente. A performance do SPE é altamente dependente da composição do material usado na fabricação, dos procedimentos de pré-tratamento, do par redox usado para avaliar o sensor e das condições de cura da camada impressa [16]. Kadara e colaboradores compararam imagens por microscopia eletrônica de varredura e os sinais eletroquímicos para ferrocianeto de potássio e p-benzoquinona para seis marcas de SPE's de carbono. Os autores concluíram que um maior sinal, reversibilidade, rugosidade e taxa de transferência eletrônica foi observada para os eletrodos das empresas Dropsens® e Kanichi®. No entanto, segundo nossa observação, a empresa Dropsens® [17] é a preferida no mercado brasileiro. Na Figura 2B₁ é apresentada uma imagem de um SPE comercializado pela Dropsens®. Esta empresa comercializa SPE com WE contendo distintos modificadores, como nanotubos de carbono (parede simples e múltipla), grafeno, nanofitas de carbono, fibras de carbono, azul da Prússia, bismuto, dentre outros [14]. Além disto, esta empresa comercializa acessórios para adaptação dos SPE's em células eletroquímicas estacionárias e hidrodinâmicas (camada delgada e jato impingente), bem como alguns modelos de potenciostatos portáteis.

As vantagens associadas a estes SPE é a miniaturização da célula eletroquímica e possibilidade de realizar medidas eletroquímicas com apenas uma gota de solução (Figura 2B₂), aumentando a praticidade e a portabilidade do conjunto. Uma desvantagem do sistema é

a impossibilidade de realizar polimentos da superfície do eletrodo, pois o eletrodo é descartável. Apesar das empresas considerarem isto uma vantagem pois evita a tediosa etapa de polimento do eletrodo, a substituição do SPE após a passivação da superfície do WE é onerosa devido ao custo de aquisição de cada dispositivo para os usuários brasileiros. Além disso, estes SPE em substrato de cerâmica [17] são quebradiços e não permitem a realização de medidas em meio contendo elevada quantidade de solventes orgânicos.

Figura 2. Imagem de uma célula eletroquímica convencional (A) e de uma célula contendo três eletrodos impressos (B_1 e B_2).



Fonte: www.labsolutions.com.br[18] (A); www.dropsens.com (B_1 e B_2)[17].

De maneira a melhorar algumas limitações em custo e resistência (química e mecânica), outros eletrodos impressos não comerciais estão propostos na literatura, recebendo destaque os desenvolvidos por Craig Banks e colaboradores. Em um primeiro trabalho foi proposto o uso de microeletrodos impressos flexíveis de carbono, obtidos a partir da impressão de tintas condutoras de carbono em substrato de poliéster [19]. Deste modo, é obtido um eletrodo não quebradiço, mas descartável. No entanto, como o custo de cada dispositivo é bastante inferior aos comercializados, é possível fazer medidas reproduzíveis apenas substituindo o dispositivo entre medidas. Em outros trabalhos dos mesmos autores é proposto um eletrodo impresso no qual o conjunto de três eletrodos (PRE, AE e WE) são impressos dos dois lados, proporcionando o aumento do sinal analítico e aumentando a

versatilidade do dispositivo, pois pode ser preparado dois WE distintos a partir de tintas de condutoras de composição diferente [20, 21]. Além de boa resistência mecânica, em estudos recentes foi observado que estes eletrodos permitiram a realização de medidas eletroquímicas em meio contendo 99 % de etanol.

1.3.2 Técnicas eletroanalíticas

As técnicas eletroquímicas utilizadas neste trabalho são a voltametria cíclica, a voltametria de onda quadrada e amperometria. Logo será dada uma breve introdução destas técnicas nos parágrafos abaixo.

Nas técnicas voltamétricas é aplicada uma diferença de potencial no WE (versus o RE), sendo registrada a corrente que flui entre o WE e AE. Em função do tempo, este potencial aplicado pode ser constante, como no caso da técnica amperometria ou variável (varredura de potenciais) como no caso das voltametrias (cíclica e pulsada).

Na voltametria cíclica (CV), uma varredura de potenciais cíclica e linear é aplicada no WE, sendo que a corrente é monitorada em certos intervalos de tempo. Esta varredura é descrita em geral pelo potencial inicial, potencial de primeira inversão, potencial de segunda inversão e velocidade de varredura [13]. Como resultado obtém-se um voltamograma cíclico, que é uma curva de potencial *vs.* corrente. Geralmente a CV é utilizada para identificar em qual região de potencial a reação de oxidação ou redução do analito ocorre na superfície do WE. A técnica também fornece informações a respeito da reversibilidade do processo eletroquímico, o número de elétrons envolvidos no processo, transporte de massa do analito (difusional ou adsorptivo), área efetiva do eletrodo, etc. No entanto, a CV não é muito usada para fins de análise eletroquímica, devido à baixa sensibilidade decorrente da elevada corrente capacitiva que sobrepõe a corrente faradaica (oxidação ou redução do analito).

Para obter uma maior razão de corrente faradaica/capacitiva foram então utilizadas as técnicas voltamétricas de pulso, por exemplo a voltametria de pulso normal (NPV), de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Nestas, o incremento de potencial aplicado no WE não é linear, ou seja, a perturbação aplicada é uma sequência de pulsos de potenciais. Deste modo, a idéia nestas técnicas é medir a corrente no momento em que a diferença entre corrente faradaica (interesse) e corrente capacitiva (interferente) seja grande. Esta possibilidade existe, pois, em função do tempo, o decaimento da corrente faradaica é menor do que o decaimento da corrente capacitiva. Deste modo, a detectabilidade das técnicas

de pulso é maior do que a obtida por CV [22]. O modo de aplicação destes pulsos é o que define cada uma destas técnicas.

Na SWV, o pico resultante é proveniente da sobreposição de pulsos de potencial com certa amplitude, largura e frequência. As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos (para o decaimento da corrente capacitiva) e, após derivação, o sinal é a intensidade de corrente resultante[22]. Em outras palavras, as correntes produzidas pelo pulso direto e o inverso são somadas em módulo, e um voltamograma com pico proporcional à concentração é obtido. Uma das grandes vantagens da SWV é a excelente sensibilidade combinada com uma grande velocidade de varredura (100 a 1000 mV s⁻¹) sem perda na resolução dos picos [22].

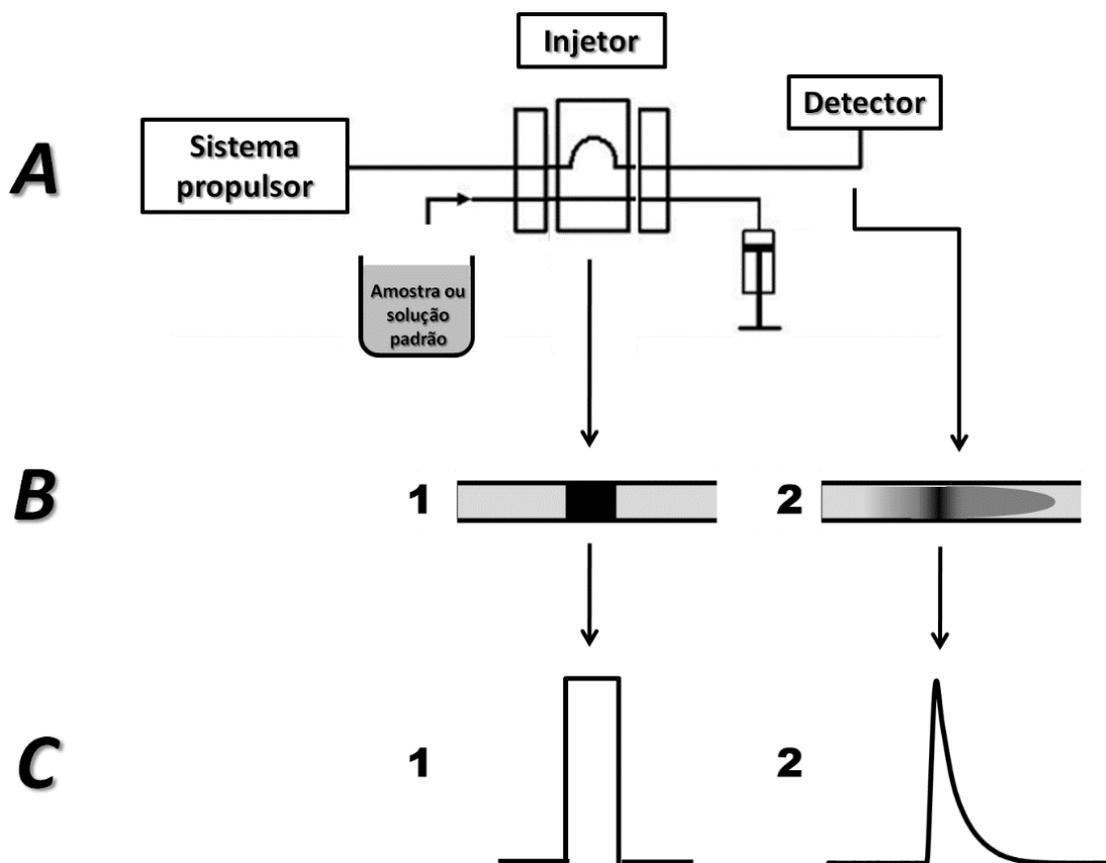
Na amperometria, um potencial constante é aplicado no WE (*vs. RE*) em função do tempo sendo então registrada a corrente da célula eletroquímica. Caso o potencial aplicado seja suficiente será então registrada a respectiva corrente faradaica correspondente à oxidação ou redução do analito na superfície do WE. As correntes referentes a estes processos são monitoradas e podem ser relacionadas com a concentração dos respectivos analitos. A amperometria nada mais é do que uma voltametria a potencial constante[13]. Uma das principais limitações da amperometria e das técnicas eletroanalíticas de modo geral é a adsorção na superfície (passivação) do WE pelo analito, produtos de reações redox do analito ou interferentes presentes na matriz, que diminuem gradativamente o sinal de corrente. Nestes casos, algumas vezes é possível evitar ou minimizar este problema utilizando a amperometria pulsada (PA) ou amperometria de múltiplos pulsos (MPA), no qual será(ão) aplicado(s) pulso(s) de potencial de limpeza alternados ao potencial de registro de corrente [23]. Uma das aplicações das técnicas amperométricas está associada a sistemas hidrodinâmicos, tal como sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) e análise por injeção em batelada (BIA).

1.4 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

O sistema FIA foi proposto inicialmente em 1975 por Ruzicka e Hansen [3], com a idéia da realização de análises químicas continuamente, rapidamente e com baixa manipulação de amostras por parte do analista. Nesta técnica, realiza-se a injeção de uma amostra líquida em um fluxo transportador contínuo, que é constituído por uma solução adequada. A amostra injetada forma uma zona que posteriormente atravessa uma célula em fluxo, no qual um detector mede continuamente o parâmetro físico desejado [3]. Resultados

reprodutíveis e confiáveis podem ser obtidos em FIA, desde que as condições de vazão e volume injetado sejam as mesmas do início ao final do experimento. Um esquema de um sistema FIA de linha única e os sinais obtidos estão apresentados na Figura 3.

Figura 3. (A) Componentes de um sistema FIA típico de linha única. (B) Esquema do gradiente de concentração da solução injetada observado em distintos momentos no fluxo transportador e os (C) respectivos sinais analíticos transientes.



Fonte: Silva, 2012 [24].

O sistema propulsor contém um líquido que irá carregar o pacote da amostrada injetado no percurso entre o sistema propulsor e o detector, durante o movimento deste fluxo. Fluidos podem ser propagados no interior das tubulações do sistema FIA por distintos mecanismos físicos, como propulsão por bomba de pistão, bomba peristáltica ou até mesmo apenas pela força da gravidade. O injetor introduz a amostra ou solução padrão no caminho do sistema que está com o fluxo em movimento, sendo sua eficácia aprovada desde que consiga inserir um determinado volume de amostra na solução transportadora de maneira reprodutível e sem alterar a vazão do sistema FIA. O detector é responsável pela quantificação

do analito conduzido pela solução transportadora, devendo interagir de maneira física ou química com o analito. Os dados obtidos são armazenados e tratados em softwares instalados em computadores conectados ao detector. Os primeiros trabalhos de FIA empregavam detecção espectrofotométrica, porém, hoje na literatura obtém-se FIA (e suas variações) acoplada aos mais diversos detectores (≈ 10000 trabalhos encontrados no portal “web of science” em 03/08/16, pesquisa com a palavra-chave “flow injection analysis”). Os detectores eletroquímicos apresentam algumas vantagens em relação aos demais, como o baixo custo de implementação, alta sensibilidade e simplicidade na construção, sendo os amperométricos os mais utilizados (≈ 1500 trabalhos encontrados no portal “web of science” em 03/08/16, pesquisa com a palavra-chave “flow injection analysis” and amperometry).

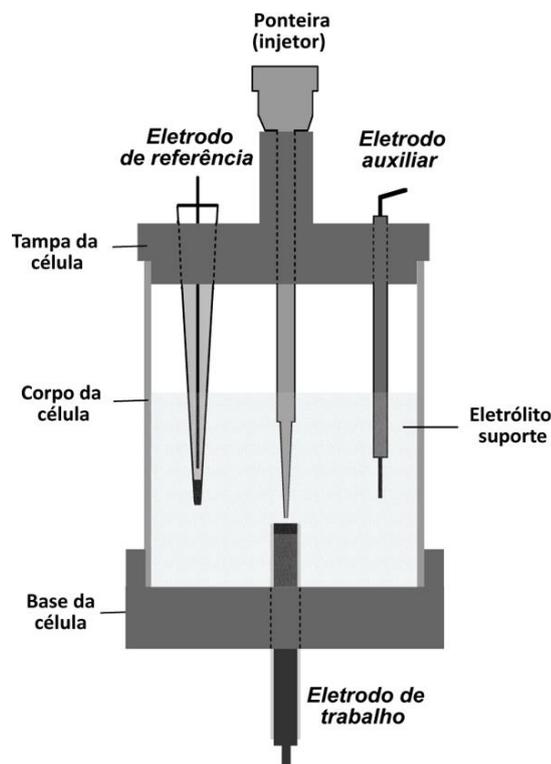
Em sistemas FIA, o sinal obtido é um pico transiente (Figura 3C2) de largura e altura proporcionais à concentração do analito e da vazão e volume injetado no sistema. O perfil deste sinal é explicado devido aos fenômenos que ocorrem quando a amostra entra em contato com a solução transportadora em condição de fluxo. No momento da injeção da amostra líquida no percurso analítico, toda a zona da amostra está na mesma concentração (Figura 3B1). Porém, durante o percurso entre o injetor e o detector, a alíquota da amostra é submetida ao fenômeno conhecido por dispersão (Figura 3B2), que é basicamente proveniente do atrito com as paredes da tubulação e da difusão por concentração. Deste modo, uma zona com maior concentração do analito alcança primeiro o detector e uma zona mais diluída alcança depois o detector (Figura 3C2). A distância percorrida pela amostra, a vazão e o volume injetado, devem ser otimizadas para minimizar ao máximo esta dispersão. Na ausência total de dispersão (condição na prática não observada), os sinais obtidos seriam picos simétricos e sem distorções (Figura 3C1) [25].

Os sistemas FIA se tornaram populares pois aliam várias características interessantes, como a baixa intervenção do analista, baixo consumo de reagentes, reduzido tempo de análise (alta frequência analítica), simplicidade operacional, versatilidade, reprodutibilidade e baixos custos de implementação. Especificamente com a detecção amperométrica, os sistemas FIA aumentam a reprodutibilidade em relação aos sistemas eletroquímicos estacionários, devido ao reduzido tempo de contato entre o analito e a superfície do ET (diminuindo a adsorção no WE) e ao transporte de massa hidrodinâmico, mais reprodutível do que o transporte por difusão [13].

1.5 Análise por Injeção em Batelada (BIA)

BIA é uma técnica analítica proposta em 1991 por Wang e Taha[4] com finalidades semelhantes ao sistema FIA, ou seja, análises rápidas, reproduzíveis e com baixa intervenção do analista. No entanto, em BIA a solução de análise é injetada diretamente sobre a superfície do WE (modo “walljet”) por um injetor manual ou eletrônico, dispensando o uso de uma bomba peristáltica. Além disso, o WE está localizado em uma célula eletroquímica BIA que contém um maior volume de eletrólito suporte. Na Figura 3A é apresentado um esquema de uma célula BIA convencional, própria para uso com eletrodos comerciais de dimensões maiores (RE, AE e WE separados).

Figura 4. Esquema de uma célula eletroquímica de BIA na configuração “walljet”.



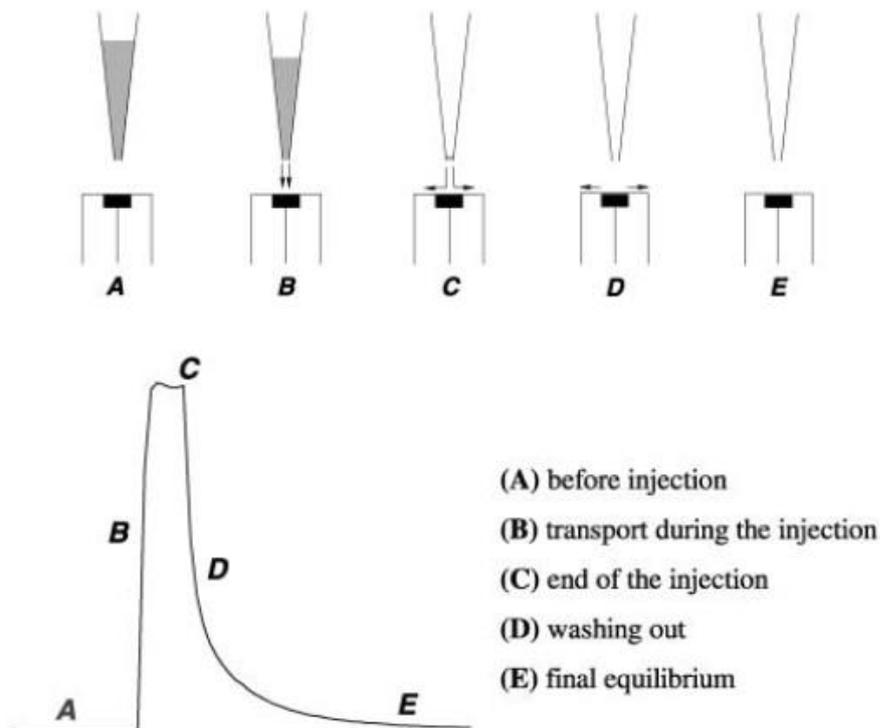
Fonte: Silva, 2012 [24].

Conforme observado na Fig. 4, a célula é preenchida com um maior volume de solução de eletrólito suporte (tipicamente de 80 a 200 mL), para diluir o pacote da solução da amostra após a injeção e detecção e permitir que os três eletrodos tenham contato elétrico entre si. Além disso, em uma célula BIA na configuração “wall jet” o eletrodo de trabalho

(WE) é posicionado na direção oposta à da injeção, ao contrário da posição normalmente usada em células estacionárias. A injeção das soluções de análise pode ser utilizada uma micropipeta convencional ou eletrônica [26], sendo a última a que fornece maior precisão no volume e velocidade de injeção (vazão). Deste modo, operadores com pouca experiência podem efetuar as injeções no sistema de forma reproduzível. A ponteira da micropipeta é acomodada em um orifício na tampa da célula posicionado frontalmente em relação ao WE, para manter constante a distância entre a superfície do WE e a extremidade da ponteira. Em dois orifícios na tampa da célula são fixados o eletrodo auxiliar (AE) e de referência (RE). Opcionalmente pode ser adicionado um agitador magnético ou mecânico, de com objetivo de gerar convecção na célula, aumentando o transporte de massa após a injeção.

Em muitos trabalhos o sistema BIA é acoplado com detecção amperométrica, no qual o sinal é uma corrente de pico transiente similar ao obtido no FIA, de altura proporcional à concentração do analito e às condições de injeção. Este comportamento é ilustrado na Fig. 5.

Figura 5. Etapas operacionais de um sistema BIA com detecção amperométrica.



Fonte: Quintino e Angnes[27]

Conforme apresentado na Fig. 5, as seguintes etapas são observadas:

(A) Antes da injeção: Corrente de fundo constante devido apenas a capacitiva do eletrólito devido à ausência de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução;

- (B) Transporte do analito durante a injeção: Aumento abrupto da corrente faradaica, devido à reação redox do analito transportado mecanicamente pelo injetor até a superfície do WE;
- (C) Final da injeção do analito: Obtenção de um máximo de corrente faradaica (patamar de corrente ou i_{\max}), valor que é constante durante um curto intervalo de tempo;
- (D) Lavagem do ET: Diminuição acentuada da corrente devido ao fim da injeção mecânica da pipeta eletrônica. Este evento é promovido devido à mudança do transporte mecânico para o difusional, no qual o pacote de amostra é muito diluído no eletrólito (≈ 1000 vezes). Se incluído um agitador mecânico ou magnético na célula BIA este decaimento é acelerado devido à convecção que retira as espécies redox mais rápido da superfície do WE;
- (E) Equilíbrio final: Após a diluição completa do analito no eletrólito a concentração do analito é pequena e uniforme em toda a célula BIA, restabelecendo praticamente o mesmo equilíbrio existente antes da injeção da solução Etapa A.

BIA e FIA possuem em comum a elevada frequência analítica, baixo consumo de amostras e reagentes, reduzida contaminação do WE em relação a sistemas estacionários e elevada precisão (no BIA com a pipeta eletrônica). No entanto, FIA é mais versátil pois permite maiores possibilidades para detectar a espécie, como por exemplo realizar a derivatização do analito durante o percurso entre a injeção e o detector [27], pois permite a inserção de reatores e confluências antes de alcançar o detector. Neste ponto o sistema BIA é mais limitado devido a mínima distância entre o injetor e o detector. Entretanto, em grande parte dos trabalhos com detecção eletroquímica essa derivatização não é comum, pois muitos analitos são eletroativos, dispensando a derivatização. No caso da reação redox direta do analito na superfície do WE os sistemas BIA são mais sensíveis, simples, portáteis e geram menos resíduos por análise[27].

Os sistemas BIA não se tornaram tão populares quanto os sistemas FIA. Em pesquisa bibliográfica no portal “web of Science” em 03/08/16 (pesquisa com a palavra-chave “batch injectionanalysis”) foram encontrados apenas 139 trabalhos desde a divulgação em 1991. Provavelmente essa reduzida quantidade de trabalhos em relação ao FIA ocorre pois até o momento praticamente todos os trabalhos com BIA são restritos à detecção eletroquímica. No entanto, aproximadamente um terço destes (53 trabalhos) foram publicados nos últimos cinco anos, uma tendência crescente considerável. Vale ressaltar que aproximadamente a metade destes (76 trabalhos) utilizam a amperometria, detecção utilizada nesta dissertação.

1.6 Eletrodos impressos acoplados em sistemas FIA e BIA

O uso de SPE's acoplados a FIA é uma possibilidade interessante, pois combina a elevada frequência analítica obtida nos sistemas FIA com a praticidade oferecida pelo conjunto de três eletrodos no mesmo substrato tal como nos SPE's. Além disso, o uso do FIA pode aumentar o tempo de vida útil do SPE devido à redução da contaminação da superfície do WE, consequência do menor tempo de contato entre a amostra e a superfície do WE quando comparada a medidas eletroquímicas em sistemas estacionários. Atualmente, a empresa Dropsens® comercializa kits nos quais estão presentes todos os componentes de um sistema FIA (bomba peristáltica, tubulações, injetor, frasco para amostra e descarte) e o detector composto pelo SPE's acomodado em uma célula eletroquímica de jato impingente de acrílico apropriada e o potenciostato (sistema FIA-SPE) [17]. Entretanto, os custos de aquisição deste sistema são onerosos para muitas instituições de ensino e pesquisa brasileiras.

Em uma pesquisa bibliográfica realizada em 03/08/16 (portal "Web of Science", palavras-chave: "screen printed" and "flow injection analysis", pesquisa por título) foram encontrados 32 trabalhos diversos propondo sistemas FIA-SPE para análise de analitos diversos em matrizes biológicas [28, 29], ambientais [30, 31], cosméticas [32] e alimentícias [33, 34]. Especificamente trabalhos para determinação de fármacos em formulações farmacêuticas foram encontrados poucos trabalhos [35-37].

Fanjul-Bolado e colaboradores [35] utilizaram um sistema FIA com um SPE de carbono não tratado para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas, no qual foi obtido uma elevada reprodutibilidade para injeções sucessivas de paracetamol (RSD = 2%, n = 15), um limite de detecção dez vezes menor quando comparado com a quantificação de PA por detecção voltamétrica e ausência de efeito de memória.

Stefano *et al.* [36] usaram uma pequena célula FIA própria para acomodar um SPE de carbono para a determinação simultânea de paracetamol e naproxeno em medicamentos empregando a detecção amperométrica de múltiplos pulsos. Segundo os autores o sistema é de baixo custo pois permite o uso do mesmo SPE durante um dia de trabalho, além de apresentar elevada seletividade, sensibilidade, alta frequência analítica (90 h^{-1}). Em um segundo trabalho, Stefano *et al.* [37] usaram o mesmo sistema empregando um SPE de nanotubos de carbono para determinação de ciprofloxacina em antibióticos, no qual foi observada uma elevada precisão (RSD < 5%), baixa detecção (< $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$), ampla faixa linear (até $200 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ausência de efeito de memória.

A primeira proposta de aliar a praticidade e portabilidade dos SPE'se da célula BIA é bastante recente (2014). No trabalho divulgado por Tormin e colaboradores [38] foi proposto todo um sistema portátil, composto por uma célula BIA adaptada para SPE's (BIA-SPE), uma pipeta eletrônica, notebook e potenciostato portátil. A potencialidade do sistema BIA-SPE foi demonstrada para a detecção amperométrica de diclofenaco e peróxido de hidrogênio e a detecção de metais pesados (Pb, Cu e Hg) por voltametria de redissolução anódica. A vantagem deste sistema é a possibilidade de levar todo o sistema analítico para realizar análises fora do laboratório, visto que todo o conjunto é operado utilizando bateria como fonte de energia. Além disso, o sistema é rápido, robusto e reproduzível pois permite o encaixe perfeito da micropipeta eletrônica e a passivação do WE é minimizada devido ao seu pequeno tempo de contato com a amostra. Posteriormente os autores em parceria com a Dropsens colocaram uma versão deste sistema BIA-SPE disponível comercialmente [17].

Apesar das vantagens das células supracitadas, a dependência de mão de obra especializada para a construção da célula (tornearia) ou a aquisição das dispendiosas células comerciais são limitantes. Neste sentido, Caramit *et al.* [39] propuseram uma célula construída no próprio laboratório, a partir de um simples corte lateral em um cilindro de acrílico para a adaptação do SPE. Esta célula foi empregada para a determinação de carbendazim, catecol e hidroquinona com detecção amperométrica e apresentou maior estabilidade e precisão para medidas amperométrica sem meio de etanol do que um sistema FIA empregando o mesmo SPE (0,4 % vs 5,0 %). Além disso, este sistema BIA-SPE alternativo apresentou baixo volume por injeção (30 μL), baixos LOD e alta frequência analítica (200 h^{-1}) e pode ser facilmente construída em qualquer laboratório. Recentemente Dias *et al.*[40] propuseram uma célula BIA obtida por impressão em 3D adaptada para SPE's para a determinação de glicose. O SPE foi utilizado para detectar o peróxido de hidrogênio gerado após reação entre a glicose e a enzima glicose oxidase (imobilizada previamente em papel). A grande vantagem da célula BIA impressa em 3D é o baixíssimo custo e a rápida impressão no próprio laboratório.

Também empregando BIA-SPE, Stefano *et al.*[37] determinaram ciprofloxacina em antibióticos com detecção amperométrica. Neste foi observado uma maior frequência analítica e sensibilidade em relação ao FIA-SPE, devido às maiores velocidades de dispensa da pipeta eletrônica utilizada no BIA em relação à bomba peristáltica usada no FIA. Os outros trabalhos com BIA-SPE na literatura foram realizados para a determinação de metais em combustíveis

por voltametria de redissolução anódica [41, 42], no qual a pipeta eletrônica controla o transporte dos metais na etapa de deposição, substituindo a agitação magnética convencional.

1.7 Revisão bibliográfica: Métodos para a determinação de CS em medicamentos

Apesar das formulações farmacêuticas contendo CS estarem presentes no mercado mundial a algum tempo (Viagra[®] a 18 anos e genéricos a 6 anos), até o momento não existem métodos oficiais para o controle de qualidade do CS na Farmacopeia Brasileira e em outros compêndios internacionais. Deste modo, é imprescindível o desenvolvimento de metodologias analíticas que proporcionem o controle de qualidade dos comprimidos contendo o princípio ativo CS, de maneira a garantir a segurança e saúde dos consumidores.

Em pesquisa bibliográfica em 03/08/16 no portal “web of Science” foram encontrados 56 trabalhos sobre métodos analíticos para medicamentos contendo CS em geral (palavra-chave: “sildenafil citrate”, área: “chemistry analytical”). Sendo assim, a pesquisa engloba tanto trabalhos que objetivam a análise interna (análise de princípios ativos qualitativamente e quantitativamente) quanto a análise externa (análise de comprimidos por imagens ou técnicas espectroscópicas). Vale ressaltar que as publicações envolvendo análise externa tem um enfoque forense, geralmente objetivando a discriminação entre comprimidos verdadeiros, contrabandeados e falsificados. No entanto, como este trabalho não tem estes objetivos, os próximos parágrafos irão resenhar sobre métodos para dosagem de CS em formulações farmacêuticas, ou seja, com um enfoque puramente para controle de qualidade.

Dentre os trabalhos da literatura para a determinação de CS em medicamentos, é possível observar uma predominância de métodos cromatográficos, espectrofotométricos (sem separação) e eletroquímicos, nesta sequência. O método cromatográfico mais recente utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção óptica no ultra-violeta (HPLC-UV) para a determinação simultânea de CS e mais treze inibidores da PHD5 (Ta, HV, etc.) em medicamentos e suplementos [43]. Embora os métodos cromatográficos sejam bastante versáteis pois permite a determinação simultânea inclusive em amostras mais complexas, o elevado custo de aquisição e manutenção dos cromatógrafos e os elevados tempos requeridos nas separações são limitantes em muitos laboratórios de análise do Brasil.

Um método direto sem separação prévia baseado na reação do CS com três distintos corantes em meios tamponados foi proposto para a determinação de CS em medicamentos através da espectroscopia no visível (colorimetria) [44]. Apesar dessas técnicas apresentarem

custo reduzido em relação às cromatográficas, muitas vezes os limites de detecção alcançados pela espectrofotometria são maiores do que os obtidos pelos métodos eletroquímicos.

Na literatura foram encontrados alguns métodos eletroquímicos para a determinação de CS em medicamentos. Dentre estes, foram propostos vários métodos estacionários para a determinação de CS em formulações farmacêuticas e fluídos biológicos utilizando as voltametrias de pulso associadas ou não com etapa de pré-concentração na superfície do eletrodo (métodos de redissolução) e empregando vários tipos de eletrodo: gota pendente de mercúrio [45, 46], filme de bismuto [47], filme de chumbo [48], carbono vítreo (CV) [49, 50], pasta de diamante [51], pasta de diamante modificada [52] e CV modificado com óxido de grafeno [53], diamante dopado com boro (BDD) [54] e SPE's descartáveis [55, 56]. Embora os métodos de redissolução atinjam baixos LOD's, justificáveis para a determinar CS apenas em fluidos biológicos, a frequência analítica é baixa (ocasionada pela lenta etapa de deposição). Além disso, mesmo quando é efetuada apenas a varredura voltamétrica (sem etapa de deposição), muitos eletrodos sólidos estão sujeitos à passivação devido à adsorção superficial de espécies ou produtos redox, tornando necessário o polimento, ativação ou substituição dos WE(no caso dos SPE's) entre medidas.

Com o objetivo de aumentar a frequência analítica e reduzir a passivação do eletrodo de trabalho, Lopes et al. [57] realizaram o doseamento de CS em medicamentos empregando um sistema FIA e eletrodo de BDD com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (MPA). Neste trabalho foi obtida uma ótima precisão ($RSD < 0,2 \%$, $n = 10$) devido à injeção reprodutível do injetor do sistema FIA e da estabilidade da superfície do eletrodo de BDD e um baixíssimo limite de detecção ($0,45 \mu\text{mol L}^{-1}$). Apesar destas vantagens em relação aos sistemas estacionários, o sistema FIA com a célula eletroquímica utilizada (três eletrodos separados) está mais sujeito a erros operacionais como vazamento, bolhas, ruídos, podendo então comprometer a robustez do sistema.

Neste sentido, a detecção de CS em célula BIA própria para acomodar apenas o substrato que contém os três eletrodos impressos (SPE) poderia aumentar bastante a robustez e a portabilidade do sistema em relação aos sistemas FIA convencionais. Além dessa vantagem, o sistema BIA-SPE foi proposto recentemente na literatura e até o momento não foi publicado nenhum trabalho para a determinação de fármacos empregando o sistema BIA-SPE, sendo então um dos motivadores para o desenvolvimento deste projeto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas de para determinação citrato de sildenafil (CS) em medicamentos de disfunção erétil empregando eletrodos impressos (SPE) em sistema estacionário com detecção por voltametria de onda quadrada e em sistemas hidrodinâmicos sendo acoplados a sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA-SPE) e a sistemas de análise por injeção em batelada (BIA-SPE), ambos com detecção amperométrica.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Construção de uma célula eletroquímica BIA e FIA adaptada para o posicionamento do eletrodo impresso;
- ✓ Estudar o comportamento eletroquímico do CS na superfície de distintos eletrodos impressos comerciais e eletrólitos suporte;
- ✓ Otimizar os parâmetros da voltametria de onda quadrada (frequência e amplitude);
- ✓ Otimizar os parâmetros do sistema BIA e FIA com detecção amperométrica (potencial de trabalho, vazão e volume injetado);
- ✓ Estimar os parâmetros de confiabilidade analítica para as três metodologias propostas (sensibilidade, faixa linear e limite de detecção);
- ✓ Realizar o doseamento de CS em algumas formulações farmacêuticas comerciais (Viagra e genéricos) através das três metodologias propostas;
- ✓ Validar os resultados comparando com as análises realizadas por HPLC.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes foram de pureza analítica, sendo o padrão do fármaco CS da Sigma-Aldrich®. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada obtida do sistema de purificação CQA Química GEHAKA OS10LXE. O tampão Britton-Robinson 0,04 mol L⁻¹ (TBR) foi preparado com ácidoacético, ácido bórico e ácido fosfórico. O ajuste do pH desejado foi realizado com hidróxido de sódio (Vetec), na concentração de 0,2 mol L⁻¹.

As soluções estoque do fármaco CS foram obtidas a partir da dissolução do padrão sólido pulverizado em água deionizada. Detalhadamente, uma massa do padrão foi pesada em balança analítica (precisão de 0,0001 g) e posteriormente dissolvida em água em um balão volumétrico. Para as medidas estacionárias, a solução estoque foi diluída por adição(ões) de alíquota(s) da mesma solução estoque do padrão de CS com uma micropipeta diretamente no eletrólito suporte. Para as medidas hidrodinâmicas (BIA e FIA), cada diluição do padrão ou amostra foi feita em pequenos frascos Eppendorf® distintos, preparadas pela adição de volumes distintos em cada frasco, completados até o limite (2,0 mL) com eletrólito suporte. Posteriormente, estas soluções foram injetadas nos sistemas BIA ou FIA.

O CS foi quantificado em cinco formulações farmacêuticas: Viagra® Pfizer (A₁) e genéricos Eurofarma (A₂), EMS (A₃), Medley (A₄) e Neoquímica (A₅). A dosagem de CS rotulada foi de 50 mg para todas as formulações. Todas as amostras foram adquiridas em drogarias locais. Para a análise, os comprimidos presentes em uma cartela (4 unidades) foram triturados com auxílio de almofariz e pistilo. Posteriormente uma massa do pó foi pesada e dissolvida no eletrólito suporte, denominada solução estoque. Nas análises por voltametria estacionária, a solução estoque foi diluída na célula eletroquímica e em seguida adicionou-se volumes apropriados da solução estoque do padrão de CS. Deste modo o CS foi quantificado por curva de adição padrão. Nas análises por BIA e FIA a solução estoque diluída apropriadamente foi injetada nos sistemas após a injeção dos padrões de CS, sendo então quantificada por curva de calibração externa.

3.2 Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram realizadas com potenciostato portátil Dropsens® µStat400 interfaceado a um computador contendo o software Dropview8400®.

Como sensores eletroquímicos foram utilizados os SPE's da empresa Dropsens[®] [17], dispositivos que contém os eletrodos de pseudo-referência (PRE), auxiliar (AE) e de trabalho (WE) no mesmo substrato. Em todos os dispositivos, o EPR e EA era fabricado de compósito de prata e carbono, respectivamente. No entanto, cada dispositivo avaliado apresentava um WE: Carbono (C) não modificado; Carbono modificado com: a) nanotubo de parede simples (SWCNT); b) nanotubo de parede múltipla (MWCNT); c) Grafeno (Gr); d) Polianilina (PA). A área geométrica de todos os WE foi de 0,1257 cm² (r = 2 mm). Os SPE's foram utilizados nas medidas voltamétricas estacionárias, na qual cada SPE foi mergulhado em uma célula cilíndrica contendo o eletrólito suporte ou em medidas hidrodinâmicas com detecção amperométrica, na qual o SPE foi acomodado em uma célula de BIA ou FIA (item 3.3).

Os métodos propostos foram comparados com metodologia baseada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os experimentos foram realizados em um cromatógrafo líquido da Shimadzu (Modelo Prominence LC 20 AD) com detector no ultra violeta com arranjo de diodos (SPD-M20A), injetor automático (SIL-10AF), bomba de pistão LC-6Adx3, coluna C18 Shim-Pack XROD de 30 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno com temperatura controlada (forno CTO-20A). Os experimentos por HPLC foram conduzidos no modo isocrático com fase móvel contendo 100 % de metanol.

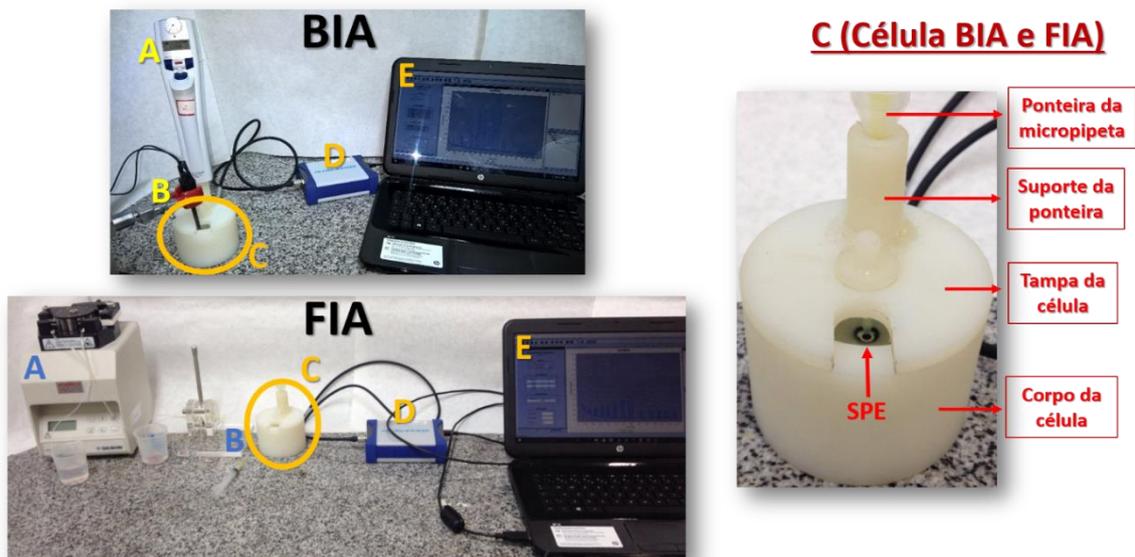
3.3 Sistemas BIA e FIA

Na Fig. 6 é mostrada uma figura dos sistemas BIA e FIA para SPE. O sistema BIA é composto por uma micropipeta eletrônica Eppendorf[®] Multipette Stream (Fig. 6A) encaixada a uma ponteira do fabricante para a injeção de volumes de 10 a 1000 µL das soluções (padrão e amostra) e um agitador mecânico (Fig. 6B) construído em laboratório que permite controlar a velocidade de rotação do eletrólito dentro da célula de acordo com a voltagem selecionada em uma fonte universal conectada (intervalo de 3 a 12 V). O sistema FIA é composto por uma bomba peristáltica Gilson[®] modelo minipuls3 (Fig. 6A), tubos de propulsão (Tygon), tubos para conexões de polietileno com diâmetro interno de 1 mm para linhas de condução e injetor comutador manual de acrílico construído pelo CENA-USP (Fig. 6B) com alça de amostragem dependente do tamanho do tubo de polietileno.

A célula para SPE possui o corpo e base do polímero PVC e foi construída em tornearia local. A célula tem um reservatório de aproximadamente 80 mL de solução. Conforme pode-se observar (Fig. 6C) a tampa da célula possui um suporte na forma de

cilindro com altura superior em relação à tampa da célula. Deste modo, quando a célula está acoplada ao sistema BIA, é possível encaixar a ponteira da micropipeta em distância praticamente fixa em relação à superfície do WE do SPE, evitando com que ocorram pequenas mudanças na posição inicial do injetor. Deste modo, aumenta a possibilidade de obter boa repetibilidade do sistema. Já quando a célula está acoplada à FIA, apenas a ponteira (não encaixada na micropipeta) serve como suporte para inserir a tubulação do FIA até a extremidade de menor diâmetro da ponteira, permitindo que o fluxo encontre a superfície do WE em posição praticamente constante. Na parte inferior da célula está localizado o SPE em posição frontal ao injetor. O contato entre o SPE e a base da célula é feito pressionando o SPE contra um anel de borracha (“o-ring”) que se encaixa em furo previamente deixado na base da célula. Este “o-ring” tem um diâmetro um pouco maior do que o tamanho dos três eletrodos do SPE, permitindo a exposição do eletrólito (e soluções injetadas por FIA ou BIA) aos três eletrodos do dispositivo quando a célula está preenchida. Esta célula possui configuração semelhante ao primeiro sistema BIA-SPE proposto inicialmente [38], sendo robusta e prática pois permite o fácil posicionamento em bancadas de laboratório ou em qualquer superfície horizontal (dispensando o uso de suporte). Além disso, o material do corpo da célula é um polímero com resistência mecânica e química, sendo difícil quebrá-la após queda acidental e permite realizar medidas eletroquímicas em meios orgânicos.

Figura 6. Figura dos componentes dos sistemas BIA (A: Micropipeta eletrônica; B: Agitador mecânico), FIA (A: Bomba peristáltica; B: Injetor comutador) e componentes em comum para ambos sistemas (C: Célula eletroquímica “walljet”; D: Potenciostato portátil; E: Notebook).

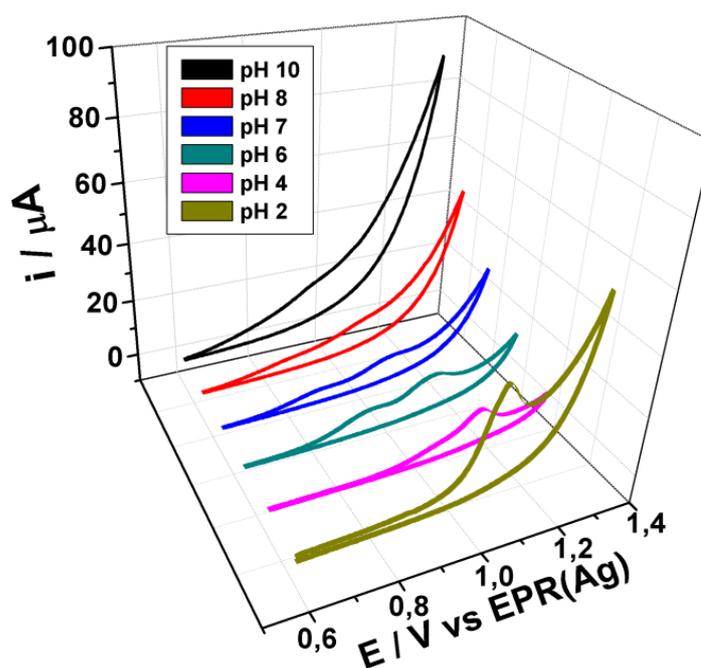


4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estudo de pH

Para a determinação de CS inicialmente foi necessário realizar um estudo para qual(is) é(são) o(s) potencial(is) no(s) qual(is) o CS apresentava correntes de oxidação e/ou redução frente ao SPE. Para este estudo inicial, um SPE de carbono não modificado (SPE-C) foi submetido a medidas por voltametria cíclica (VC) em meio de diferentes eletrólitos suporte. Os eletrólitos avaliados foram soluções tampão Britton Robinson (TBR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em distintos pHs: 2, 4, 6, 7, 8 e 10. Os voltamogramas cíclicos obtidos são mostrados na Figura 7.

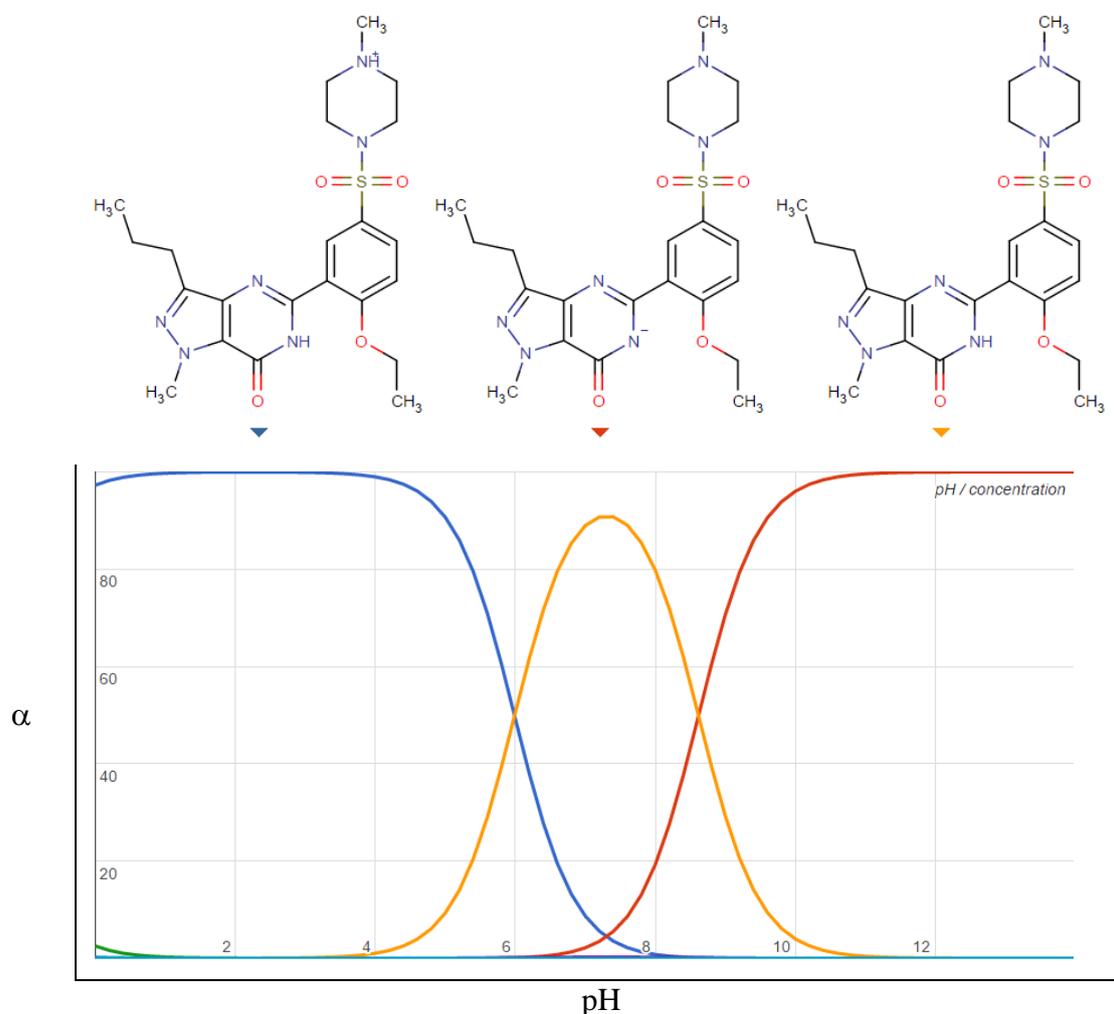
Figura 7. Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de CS $75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ no SPE-C em distintos tampões BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2 a 10). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .



Como apresentado nos voltamogramas cíclicos na Fig. 7, em pH 2 o CS apresentou um pico anódico irreversível em +1,1 V com corrente mais pronunciada. Este maior sinal em pHs menores corrobora com resultados obtidos em outros trabalhos que detectaram CS em outros materiais de eletrodo, como carbono vítreo (GC) [49] e BDD [54, 57]. No entanto, nestes WE foram observados dois picos anódicos em potenciais distintos (+1,0 V e +1,2 em GC e +1,6 V e +2,1 V em BDD), devido ao maior intervalo de trabalho. Como no SPE-C a janela de trabalho é reduzida, devido à decomposição do eletrólito ou superfície do WE em

potenciais acima de +1,2 V, neste SPE foi observado apenas o primeiro processo anódico em pH 2. No entanto, neste SPE foram também observados dois picos anódicos menos pronunciados nos pHs 4, 6, 7 e 8, porém em potenciais menos positivos do que os obtidos para GC. Na literatura o mecanismo sugerido é de que o primeiro processo anódico corresponde à oxidação do anel piperazínico do CS protonado em pHs abaixo do pKa (5,7). Já o segundo processo anódico corresponde a adsorção-dessorção do produto gerado no primeiro processo anódico [49]. Para buscar entender um pouco melhor os fenômenos observados, na Figura 8 é apresentada uma curva de distribuição das espécies de CS predominantes no equilíbrio em função do pH.

Figura 8. Curva de distribuição das espécies de sildenafil em função do pH.



Fonte: www.chemicalize.org [58].

Conforme proposto na literatura [49], a primeira oxidação de CS ocorre no anel piperazínico protonado. Logo, como em pHs abaixo do pK_{a1} do CS (5,7) existe uma maior

fração de moléculas protonadas (Fig. 8), uma maior corrente anódica é observada em pHs mais baixos. No entanto, como em pHs entre o pK_{a1} e pK_{a2} (5,7 e 8,4) prevalece a espécie neutra do CS no equilíbrio, as correntes observadas são menores. Logo, como o SPE-C apresentou maior corrente de pico em TBR pH 2, este eletrólito foi utilizado nas medidas estacionárias voltamétricas e nas medidas hidrodinâmicas amperométricas (BIA e FIA).

Posteriormente foi realizado o estudo da área efetiva dos distintos eletrodos impressos avaliados: SPE-C, SPE-MWCNT, SPE-SWCNT, SPE-Gr e SPE-PA. Este estudo é importante para se avaliar o aumento da área ativa em função da presença do modificador de carbono, que aumenta a rugosidade da superfície do WE e consequentemente a taxa de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução. No estudo da área ativa foi utilizada a técnica de voltametria cíclica e a equação de Randles-Sevcik (Equação 1), que relaciona a área ativa com a corrente de pico para sistemas reversíveis com transporte de massa controlado por difusão.

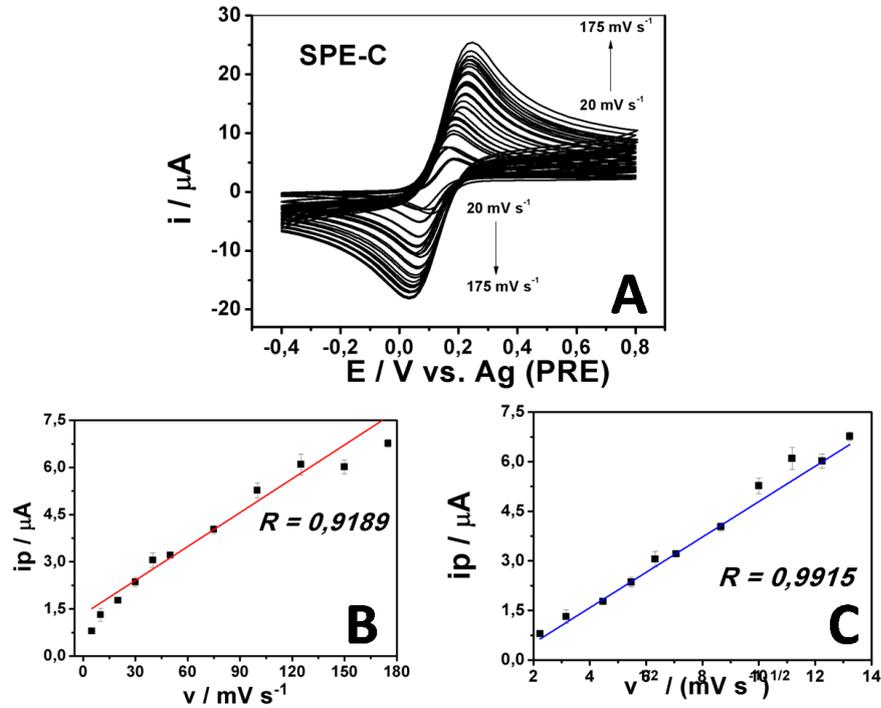
$$i_p = 2,687 \times 10^5 n^{3/2} AD^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad \text{Equação 1}$$

Na qual:

- | | |
|---|--|
| - i_p : corrente de pico (Ampere) | - D: coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) |
| - n: número de elétrons na reação redox (adimensional); | - C_0 : concentração do analito oxidado ou reduzido (mol cm^{-3}) |
| - A: área do eletrodo (cm^2) | - v: velocidade de varredura (V s^{-1}) |

Deste modo, inicialmente foram realizados voltamogramas cíclicos em solução de ferrocianeto de potássio - $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e eletrólito KCl para verificar se o comportamento do SPE-C responde ao comportamento previsto pela literatura, de sistema reversível e transporte de massa controlado por difusão. Sendo assim, foram realizados os voltamogramas cíclicos (VC's) para o SPE-C em distintas velocidades de varredura (Fig. 9A), na qual é possível observar uma melhor dependência linear entre a raiz quadrada de varredura (Fig. 9C) do que com a velocidade de varredura (Fig. 9B), indicando um processo controlado por difusão. Além disso, o ferrocianeto apresentou uma diferença de potencial de pico (ΔE_p) de 80 mV (na velocidade de 20 mV s^{-1}), indicando um comportamento reversível na superfície do SPE-C. Logo, o comportamento do $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na superfície do SPE-C corroborou com o comportamento previsto na literatura para este sistema.

Figura 9. (A) VC's para ferrocianeto de potássio 1 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ em distintas velocidades de varredura (n = 3) e dependência da corrente de pico anódica média (± RSD) obtida com a velocidade de varredura (B) e raiz quadrada de varredura (C).



Posteriormente, CV's em distintas velocidades de varredura também foram conduzidos para os outros eletrodos impressos avaliados (SPE-MWCNT, SPE-SWCNT, SPE-Gr e SPE-PA). Assim como para o SPE-C, as reversibilidades e os processos controlados por difusão também foram observados para estes eletrodos. No entanto, usando a equação de Randles-Sevcik rearranjada (Equação 2), é possível calcular a área ativa do eletrodo a partir de valores tabelados para este experimento ($C_0 = 1 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$, $D_{\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{KCl}0,1\text{molL}^{-1}} = 6,39 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e os valores empíricos dos respectivos coeficientes angulares das curva de i_p vs $v^{1/2}$ para cada SPE. Os coeficientes angulares das curvas e as respectivas áreas ativas calculadas para cada SPE são apresentados na Tabela 2.

$$A = \frac{i_p}{v^{1/2}} \times \frac{1}{2,687 \times 10^5 n^{3/2} D^{1/2} C_0} \quad \text{Equação 2}$$

Tabela 2. Coeficientes angulares das curvas i_p vs $v^{1/2}$ e respectivas áreas eletroquimicamente ativas (AEA) para os distintos SPE's.

Eletrodo Impresso	Coeficiente angular ($A / V^{1/2}s^{-1/2}$)	AEA (mm^2)
SPE-C	$5,39 \times 10^{-5}$	7,94
SPE-MWCNT	$5,59 \times 10^{-5}$	8,25
SPE-SWCNT	$3,45 \times 10^{-5}$	5,08
SPE-Gr	$6,74 \times 10^{-5}$	9,93
SPE-PA	$4,84 \times 10^{-5}$	7,13

De acordo com a Tabela 2, dentre todos os eletrodos impressos, observa-se uma maior AEA para o eletrodo modificado com grafeno (SPE-Gr) e uma menor AEA para o eletrodo modificado com nanotubos de parede simples (SPE-SWCNT). No entanto, nota-se que apenas os modificadores de nanotubo de parede múltipla (MWCNT) e grafeno (Gr) promoveram um pequeno aumento na AEA em relação ao eletrodo de carbono não modificado (C), sendo de 4 % e 25 %, respectivamente. Além disso, todos os eletrodos apresentaram uma AEA menor do que a área geométrica do WE ($12,57 \text{ mm}^2$; $\text{diâmetro}_{WE} = 4 \text{ mm}$), provavelmente devido ao eletrodo impresso ser fabricado a partir de uma tinta condutora composta também por um aglutinante não condutor.

Após estes estudos iniciais, foi necessário então desenvolver a primeira metodologia eletroquímica para determinar o CS em medicamentos. Deste modo, inicialmente foi realizada a detecção de CS por voltametria de onda quadrada (SWV) em uma célula eletroquímica estacionária, aparato usado em vários trabalhos com SPE's. A SWV foi a técnica voltamétrica escolhida por aliar uma elevada detectabilidade, baixa corrente capacitiva com alta velocidade varredura.

4.2 Detecção de CS empregando a SWV estacionária

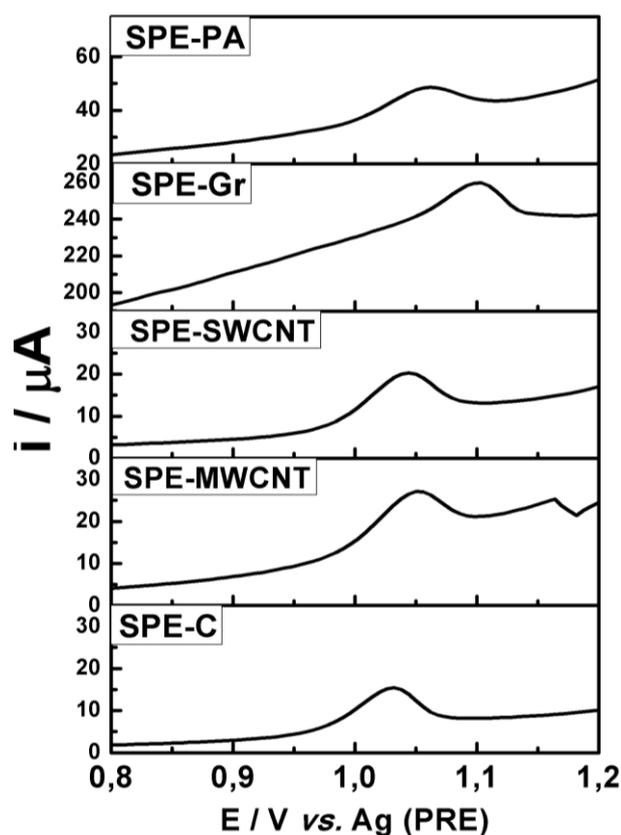
De modo a detectar o CS com uma maior detectabilidade analítica, os parâmetros da SWV, como frequência (f), amplitude (E_{sw}) e incremento de potencial (ΔE_s) foram então otimizados. A Tabela 2 resume os intervalos avaliados de cada parâmetro e a respectiva condição otimizada, escolhida considerando uma boa relação entre a corrente de pico e baixa corrente capacitiva. Este estudo foi realizado empregando um SPE-C.

Tabela 3. Intervalos estudados e condição otimizada para cada variável da SWV (frequência, amplitude e incremento de potencial). Condições: CS 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, TBR (pH2) e SPE-C.

Parâmetro	Intervalo avaliado	Condição otimizada
Frequência (f / Hz)	10-70	20 Hz
Amplitude (A / mV)	10 - 100 mV	25 mV
Incremento de potencial (ΔE_s / mV)	1-10 mV	3 mV

Após a escolha dos melhores parâmetros da SWV, a resposta de CS nos distintos SPE's foi então avaliada de maneira a escolher o sensor que apresentasse boa detectabilidade e reprodutibilidade. A Figura 10 apresenta os voltamogramas de CS em meio de solução de CS 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em TBR pH2 para SPE-C, SPE-MWCNT, SPE-SWCNT, SPE-Gr e SPE-PA.

Figura 10. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em meio de solução de CS 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de TBr pH 2 para distintos SPE's. Condições_{swv}: f: 20 Hz, A: 25 mV, Step: 3 mV.

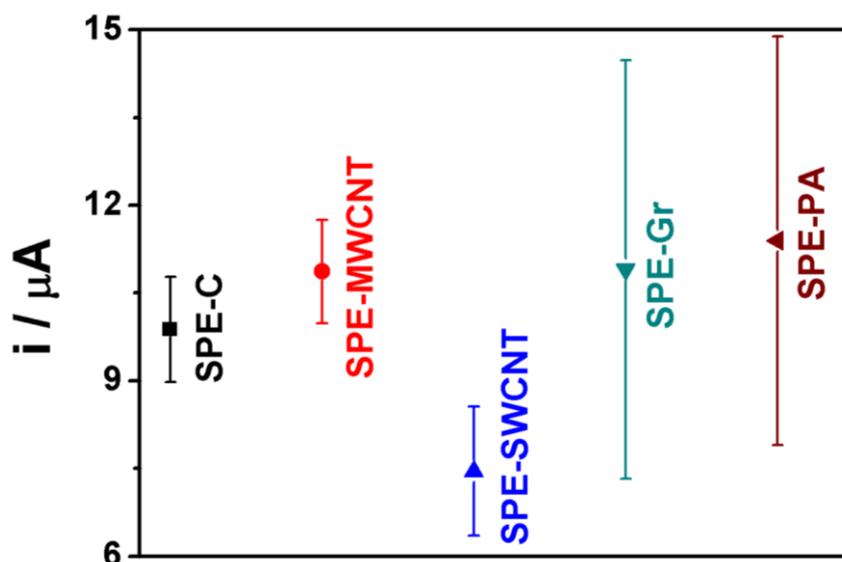


Conforme os voltamogramas da Fig. 10, em todos os SPE a oxidação do CS ocorre em um potencial de pico de +1,05 V (exceto o SPE-Gr, com um $E_{p_a} = +1,10$ V). Logo, a presença dos modificadores com grupos funcionais de superfície não causou nenhum efeito catalítico

para CS em relação ao eletrodo não modificado de SPE-C. Além disso, o SPE-Gr apresentou correntes de fundo elevadas ($> 200 \mu\text{A}$), devido provavelmente à fraca frágil superfície do WE, que visivelmente desprendia os microgrânulos de grafeno após poucas medidas.

Para avaliar a repetibilidade de cada sensor, dez medidas por SWV nas mesmas condições anteriores foram realizadas em sequência, sendo realizada uma breve agitação magnética por 20 s entre cada medida voltamétrica. Na Figura 11 são apresentadas as correntes anódicas médias e os respectivos RSD para cada eletrodo impresso. Conforme apresentado, em todos os SPE modificados as correntes anódicas médias para CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram de aproximadamente $11 \mu\text{A}$, com exceção do SPE-SWCNT que apresentou o menor sinal dentre todos os avaliados. No entanto, os RSD obtidos para o SPE-Gr e SPE-PA foram de aproximadamente 30%, demonstrando pobre reprodutibilidade entre medidas. Deste modo, o SPE-MWCNT aliou a maior corrente de pico com maior precisão (RSD = 9 %). No entanto, o eletrodo impresso não modificado (SPE-C) apresentou desempenho muito próximo ao do MWCNT em precisão e em sinal, com uma corrente média apenas 10 % menor que o SPE-MWCNT. Além disso, considerando que o custo de cada SPE-MWCNT é quase três vezes maior do que o SPE-C (R\$ 32,00 vs. R\$ 13), o eletrodo não modificado foi selecionado para a detecção de CS.

Fig. 11. Correntes de pico médias (\pm RSD) para os distintos SPE's obtidas para dez voltamogramas sucessivos de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de TBR pH 2.



Outro componente avaliado no desenvolvimento do método estacionário para detecção de CS em SPE foi verificar a influência de surfactantes na resposta eletroquímica do CS. Na

literatura estão publicados alguns trabalhos empregando surfactantes catiônicos, aniônicos ou neutros para a determinação de analitos em diversas matrizes [59-61]. Esses surfactantes têm sido empregados para intensificar as correntes de pico (aumento da transferência de carga na interface eletrodo/solução), melhorar a separação de picos voltamétricos em determinações simultâneas, aumentar a solubilidade do analito no eletrólito suporte e/ou contornar problemas advindos da contaminação da superfície do WE.

Para verificar o efeito desses tensoativos, voltamogramas de onda quadrada foram realizados na presença de soluções contendo CS e surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS), CS e surfactante neutro Triton X 100 (TX-100) e CS com surfactante catiônico brometo de cetil trimetil amônio (CTAB). As estruturas dos três surfactantes e os SWV obtidos neste estudo são apresentadas na Figura 12 e 13, respectivamente.

Figura 12. Estrutura química dos surfactantes SDS, TX-100 e CTAB.

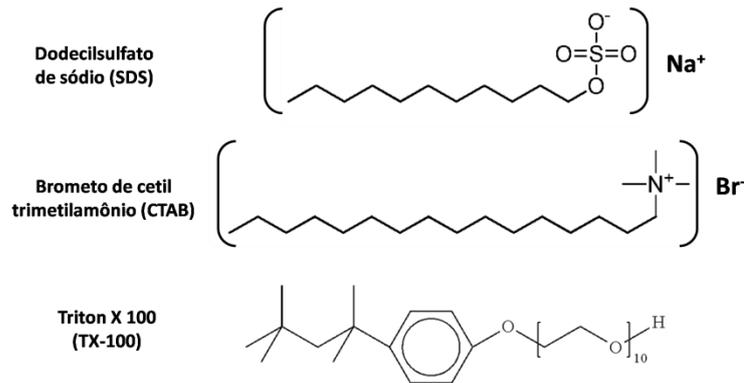
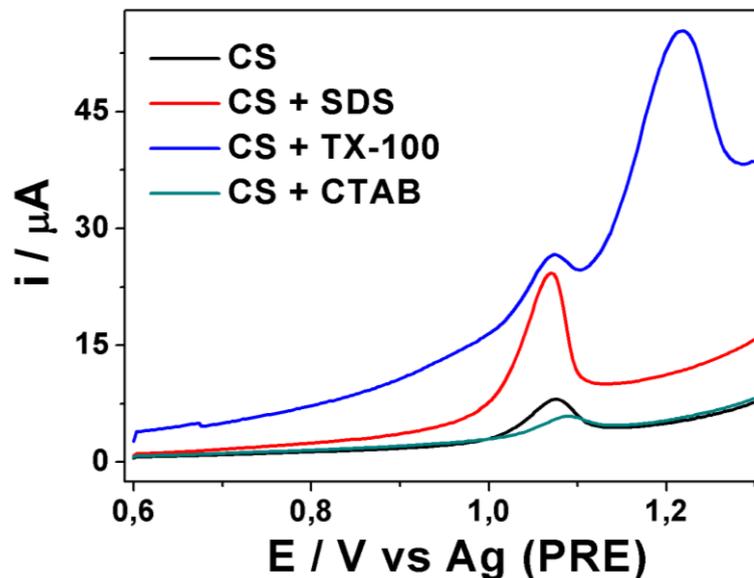


Figura 13. SWV's obtidos em solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência e presença dos surfactantes SDS, CTAB e TX-100 ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$ cada) em TBR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$; Condições da SWV idem Fig. 10.



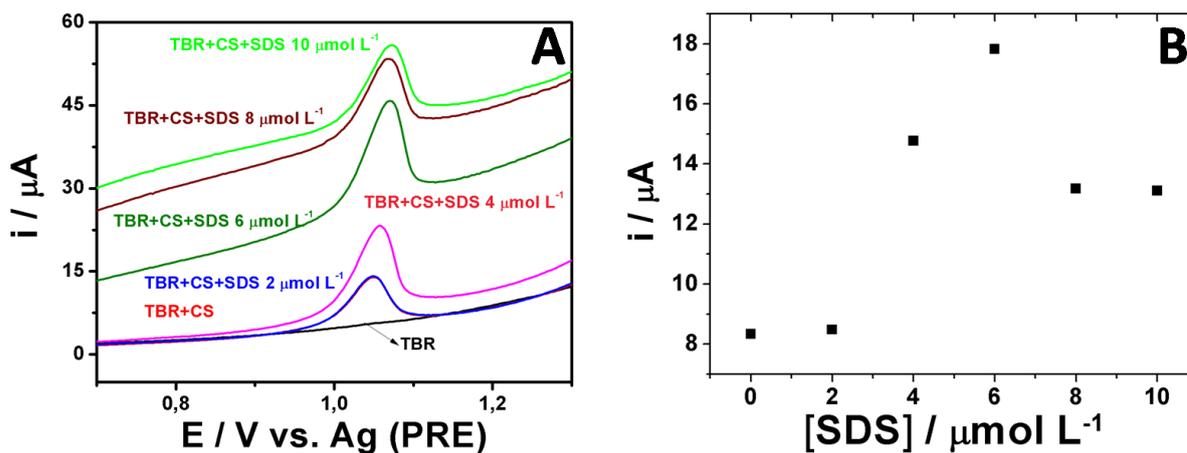
De acordo com a Fig. 13, o voltamograma obtido em solução de CS na presença do CTAB apresentou uma i_p menor e E_p deslocados no sentido anódico em relação ao voltamograma de CS sem surfactante, sugerindo que o CTAB dificulta a transferência eletrônica entre o CS e a superfície do WE. No entanto, comparando-se o voltamograma na presença de SDS com o obtido na ausência de SDS observa-se o efeito oposto, ou seja, um aumento na i_p e um ligeiro deslocamento do E_p no sentido catódico, indicando uma transferência eletrônica facilitada. Já a presença do surfactante TX-100 promoveu o aparecimento de dois picos anódicos, provavelmente devido a um efeito catalítico deslocando os dois processos de oxidação para potenciais menos positivos. Além disso, a presença do TX-100 promoveu um aumento considerável na corrente de fundo.

Para tentar entender os efeitos dos surfactantes, propomos uma explicação baseada na atração e repulsão de cargas que ocorreram na interface surfactante/analito, coerente à encontrada em outros trabalhos com surfactantes [62, 63]. Provavelmente a longa cadeia carbônica apolar de cada surfactante adsorve na superfície de carbono do SPE-C, também apolar. Deste modo, várias moléculas do surfactante ficam alinhadas verticalmente em uma espécie de filme organizado, sendo as cabeças polares carregadas eletricamente orientadas para a solução. Deste modo, quando o surfactante catiônico CTAB está presente na solução existem cargas positivas na cabeça polar, repelindo as moléculas de sildenafil também com carga positiva em eletrólito TBR pH 2 ($\text{pH} < \text{pKa}_1$, olhar Fig. 8), fenômeno que dificulta a interação e transferência de elétrons. Já quando o surfactante aniônico SDS está presente na solução, a cabeça polar que está direcionada para a solução apresenta carga negativa, o que promove a atração das moléculas de sildenafil de carga positiva. Devido a isto, a presença do SDS facilita a interação entre analito e WE, aumentando a transferência de elétrons. Como o SDS promoveu um aumento considerável na corrente de pico sem aumentar muito a corrente de fundo, este surfactante foi selecionado para os estudos subsequentes.

Após definido o SDS, o estudo posterior foi conduzido para encontrar a concentração de SDS na solução com melhor resposta voltamétrica. Para isto voltamogramas foram realizados na presença de concentrações de SDS na solução no intervalo de 2 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os voltamogramas deste estudo são apresentados na Figura 14. De acordo com a Figura 14, verifica-se na oxidação de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CS a corrente de pico aumenta com o aumento da concentração de SDS até atingir um valor de concentração de 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, escolhida nos próximos experimentos. Este comportamento indica que até esta concentração o surfactante está adsorvido na superfície do WE com interações predominantemente eletrostáticas. Acima

da concentração de $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ a intensidade da corrente de pico diminui, indicando que acima desta concentração existe a formação de micelas entre SDS e sildenafil na solução, que são agregados maiores com menor coeficiente de difusão, dificultando o transporte de massa do composto até a superfície do WE.

Figura 14. SWV's obtidos em solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em TBR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) na ausência e presença de SDS em distintas concentrações (2 a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições da SWV idem Fig. 10.



Após a otimização das condições para a detecção de CS por SWV foi então realizado o experimento para a obtenção da curva analítica de calibração. Para isso foi registrado um voltamograma de onda quadrada para cada concentração de CS na célula, sendo que a concentração foi aumentada através da adição de uma alíquota de uma solução estoque de CS entre cada voltamograma registrado. Para verificar o efeito do SDS na sensibilidade do sistema foram realizadas duas curvas de calibração, uma na ausência e outra na presença de SDS $4 \mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 15 mostra a dependência das correntes de pico em função das concentrações de CS na célula e as respectivas equações de reta das curvas de calibração. Conforme apresentado, quando comparamos as medidas na presença de SDS com as medidas na ausência de SDS, observa-se que o SDS aumentou em 3,5 vezes a sensibilidade para CS. No entanto, o SDS ocasionou a diminuição da faixa linear (7 para $4 \mu\text{mol L}^{-1}$) e o índice de correlação da curva analítica (0,996 para 0,979).

Outra vantagem conhecida do uso dos surfactantes está relacionada com a capacidade deste evitar ou minimizar a passivação do WE por efeitos de matriz ou produtos de reações redox [63]. De modo a verificar o efeito do SDS, foi avaliada a repetibilidade das medidas voltamétricas de CS em SPE-C na ausência e na presença de SDS. Para isto, foram efetuados em sequência vinte voltamogramas de onda quadrada de solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio

de TBR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2). Os voltamogramas e as correntes de pico obtidas para cada medida são apresentados na Figura 16.

Figura 15. Correntes de pico médias para concentrações crescentes de CS em meio de TBR pH 2,0 com SDS $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (CS + SDS) e sem SDS (CS). Condições_{SWV} iguais à Fig. 10.

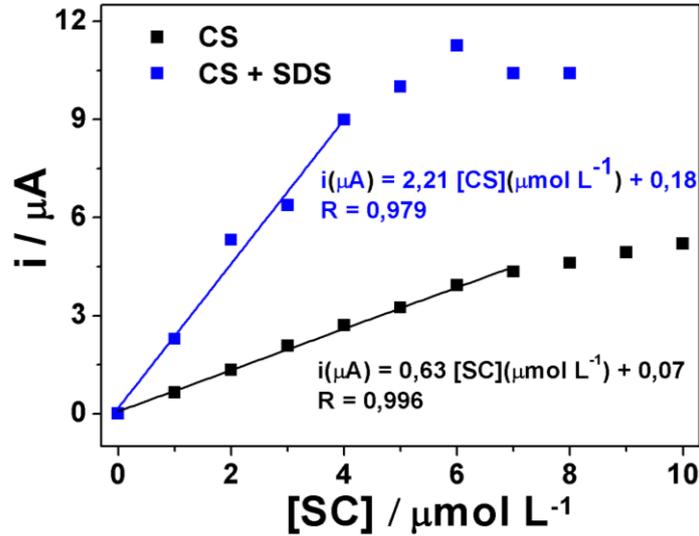
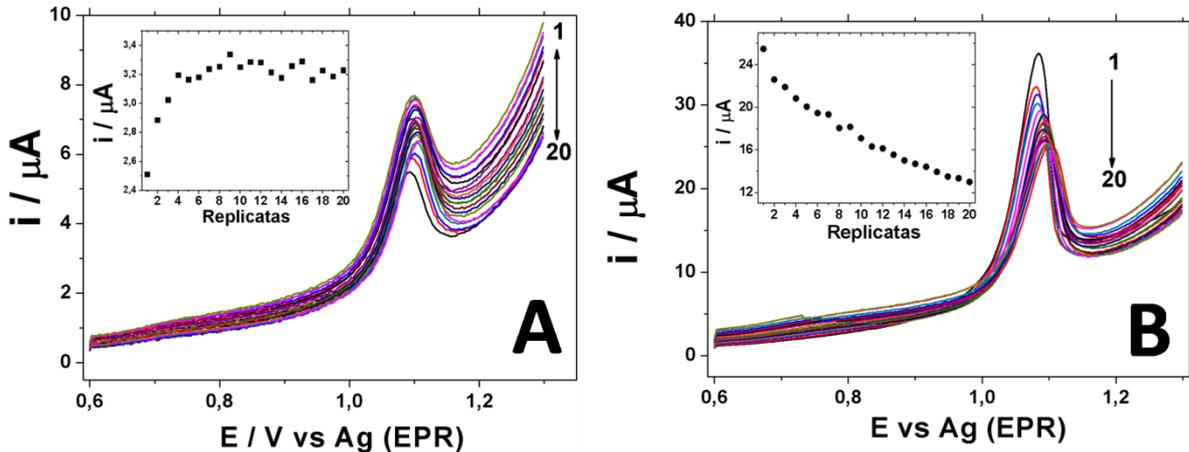


Figura 16. SWV's para vinte medidas de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência (A) e na presença de $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (B). Eletrólito: TBR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2). Condições_{SWV} iguais à Fig. 10.



De acordo com a Figura 16A, observa-se que os voltamogramas de CS obtidos apenas em meio de eletrólito (sem surfactante) apresentaram uma precisão razoável (RSD = 5,8 %; n = 20), sendo observada uma maior variação nas i_{pa} apenas nos três primeiros voltamogramas. Além disso, as variações das i_{pa} são aleatórias, não indicando ocorrer um processo adsorptivo nesta concentração. Já os voltamogramas de CS na presença de SDS (Figura 16B), a precisão foi drasticamente diminuída (RSD = 20,0 %; n = 20), sendo observada uma diminuição

gradativa das i_{pa} após cada medida. Deste modo, o SDS promoveu um efeito oposto ao esperado, ou seja, o de contaminar a superfície do SPE-C. Provavelmente, este efeito ocorreu devido à acumulação de sildenafil entre as camadas de SDS alinhadas verticalmente, bloqueando gradativamente a superfície do WE e conseqüentemente reduzindo os sinais voltamétricos após cada medida.

Alguns parâmetros de confiabilidade analítica (figuras de mérito) na ausência e presença de SDS são mostradas na Tabela 4. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados pelas seguintes fórmulas matemáticas: $LOD = (3 \times SD_B)/S$ e $LOQ = (10 \times SD_B)/S$, nas qual SD_B é o desvio padrão para dez correntes aleatórias coletadas da linha base do voltamograma e S é a sensibilidade calculada pela curva de calibração.

Tabela 4. Parâmetros de confiabilidade analítica para a detecção de CS por SWV.

Eletrólito	LR ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	S ($\mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$)	R	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	RSD (%)
TBR	1,0 – 7,0	0,63	0,996	0,16	0,53	5,8
TBR pH 2 + SDS	1,0 – 4,0	2,21	0,979	0,042	0,14	20

- LR: Faixa linear; S: Sensibilidade; R: Índice de correlação; LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de Quantificação; RSD: Desvio Padrão Relativo.

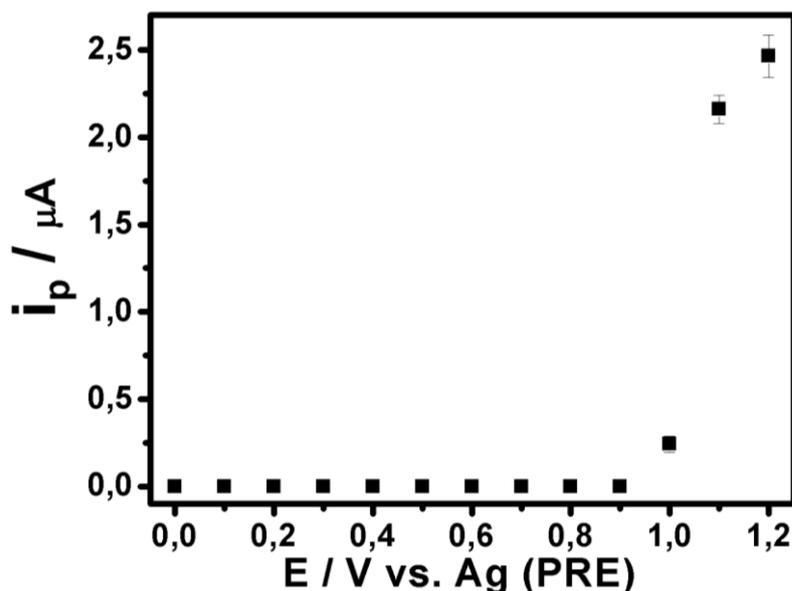
De acordo com a Tabela 4, apesar do surfactante SDS ter aumentado a sensibilidade para CS, este reduziu consideravelmente a faixa linear e a precisão do método voltamétrico estacionário. Assim, optou-se por realizar as dosagens nas amostras em meio de eletrólito na ausência de SDS, pois as quantidades de CS rotuladas nas formulações farmacêuticas é relativamente alta, logo a sensibilidade mais baixa não exerce um efeito tão pronunciado. Além disso, dosagens realizadas na presença de SDS são mais precisas. As dosagens de CS nos medicamentos (Viagra e genéricos) por voltametria de onda quadrada estacionária e pelo método da HPLC serão apresentadas na seção 4.6.

Apesar da SWV combinada ao SPE-C ser simples experimentalmente, a frequência analítica do método é relativamente baixa devido ao tempo requerido para registro de um voltamograma completo e à necessidade de efetuar uma curva de adição padrão para cada medicamento. Deste modo, os métodos BIA e FIA apresentados a seguir são hidrodinâmicos e tem como vantagem a elevada frequência analítica, característica interessante para dosagens de princípios ativos em análises de rotina na indústria farmacêutica.

4.3 Detecção de CS empregando BIA com detecção amperométrica

Para os dois sistemas hidrodinâmicos apresentados neste trabalho (BIA e FIA) foi utilizado o SPE-C não modificado e o eletrólito de TBR 0,04 mol L⁻¹ (pH 2), componentes já otimizados no método voltamétrico estacionário. Assim, o comportamento eletroquímico do CS foi investigado empregando a detecção amperométrica. Para isso, uma solução de CS 5 μmol L⁻¹ foi injetada em triplicata na célula BIA contendo tampão BR pH 2 enquanto era aplicado um potencial constante no WE em função do tempo. Neste estudo foi alterado o potencial aplicado no eletrodo de trabalho de carbono a cada três injeções, sendo investigados os potenciais de 0,0 V até + 1,3 V (*vs.* PRE de Ag). A partir das correntes de pico anódicas médias obtidas em cada potencial foi plotado o voltamograma hidrodinâmico da Figura 17, na qual nota-se o aumento das correntes anódicas de CS nos potenciais de + 0,9 V até + 1,2 V. Estes resultados corroboram com os voltamogramas cíclicos da Figura 7. Apesar das maiores correntes de pico obtidas em + 1,2 V, este potencial apresentava correntes da linha base mais intensas e instáveis, decorrentes de uma oxidação do eletrólito ou da superfície do WE. Deste modo o CS foi detectado no potencial de + 1,1 V nos estudos subsequentes.

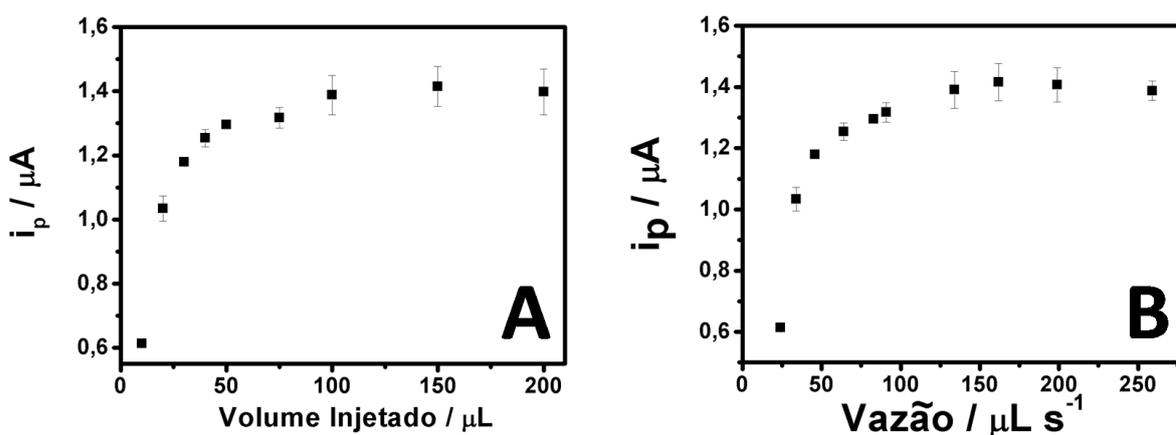
Figura 17. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos plotando as correntes de pico médias (\pm SD) relativas a três injeções da solução de CS 5 μmol L⁻¹ no sistema BIA em cada potencial avaliado. Eletrólito: TBR 0,04 mol L⁻¹ (pH 2); Volume injetado: 100 μL; Vazão: 134 μL s⁻¹.



Posteriormente os sinais amperométricos transientes foram avaliados em função do volume injetado e velocidade de dispensa (vazão), parâmetros controlados pela micropipeta computadorizada. A ponteira (“combitip”) da micropipeta eletrônica utilizada neste trabalho permite a dispensação de volumes entre 10 a 1000 μL . Deste modo, volumes neste intervalo foram injetados em triplicata na célula BIA, e as correntes médias (\pm SD) são apresentadas na Fig. 18A. Como apresentado, quando são injetados volumes de 10 a 50 μL as correntes são diretamente proporcionais ao volume de solução injetada. No entanto, injetando-se volumes acima de 50 μL as correntes médias atingem um valor constante, conhecido como patamar de corrente (i_{max}). Além disso, neste intervalo foram obtidos maiores desvios devido à maior passivação da superfície do SPE-C e picos mais largos que diminuem a frequência analítica do método. Assim, o volume de 50 μL de solução foi utilizado nos próximos experimentos.

No sistema BIA a pipeta eletrônica permite avaliar a resposta em dez vazões diferentes (de 24 a 250 $\mu\text{L s}^{-1}$). As correntes médias de cada triplicata (\pm SD) são apresentadas na Fig. 18B, na qual é possível observar maiores correntes para maiores velocidades de injeção. No entanto, acima de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ maiores desvios foram observados, devido à menor quantidade de pontos adquiridos pelo software do potenciostato no patamar de corrente. Logo, foi escolhida a velocidade de injeção (vazão) de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$.

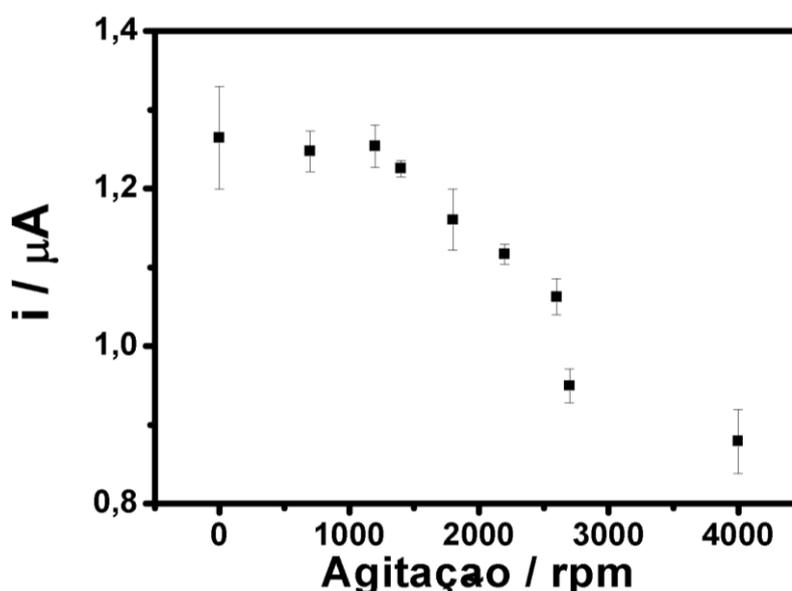
Figura 18. Correntes de pico médias (\pm SD) para três injeções de solução de CS 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na célula BIA sob distintos volumes injetados (A) e vazões (B). Eletrólito: Tampão BR 0,04 mol L^{-1} (pH 2). $E = +1,1$ V. Velocidade de dispensa: 134 $\mu\text{L s}^{-1}$ (A); Volume injetado: 50 μL .



O último parâmetro investigado no sistema BIA foi a presença de agitação mecânica na célula BIA. Na literatura, a presença de convecção na célula BIA é conhecida por aumentar a frequência analítica, devido à remoção mais eficiente das espécies eletroativas próximas à

superfície do WE (“lavagem do WE”) após a detecção [4]. Para este estudo, injeções de 50 μL de solução de CS 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ eram injetadas na célula BIA, sendo que a velocidade de agitação mecânica variada a cada três injeções. Vale ressaltar que a agitação mecânica foi variada apenas modificando a tensão aplicada pela fonte universal no motor DC (3 a 12 V correspondem a agitações de 700 a 4000 rpm no eletrólito). Na Figura 19 são apresentadas as correntes de pico médias (\pm SD) obtidas em cada nível de agitação. Conforme mostrado, uma agitação até 1500 rpm promove uma melhora na precisão das medidas em relação à medida sem agitação, provavelmente devido a uma lavagem mais eficiente do WE após a injeção. No entanto, uma convecção acima de 1500 rpm causa enorme diminuição na precisão e na corrente de pico, devido à lavagem excessiva, removendo parte da zona do analito antes mesmo de ser detectada totalmente. Deste modo, foi escolhida a velocidade de agitação na célula de 700 rpm. Nesta agitação a frequência analítica aumentou significativamente, de 90 h^{-1} (sem agitação) para 230 h^{-1} (agitação a 700 rpm).

Figura 19. Correntes de pico médias (\pm DP) para três injeções de solução de CS 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em distintas agitações na célula BIA. Eletrólito: TBR 0,04 mol L^{-1} (pH 2); E: + 1,1 V; Volume injetado: 50 μL . Vazão: 83 $\mu\text{L s}^{-1}$.



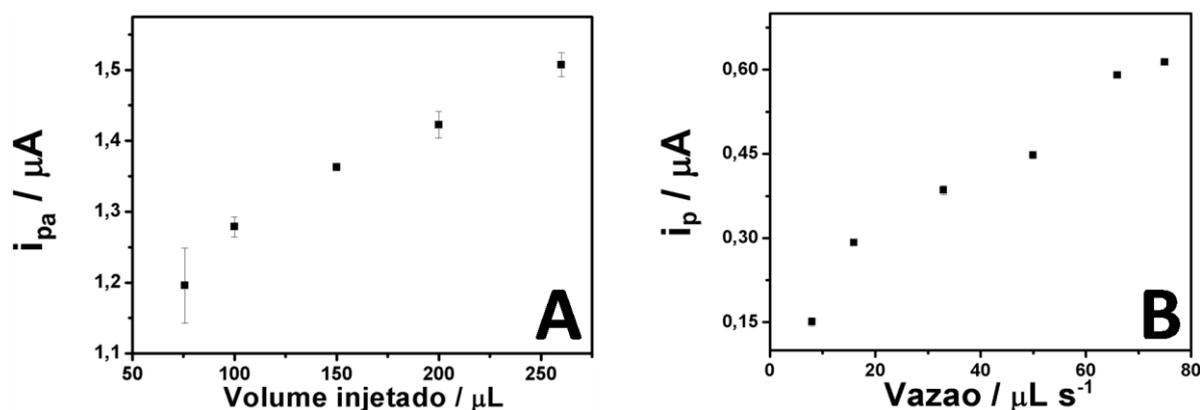
4.4 Detecção de CS empregando FIA com detecção amperométrica

Assim como em BIA, a o volume injetado e a vazão também foram otimizados no sistema FIA para a obtenção das maiores correntes de pico. Nesta etapa foi mantido o eletrólito de TBR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) e o potencial $+1,1 \text{ V}$, otimizados anteriormente.

No sistema FIA, o volume injetado é controlado pelo tamanho da alça de amostragem (“looping”) encaixada no injetor comutador. Considerando o tamanho da alça e o diâmetro interno do tubo tem-se uma estimativa do volume injetado no sistema. Na Figura 20A são apresentadas as correntes de pico médias ($\pm \text{SD}$) para três injeções de CS $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em cada volume injetado no sistema FIA. Nesta pode-se observar que as correntes são diretamente proporcionais aos volumes injetados até o volume de $260 \text{ } \mu\text{L}$. No entanto, a injeção de volumes maiores do que $200 \text{ } \mu\text{L}$ aumentaram os desvios padrão, provavelmente devido a uma maior adsorção de CS na superfície do SPE-C. Logo, o volume de $150 \text{ } \mu\text{L}$ foi utilizado nos próximos experimentos.

No sistema FIA, a bomba peristáltica permite vazões de 8 a $75 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$ (considerando o diâmetro de 1 mm do tubo de polipropileno). Na Figura 20B são apresentadas as correntes de pico médias ($\pm \text{SD}$) para três injeções de CS $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em cada vazão do sistema FIA. Como mostrado, a maior vazão ($75 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$) apresentou as maiores correntes de pico, devido ao menor efeito de dispersão da zona da amostra no fluxo carregador. As determinações de CS por FIA-AMP foram realizadas na vazão de $75 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$.

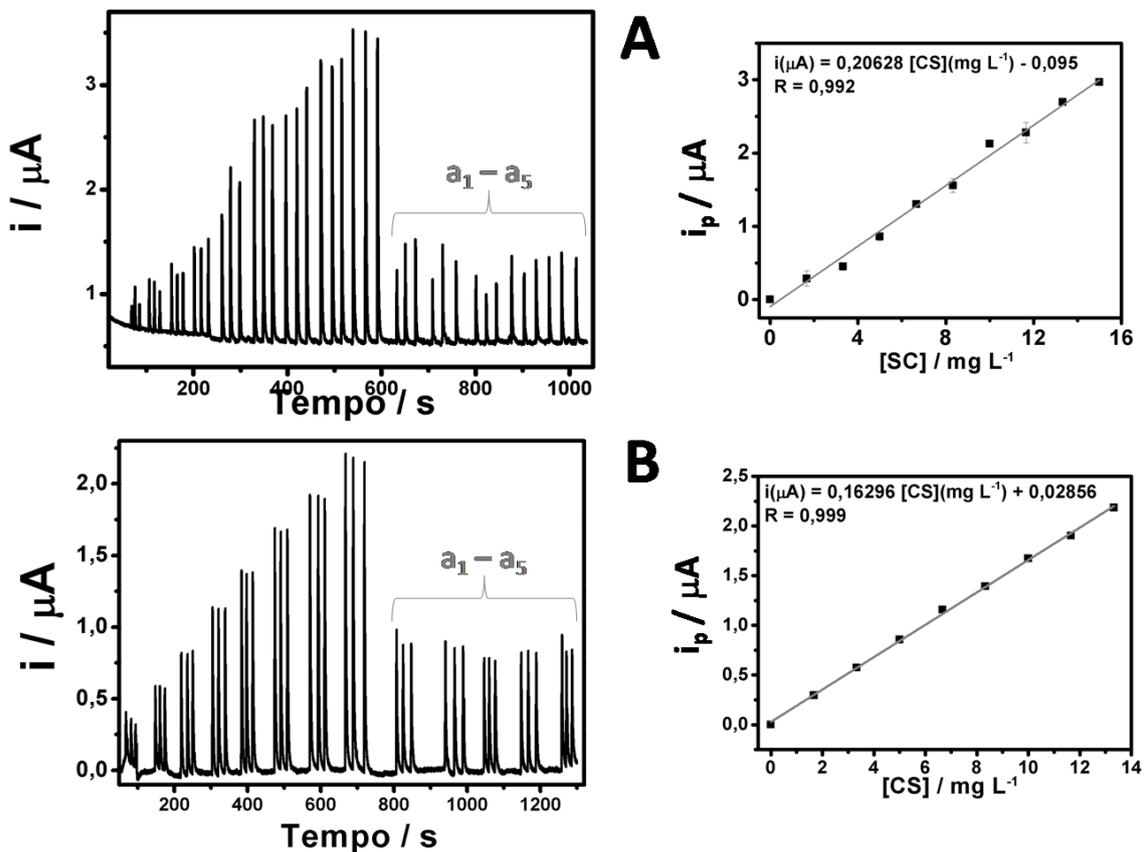
Figura 20. Correntes de pico médias ($\pm \text{SD}$) para três injeções de solução de CS $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ variando o volume injetado (A) e a vazão (B) do sistema FIA. Eletrólito: Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2); E: $+1,1 \text{ V}$; Vazão (A): $66 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado (B): $75 \text{ } \mu\text{L}$.



4.5 Curvas de calibração com amostra e parâmetros de confiabilidade analítica por BIA e FIA com detecção amperométrica

Para avaliar a dependência entre as correntes de pico e a concentração de CS, bem como obter alguns parâmetros de confiabilidade analítica (sensibilidade, faixa linear, LOD e LOQ), soluções de concentrações crescentes de CS ($1,67$ a 15 mg L^{-1}) foram injetadas em triplicata nos sistemas BIA e FIA nas condições otimizadas. Os amperogramas obtidos nos sistemas BIA e FIA nas condições otimizadas são apresentados nas Figuras 21A e 21B, respectivamente. Nestes amperogramas é possível observar que após a injeção dos padrões foram injetadas as soluções diluídas das cinco formulações farmacêuticas de CS (Viagra e genéricos). As dosagens de CS obtidas através desses experimentos serão apresentadas na seção 4.6.

Figura 21. Biagrama (A) e Fiagrama (B) obtido para injeções em triplicata de solução padrão de CS ($1,67$ a 15 mg L^{-1}) e soluções dos cinco medicamentos de CS (Viagra e genéricos). Condições: (A) Volume injetado: $50 \mu\text{L}$ (A) e $150 \mu\text{L}$ (B); Vazão: $100 \mu\text{L s}^{-1}$ (A) e $75 \mu\text{L s}^{-1}$ (B). Eletrólito: Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2); E: $+1,1 \text{ V}$.



A partir dos amperogramas (Figura 21), foram obtidas as seguintes equações de reta e coeficientes de correlação para ambos os sistemas:

$$i(\mu\text{A}) = 0,206 [\text{CS}] (\text{mg L}^{-1}) - 0,095; R = 0,992 \text{ (BIA-SPE)}$$

$$i(\mu\text{A}) = 0,163 [\text{CS}] (\text{mg L}^{-1}) + 0,029; R = 0,999 \text{ (FIA-SPE)}$$

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados pelas seguintes fórmulas matemáticas: $\text{LOD} = (3 \times \text{SD}_B)/S$ e $\text{LOQ} = (10 \times \text{SD}_B)/S$, nas qual SD_B é o desvio padrão para dez correntes aleatórias coletadas da linha base de cada amperograma e S é a sensibilidade calculada pela curva de calibração.

Para estimar a precisão (RSD) de cada sistema (BIA-SPE e FIA-SPE) e a frequência analítica teórica (TAF), foram realizadas dez injeções de solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em sequência. Os respectivos amperogramas são mostrados na Figura 22. Os RSD foram calculados de acordo com a variação das alturas dos dez picos (correntes de pico) e as TAF foram calculadas com base na largura do pico, ou seja, estimando o número de injeções por hora caso todas as injeções fossem realizadas todas em sequência (desprezando o tempo necessário para preencher a pipeta). Todos os parâmetros de confiabilidade analítica calculados a partir dos experimentos das Figuras 21 e 22 estão resumidos na Tabela 5.

Figura 22. Biagrama (A) e Fiagrama (B) obtidos após dez injeções de solução de CS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

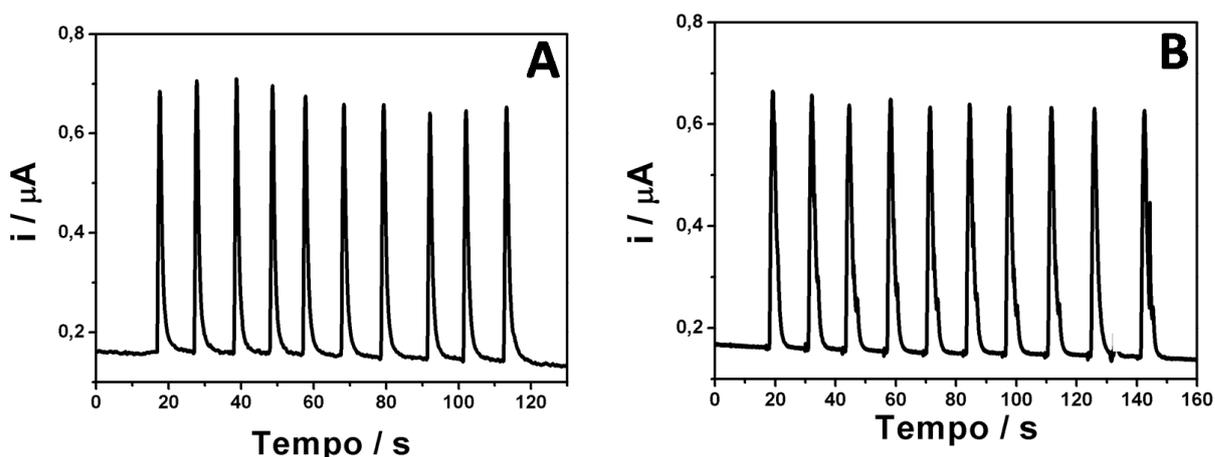


Tabela 5. Parâmetros de confiabilidade analítica para detecção de CS por BIA e FIA amperométrico.

Sistema	LR ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	S ($\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$)	R	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	RSD (%)	TAF (h^{-1})
BIA-SPE	2,5 – 22,5	0,312	0,992	0,011	0,036	3,8	730
FIA-SPE	2,5 – 20,0	0,241	0,999	0,074	0,25	1,4	550

- LR: Faixa linear; S: Sensibilidade; R: Índice de correlação; LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de Quantificação; RSD: Desvio Padrão Relativo; TAF: Frequência Analítica Teórica.

De acordo com a Tabela 4, concluímos que o sistema BIA apresentou vantagens em relação FIA algumas características como:

➔ Sensibilidade 30 % maior. Este desempenho pode ser explicado devido à menor dispersão do pacote da amostra no caminho até alcançar o detector (distância de 2 mm entre a extremidade da ponteira e o WE). Além disso, as vazões proporcionadas pela pipeta eletrônica (BIA) são maiores do que as alcançadas com a bomba peristáltica (FIA), o que também contribui para uma mínima diluição do pacote da solução de CS.

➔ Frequência analítica teórica 33 % superior. Este desempenho pode ser atribuído às maiores vazões da pipeta eletrônica (resultando em picos mais estreitos) e principalmente devido à presença de agitação mecânica que retira mais rapidamente as espécies da superfície do WE após a detecção.

No entanto (Tabela 4), o sistema FIA apresentou vantagens em relação ao BIA:

➔ Maior coeficiente de correlação e precisão (RSD três vezes inferior). Provavelmente essa maior reprodutibilidade ocorre, pois, o transporte dos padrões/amostras e eletrólito até a superfície do WE é realizado unicamente pela bomba peristáltica (operada em vazão constante durante um ciclo de injeções), ou seja, realizando um fluxo laminar constante durante todo o experimento. Ao contrário, em BIA esse transporte idêntico durante um amperograma não é possível, pois a pipeta eletrônica carrega a solução de CS até o detector sob fluxo laminar apenas durante a etapa de injeção, sendo a etapa de “lavagem” do WE realizada pelo agitador mecânico que está em outro regime de transporte de massa (fluxo turbulento).

Na literatura foram encontradas apenas duas publicações comparando o desempenho de BIA e FIA com detecção amperométrica para um mesmo analito, sendo uma para determinação de ciprofloxacina empregando SPE-MWCNT [37] e outra para a determinação de ciclopirox com eletrodo de carbono vítreo [64]. Nestes casos também foram alcançadas maiores sensibilidade e frequência analítica para o BIA e melhor precisão para o FIA.

4.6 Determinação de CS em medicamentos pelos métodos propostos e HPLC

Os métodos propostos nesta dissertação foram utilizados na determinação de CS em cinco formulações farmacêuticas comerciais. Para comparação, as amostras foram analisadas por HPLC utilizando fase móvel contendo 100 % de metanol, no qual o tempo de retenção para CS foi de 2,16 s. A Tabela 6 apresenta os teores de CS obtidos pelas três metodologias propostas (SWV, BIA e FIA) e do método HPLC.

Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos na determinação de CS em formulações comerciais de CS nas cinco formulações comerciais obtidos por SWV, BIA, FIA e HPLC.

Amostra	Rotulado (mg)	SWV (mg) ^[a]	BIA (mg) ^[a]	FIA (mg) ^[a]	HPLC (mg) ^[a]
1	50	158 ± 3	51 ± 7	59 ± 3	55 ± 1
2	50	95 ± 3	46 ± 7	56 ± 1	59 ± 3
3	50	76 ± 3	43 ± 5	51 ± 1	52 ± 1
4	50	85 ± 3	42 ± 5	53 ± 1	59 ± 2
5	50	71 ± 2	48 ± 3	55 ± 3	51 ± 2

^[a] Média ± RSD (n = 3).

Os resultados obtidos pelos métodos BIA e FIA com detecção amperométrica estão de acordo com aqueles obtidos por HPLC com 95 % de confiança (os valores de t calculados para o teste t de Student pareado foram menores do que o valor crítico) comprovando que não há diferenças significativas entre os resultados. Os resultados apresentados confirmam que os métodos de BIA e FIA com detecção amperométrica possuem desempenho similar ao HPLC para as determinações de CS em formulações farmacêuticas. No entanto, o valor de t calculado para o método voltamétrico estacionário foi maior do que o t crítico, comprovando que existem diferenças nos métodos.

A Tabela 7 compara os métodos amperométricos desta dissertação (BIA e FIA) com outras metodologias eletroanalíticas da literatura para determinação de CS, sendo estas publicações dispostas em ordem cronológica. Conforme apresentado, outras metodologias propostas também apresentaram uma estreita faixa linear para detecção de CS. Além disso, alguns trabalhos apresentaram limites de detecção inferiores aos propostos aqui, o que não é um limitante aqui pois a dosagem de CS em medicamentos é elevada. Finalmente, as duas metodologias hidrodinâmicas propostas aqui (BIA e FIA com detecção amperométrica) apresentaram as maiores frequências analíticas da literatura. Esta vantagem, combinada ao

baixo custo e praticidade destes sistemas motivam a aplicação destas metodologias para o doseamento de CS na indústria farmacêutica ou em farmácias de modo geral.

Tabela 7. Comparação de alguns parâmetros de confiabilidade analítica dos métodos propostos por FIA e BIA com detecção amperométrica com outros métodos eletroanalíticos da literatura para a determinação de CS.

Eletrodo de Trabalho	Método	Amostra	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Frequência Analítica (h^{-1})	Referência
HMDE	SWAdSV	Medicamento	0,005 – 0,9	NI	NI	[45]
HMDE	SWAdSV	Soro e urina	0,044 – 0,48	NI	NI	[46]
	CV		40 – 300	5,69	NI	
GCE	SWV	Medicamento	6 – 300	0,63	NI	[49]
	DPV		6 - 300	0,69	NI	
GCE	DPV	Urina	7,5 – 68	2,5	NI	[50]
GCE-LF	SWAdSV	Medicamento	0,002 – 0,15	9×10^{-4}	NI	[48]
DPE	SWV	Medicamento	1×10^{-6} – 1×10^{-2}	1×10^{-7}	NI	[51]
BDDE	DPV	Medicamento	0,73 – 7,3	0,63	NI	[54]
ZP-CPE	DPV	Medicamento	1×10^{-5} - 1×10^2	$2,46 \times 10^{-6}$	NI	[52]
BiFE	SWAdSV	Medicamento	0,1 – 1,0	0,018	NI	[47]
SPGCE	VOQ	Medicamento e Urina	1,0 – 14,0	0,055	NI	[55]
BDDE	FIA-MPA	Medicamento	2,0 - 100	0,042	86	[57]
RGO-GCE	DPV	Medicamento fitoterápico	0,02 – 0,5	0,0062	NI	[53]
AuNPs-SPGCE	SWV	Medicamento e Urina	1,8 – 33	$5,2 \times 10^{-4}$	NI	[56]
SPE-C	SWV	Medicamento	1 - 8	0,16	NI	Este Trabalho
SPE-C	BIA-AMP	Medicamento	2,5 – 22,5	0,011	158*	Este Trabalho
SPE-C	FIA-AMP	Medicamento	2,5 – 20,0	0,074	108*	Este Trabalho

- Eletrodos: HMDE: Gota pendente de mercúrio; GCE: Carbono vítreo; GCE-LF: Carbono vítreo modificado com Filme de chumbo; DPE: Pasta de diamante; ZP-CPE: Pasta de carbono modificado com porfirina de zinco; BiFE: Filme de bismuto; SPGCE: Eletrodo impresso de carbono vítreo; BDD: Diamante dopado com boro; RGO-GCE: Carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido; AuNPs-SPGCE: Eletrodo impresso de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro; SPE-C: Eletrodo impresso de carbono.

- Técnicas Eletroquímicas: SWAdSV: Voltametria de redissolução adsorptiva por onda quadrada; SWV: Voltametria de Onda Quadrada; CV: Voltametria Cíclica; DPV: Voltametria de pulso diferencial; BIA-AMP: Análise por injeção em batelada com detecção amperométrica; FIA-AMP: Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica.

- NI: Não informado; * Calculados com base nos amperogramas da Figura 21.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrado o uso de eletrodos impressos (SPE) de carbono para a determinação de citrato de sildenafil em medicamentos de disfunção erétil masculina. Nesta perspectiva as análises podem ser realizadas tanto usando o eletrodo impresso em uma célula eletroquímica estacionária com detecção voltamétrica (SWV) ou acoplando-o em células eletroquímicas de análise por injeção em batelada (BIA) ou de análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção amperométrica.

O eletrodo impresso de carbono não modificado (SPE-C) foi usado em todas as determinações de CS, pois combinou um bom sinal de corrente e precisão, além de ter custo três vezes menor do que os impressos modificados. Empregando a detecção por SWV foi obtida uma faixa linear reduzida, devido provavelmente a adsorção de CS (ou de seus produtos de oxidação) na superfície do SPE-C. Para minimizar este efeito, foi avaliado o uso de surfactantes, sendo o dodecil sulfato de sódio responsável por aumentar a sensibilidade para CS em três vezes, porém piorou a repetibilidade do método devido à intensificação da adsorção na superfície do SPE-C. Logo o SDS apresentou efeito oposto ao relatado na literatura (diminuição da passivação de analitos na superfície do eletrodo). Deste modo as determinações de CS em cinco formulações farmacêuticas foram realizadas na ausência de surfactantes. As análises de CS nestas amostras não foram satisfatórias, pois as dosagens de CS foram superiores aos valores rotulados e por HPLC.

O SPE quando acoplado aos sistemas BIA e FIA apresentou uma pequena melhora na faixa linear de trabalho e na precisão, devido à menor adsorção de CS na superfície do SPE em relação ao sistema estacionário. Comparando os dois sistemas hidrodinâmicos, o sistema BIA apresentou maior sensibilidade e frequência analítica devido às vazões alcançadas pela pipeta eletrônica. O sistema FIA apresentou maior precisão devido ao fluxo constante de eletrólito e solução de sildenafil controlado pela bomba peristáltica. Empregando BIA e FIA foi possível a análise quantitativa de CS em todas as amostras farmacêuticas, e os resultados não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao método HPLC.

As metodologias propostas aqui por BIA-SPE e FIA-SPE foram as mais rápidas para a determinação de CS em relação aos outros trabalhos da literatura. Além disso, a sensibilidade adequada, o baixo custo relativo e a simplicidade destes sistemas são características interessantes para análises de rotina de CS na indústria farmacêutica. Ambos BIA-SPE e FIA-SPE são promissores para a determinação de outros princípios ativos em medicamentos.

6. REFERÊNCIAS

1. Terrett, N.K., et al., *Sildenafil (VIAGRATM), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1996. **6**(15): p. 1819-1824.
2. Disponível em: <https://consultaremedios.com.br/>. Acesso em: 10 maio 2016.
3. Ruzicka, J. and E.H. Hansen, *FLOW INJECTION ANALYSES .1. NEW CONCEPT OF FAST CONTINUOUS-FLOW ANALYSIS*. Analytica Chimica Acta, 1975. **78**(1): p. 145-157.
4. Wang, J. and Z. Taha, *BATCH INJECTION-ANALYSIS*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(10): p. 1053-1056.
5. Barton, J., et al., *Screen-printed electrodes for environmental monitoring of heavy metal ions: a review*. Microchimica Acta, 2016. **183**(2): p. 503-517.
6. Taleat, Z., A. Khoshroo, and M. Mazloum-Ardakani, *Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008-2013)*. Microchimica Acta, 2014. **181**(9-10): p. 865-891.
7. Couto, R.A.S., J. Lima, and M.B. Quinaz, *Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis*. Talanta, 2016. **146**: p. 801-814.
8. Aytac, I.A., J.B. McKinlay, and R.J. Krane, *The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences*. Bju International, 1999. **84**(1): p. 50-56.
9. Al-Shaiji, T.F. and G.B. Brock, *Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors for the Management of Erectile Dysfunction: Preference and Adherence to Treatment*. Current Pharmaceutical Design, 2009. **15**(30): p. 3486-3495.
10. <http://www.bulas.med.br>.
11. <http://tatunarede.com.br/not%C3%ADcia/viagra-falsificado-cont%C3%A9m-gesso-tinta-de-para-de-e-at%C3%A9-de-impressora>.
12. Hurtado, R.L. and M.C. Lasmar, *Medicamentos falsificados e contrabandeados no Brasil: panorama geral e perspectivas de combate ao seu consumo*. Cadernos de Saúde Pública, 2014. **30**(4): p. 891-895.
13. Brett, C.M.A. and A.M.O. Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, ed. Oxford. Vol. 1. 1993, New York: Oxford. 427.
14. <http://www.metrohm.com.br>. <http://www.metrohm.com.br>.
15. Nascimento, V.B. and L. Angnes, *Screen-printed electrodes*. Quimica Nova, 1998. **21**(5): p. 614-629.
16. Wang, J., et al., *Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks*. Electrochimica Acta, 1998. **43**(23): p. 3459-3465.
17. <http://www.dropsens.com>. <http://www.dropsens.com>.
18. www.labsolutions.com.br. www.labsolutions.com.br.
19. Foster, C.W., et al., *Ultraflexible Screen-Printed Graphitic Electroanalytical Sensing Platforms*. Electroanalysis, 2014. **26**(2): p. 262-274.
20. Ruas de Souza, A.P., et al., *Back-to-Back Screen-Printed Electroanalytical Sensors: Extending the Potential Applications of the Simplistic Design*. Electroanalysis, 2015. **27**(10): p. 2295-2301.
21. Metters, J.P., E.P. Randviir, and C.E. Banks, *Screen-printed back-to-back electroanalytical sensors*. Analyst, 2014. **139**(21): p. 5339-5349.
22. de Souza, D., et al., *Square wave voltammetry. Second part: Applications*. Quimica Nova, 2004. **27**(5): p. 790-797.
23. dos Santos, W.T.P., et al., *FLOW INJECTION ANALYSIS WITH MULTIPLE PULSE AMPEROMETRIC DETECTION: POTENTIALITIES AND APPLICATIONS*. Quimica Nova, 2011. **34**(10): p. 1753-1761.
24. Silva, R.A.B., *Caracterizações e aplicações analíticas de eletrodos compósitos modificados com Azul da Prússia e determinações simultâneas em sistemas de análise por injeção em batelada empregando somente um eletrodo de trabalho*, in Instituto de Química da

- Universidade Federal de Uberlândia. 2012, Universidade Federal de Uberlândia: Uberlândia-MG. p. 142.
25. Catalayud, J.M., *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals*. 2003, London: Taylor & Francis. 394.
 26. Wang, J., et al., *COMPUTERIZED PIPETTES WITH PROGRAMMABLE DISPENSION FOR BATCH INJECTION-ANALYSIS*. *Analytica Chimica Acta*, 1992. **267**(1): p. 171-177.
 27. Quintino, M.S.M. and L. Angnes, *Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool*. *Electroanalysis*, 2004. **16**(7): p. 513-523.
 28. Salgado-Figueroa, P., et al., *Sensitive Determination of Nitrofurantoin by Flow Injection Analysis Using Carbon Nanofiber Screen Printed Electrodes*. *Electroanalysis*, 2013. **25**(6): p. 1433-1438.
 29. Sun, C.L., et al., *Ultrasensitive and highly stable nonenzymatic glucose sensor by a CuO/graphene-modified screen-printed carbon electrode integrated with flow-injection analysis*. *Electrochemistry Communications*, 2013. **30**: p. 91-94.
 30. Shitanda, I., et al., *Amperometric screen-printed algal biosensor with flow injection analysis system for detection of environmental toxic compounds*. *Electrochimica Acta*, 2009. **54**(21): p. 4933-4936.
 31. Shi, M.H., et al., *A mediator-free screen-printed amperometric biosensor for screening of organophosphorus pesticides with flow-injection analysis (FIA) system*. *Talanta*, 2006. **68**(4): p. 1089-1095.
 32. Kumar, A.S., et al., *Flow Injection Analysis of Ellagic Acid in Cosmetic Skin-Whitening Creams Using a Dendritic Nanostructured Copper-Gold Alloy Plated Screen-Printed Carbon Electrode*. *International Journal of Electrochemical Science*, 2011. **6**(11): p. 5344-5356.
 33. Veseli, A., et al., *Electrochemical determination of histamine in fish sauce using heterogeneous carbon electrodes modified with rhenium(IV) oxide*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2016. **228**: p. 774-781.
 34. Samphao, A., et al., *Flow-injection amperometric determination of glucose using a biosensor based on immobilization of glucose oxidase onto Au seeds decorated on core Fe₃O₄ nanoparticles*. *Talanta*, 2015. **142**: p. 35-42.
 35. Fanjul-Bolado, P., et al., *Electrochemical study and flow injection analysis of paracetamol in pharmaceutical formulations based on screen-printed electrodes and carbon nanotubes*. *Analytica Chimica Acta*, 2009. **638**(2): p. 133-138.
 36. Stefano, J.S., et al., *Flow-Injection Analysis with Multiple-Pulse Amperometry for Simultaneous Determination of Paracetamol and Naproxen Using a Homemade Flow Cell for Screen-Printed Electrodes*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2014. **25**(3): p. 484-491.
 37. Stefano, J.S., et al., *Batch-injection versus Flow-injection analysis using screen printed electrodes: Determination of Ciprofloxacin in pharmaceutical formulations*. *Electroanalysis*, 2016.
 38. Tormin, T.F., et al., *Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2014. **202**: p. 93-98.
 39. Caramit, R.P., et al., *On-Site Determination of Carbendazim, Cathecol and Hydroquinone in Tap Water Using a Homemade Batch Injection Analysis Cell for Screen Printed Electrodes*. *Electroanalysis*, 2015. **27**(2): p. 271-275.
 40. Dias, A.A., et al., *Paper-based enzymatic reactors for batch injection analysis of glucose on 3D printed cell coupled with amperometric detection*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2016. **226**: p. 196-203.
 41. Almeida, E.S., E.M. Richter, and R.A.A. Munoz, *Voltammetric Lead Determination in Aviation Fuel Samples Using a Screen-Printed Gold Electrode and Batch-Injection Analysis*. *Electroanalysis*, 2016. **28**(3): p. 633-639.
 42. Tormin, T.F., et al., *Voltammetric Determination of Pb, Cu and Hg in Biodiesel Using Gold Screen-printed Electrode: Comparison of Batch-injection Analysis with Conventional Electrochemical Systems*. *Electroanalysis*, 2016. **28**(5): p. 940-946.

43. Nickum, E.A. and C.L. Flurer, *Determination of Phosphodiesterase-5 Inhibitors and Analogs Using High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection*. Journal of Chromatographic Science, 2015. **53**(1): p. 38-46.
44. Amin, A.S., M.E. Moustafa, and R.M.S. El-Dosoky, *Colorimetric Determination of Sildenafil Citrate (Viagra) Through Ion-Associate Complex Formation*. Journal of Aoac International, 2009. **92**(1): p. 125-130.
45. Berzas, J.J., et al., *Voltammetric behavior of sildenafil citrate (Viagra) using square wave and adsorptive stripping square wave techniques - Determination in pharmaceutical products*. Analytica Chimica Acta, 2000. **417**(2): p. 143-148.
46. Rodriguez, J., et al., *Determination of sildenafil citrate (viagra) and its metabolite (UK-103,320) by square-wave and adsorptive stripping square-wave voltammetry. Total determination in biological samples*. Talanta, 2004. **62**(2): p. 427-432.
47. Sopha, H., et al., *Bismuth film electrode for stripping voltammetric measurement of sildenafil citrate*. Electrochimica Acta, 2012. **60**: p. 274-277.
48. Tyszczyk, K. and M. Korolczyk, *Voltammetric method for the determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations*. Bioelectrochemistry, 2010. **78**(2): p. 113-117.
49. Ozkan, S.A., B. Uslu, and P. Zuman, *Electrochemical oxidation of sildenafil citrate (Viagra) on carbon electrodes*. Analytica Chimica Acta, 2004. **501**(2): p. 227-233.
50. Baranowska, I., M. Koper, and P. Markowski, *Electrochemical Determination of Carvedilol, Sildenafil and Paracetamol Using Glassy Carbon Electrode*. Chemia Analityczna, 2008. **53**(6): p. 967-981.
51. Stefan-van Staden, R.I., J.F. van Staden, and H.Y. Aboul-Enein, *Diamond paste-based electrodes for the determination of sildenafil citrate (Viagra)*. Journal of Solid State Electrochemistry, 2010. **14**(6): p. 997-1000.
52. Balasoiu, S.C., et al., *Amperometric dot-sensors based on zinc porphyrins for sildenafil citrate determination*. Electrochimica Acta, 2011. **58**: p. 290-295.
53. Li, Y., et al., *RGO LBL modified biomimetic electrochemical sensor for detection of Sildenafil in herbal sexual health products*. Biosensors & Bioelectronics, 2013. **42**: p. 287-292.
54. Batista, E.F., et al., *DIFFERENTIAL PULSE VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF SILDENAFIL CITRATE (VIAGRA (R)) IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS USING A BORON-DOPED DIAMOND ELECTRODE*. Analytical Letters, 2010. **43**(6): p. 1046-1054.
55. Farghali, R.A. and R.A. Ahmed, *A Novel Electrochemical Sensor for Determination of Sildenafil Citrate (Viagra) in Pure Form and in Biological and Pharmaceutical Formulations*. International Journal of Electrochemical Science, 2012. **7**(12): p. 13008-13019.
56. Farghali, R.A. and R.A. Ahmed, *Gold Nanoparticles-Modified Screen-Printed Carbon Electrode for Voltammetric Determination of Sildenafil Citrate (Viagra) in Pure Form, Biological and Pharmaceutical Formulations*. International Journal of Electrochemical Science, 2015. **10**(2): p. 1494-1505.
57. Lopes, A.C.V., et al., *Determination of Sildenafil Citrate (Viagra (R)) in Various Pharmaceutical Formulations by Flow Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2012. **23**(10): p. 1800-1806.
58. www.chemicalize.org. www.chemicalize.org.
59. Caramit, R.P., et al., *A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen-printed electrodes*. Fuel, 2013. **105**: p. 306-313.
60. Bilibio, U., et al., *Enhanced simultaneous electroanalytical determination of two fluoroquinolones by using surfactant media and a peak deconvolution procedure*. Microchemical Journal, 2014. **116**: p. 47-54.
61. Ahmadrabi, T. and A.J. Killard, *Measurement of total cholesterol using an enzyme sensor based on a printed hydrogen peroxide electrocatalyst*. Analytical Methods, 2016. **8**(13): p. 2743-2749.
62. Trindade, M.A.G. and M.V.B. Zanoni, *Voltammetric sensing of the fuel dye marker Solvent Blue 14 by screen-printed electrodes*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2009. **138**(1): p. 257-263.

63. Hu, C.G., C.H. Yang, and S.S. Hu, *Hydrophobic adsorption of surfactants on water-soluble carbon nanotubes: A simple approach to improve sensitivity and antifouling capacity of carbon nanotubes-based electrochemical sensors*. *Electrochemistry Communications*, 2007. **9**(1): p. 128-134.
64. Ferreira, L.M.C., F.S. Felix, and L. Angnes, *Fast Determination of Ciclopirox in Pharmaceutical Products by Amperometry in Flow and Batch Injection Systems*. *Electroanalysis*, 2012. **24**(4): p. 961-966.

ANEXO A

TRABALHOS DESENVOLVIDOS DURANTE O MESTRADO

1. Alencar L. M; Santos R. B; Silva R. A. B. **Detecção simultânea de paracetamol, cafeína, e ácido acetilsalicílico empregando BIA e a técnica amperométrica de múltiplos pulsos.** CD de resumos da XXI SBQSUL, Maringá-PR, 2014.
2. Caramit R. P., Santos R. B.; Ferreira V. S.; Silva R. A. B. **Caracterização de uma célula eletroquímica simples e portátil para eletrodos impressos e medidas hidrodinâmicas em meio orgânico.** CD de resumos da XXI SBQSUL, Maringá-PR, 2014.
3. Santos R. B; Silva R. A. B. **Desenvolvimento de método rápido, portátil e de baixo custo para a determinação de sildenafil em medicamentos empregando um sistema BIA e eletrodo impresso.** CD de resumos do XX SIBEE, Uberlândia-MG, 2015.
4. Santos R. B; Silva R. A. B. **Estudos para a determinação de citrato de sildenafil (Viagra®) em medicamentos empregando eletrodo impresso de carbono e voltametria de onda quadrada.** CD de resumos do XX SIBEE, Uberlândia-MG, 2015.
5. Alencar L. M.; Santos R. B.; Silva, R. A. B. **Determinação rápida e simultânea de paracetamol, ácido acetilsalicílico e cafeína em medicamentos empregando BIA e detecção amperométrica de múltiplos pulsos.** CD de resumos do XX SIBEE, Uberlândia-MG, 2015.
6. Rosa T. M.; Neves C. G; Santos R. B; Silva R. A. B. **Desenvolvimento de metodologia rápida e limpa para a determinação de etinilestradiol em anticoncepcionais empregando BIA e amperometria.** CD de resumos do XX SIBEE, Uberlândia-MG, 2015.
7. Rosa, T. M; Neves, C. G; Santos, R. B; Silva, R. A. B. **Estudo para detecção de etinilestradiol empregando o sistema BIA, eletrodo de diamante dopado com boro e voltametria de onda quadrada.** CD de resumos da I SBQ-MS, Dourados-MS, 2015.
8. Santos, R. B; Alencar, L. M; Oliveira, L. H; Trindade, M. A. G; Silva, R. A. B. **Detecção da Levofloxacina como contaminante emergente utilizando o sistema BIA com detecção amperométrica.** CD de resumos da I SBQ-MS, Dourados-MS, 2015.
9. Oliveira, L. H; Silva, W. P; Santos, R. B; Trindade, M. A. G. **Microextração Líquido-Líquido como técnica de pré-concentração antes da eletroanálise de fármacos.** CD de resumos da I SBQ-MS, Dourados-MS, 2015.