

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Thais Oliveira do Nascimento

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE AMILORIDA UTILIZANDO
VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL**

**Diamantina
2020**

Thais Oliveira do Nascimento

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE AMILORIDA UTILIZANDO
VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr.^a Andréa Renata Malagutti

**Diamantina
2020**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N244d Nascimento, Thaís Oliveira do.
Determinação voltamétrica de amilorida utilizando voltametria de pulso diferencial / Thaís Oliveira do Nascimento, 2020.
91 p.: il.

Orientadora: Andréa Renata Malagutti

Dissertação (Mestrado– Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. Amilorida. 2. Voltametria de pulso diferencial. 3. Eletrodo de carbono vítreo. 4. Urina. I. Malagutti, Andréa Renata. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 615

THAÍS OLIVEIRA DO NASCIMENTO

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE AMILORIDA UTILIZANDO
VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS, nível de
MESTRADO como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRA
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Andrea
Renata Malagutti

Data da aprovação : 19/03/2020


Prof.Dr.^a ANDREA RENATA MALAGUTTI - UFVJM


Prof.Dr. WALLANS TORRES PIO DOS SANTOS - UFVJM


Prof.Dr. LUCAS FRANCO FERREIRA - UFVJM

DIAMANTINA

Dedicatória

À minha família, por acreditar e investir em mim.
O apoio de vocês significou a segurança e certeza de que não estou sozinha
nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A esta universidade, ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela de um horizonte superior.

À professora Andréa Renata Malagutti, pela orientação, disposição e confiança.

Ao Fernando Roberto Figuerêdo Leite por todo o auxílio dado durante a realização do meu experimento.

Ao meu amigo Arthur Rocha Gomes por ter me apresentado, me guiado e ajudado ao longo dessa trajetória.

Aos meus pais e irmão, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta etapa, o meu muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."
(José de Alencar).

RESUMO

Amilorida, (AMI) 3,5-diamino-6-cloro-N-(diaminometilideno)pirazina-2-carboxamida é um natriurético relativamente fraco, conservador de potássio, com atividade anti-hipertensiva. Este agente natriurético pode ser funcional como substância dopante. Nos esportes, os diuréticos são usados principalmente pela rápida diminuição do ganho de peso corporal para diferentes categorias de peso e pela redução da concentração de medicamentos na urina, diluindo-os por meio da rápida produção de um volume elevado de urina, levando a uma menor possibilidade de detectar outras substâncias dopantes. Portanto, a determinação de AMI na urina exige métodos altamente sensíveis. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o perfil eletroquímico da AMI usando voltametria cíclica (CV) e desenvolver um método eletroanalítico para sua determinação na urina e soro humano usando voltametria de pulso diferencial (DPV) e utilizando o eletrodo de carbono vítreo (GCE). Os voltamogramas cíclicos da AMI no GCE em tampão Britton-Robinson (BR) de 0,1 mol L⁻¹ pH 2,0 mostraram um pico anódico irreversível bem definido a +1,30 V e um processo redox reversível com um pico anódico a +0,15 V e um catódico pico a -0,12 V. Com base nesse processo redox reversível, um método de DPV simples, sensível e de baixo custo foi otimizado para análise do medicamento. As condições operacionais ideais do método proposto foram: potencial de acumulação $E_{acc} = 1,35$ V, tempo de acumulação $t_{acc} = 40$ s, amplitude de pulso = 70 mV, taxa de varredura = 10 mVs⁻¹ e tampão BR de pH 1,5 como eletrólito de suporte em um faixa de varredura de 0,4 a -0,1 V. A faixa de concentração linear foi de 9,9 a 90,9 µmol L⁻¹ de AMI com limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de 5,19 µmol L⁻¹ e 17,3 µmol L⁻¹, respectivamente. Análises voltamétricas realizadas intra e interdia foram avaliadas para demonstrar a precisão do método estudado, apresentando desvios padrões relativos (DPR) inferiores a 5,0%. A exatidão do método proposto foi analisada através de estudos de adição e recuperação, apresentando valores de recuperação de AMI de 99,2 ± 3,6% a 106,3 ± 4,0% para a urina e 82,3 ± 9,3% a 106,3 ± 10,8% para o soro. O método proposto se apresentou vantajoso para a determinação de AMI devido à boa sensibilidade, precisão e exatidão.

Palavras chave: Amilorida, Voltametria de Pulso Diferencial, Eletrodo de carbono vítreo, Urina

ABSTRACT

Amiloride, (AMI) 3,5-diamino-6-chloro-N-(diaminomethylidene)pyrazine-2-carboxamide is a potassium-conserving relatively weak natriuretic with anti-hypertensive activity. This natriuretic agent can be functional as a doping substance. In sports, diuretics are used mainly for rapid diminution of corporal weight gain for different weight categories and for the reduction of the concentration of medical drugs in urine by diluting the latter by means of the rapid production of an elevated volume of urine, leading to a smaller possibility of detecting other doping substances. Therefore, AMI determination in urine demands highly sensitive methods. Thus, the aim of this work was to study the electrochemical profile of AMI using Cyclic Voltammetry (CV) and to develop an electroanalytical method for their determination in human serum and urine using differential pulse voltammetry (DPV) and the glassy carbon electrode (GCE). The cyclic voltammograms of AMI at the GCE in 0.1 mol L⁻¹ Britton–Robinson (BR) buffer pH 2.0 showed a well-defined irreversible anodic peak at +1.30 V and a reversible redox process with an anodic peak at +0.15 V and a cathodic peak at -0.12 V. Based on this reversible redox process, a simple, sensitive and low cost DPV method was optimized for analysis of the drug. The optimal operational conditions of the proposed method were: accumulation potential $E_{acc}= 1.35$ V, accumulation time $t_{acc}= 40$ s, pulse-amplitude = 70 mV, scan rate = 10 mVs⁻¹ and BR buffer of pH 1.5 as a supporting electrolyte in a scanning range of 0.4 to -0.1 V. The linear concentration range was found to be 9.9 to 90.9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AMI with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 5.19 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 17.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Voltammetric analyzes performed intra and interday were evaluated to demonstrate the accuracy of the studied method, presenting relative standard deviations (RSD) below 5.0%. The accuracy of the proposed method was analyzed through addition and recovery studies, showing AMI recovery values from 99.2 \pm 3.6% to 106.3 \pm 4.0% for urine and 82.3 \pm 9.3 % to 106.3 \pm 10.8% for the serum. The proposed method proved to be advantageous for the determination of AMI due to its good sensitivity, precision and accuracy.

Keywords: Amiloride, Differential Pulse Voltammetry, Glassy carbon electrode, Urine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Estrutura química da AMI..... 40
- Figura 2 – Aplicação do potencial para a CV (A) Potencial com varredura linear e (B). Voltamograma obtido para um sistema reversível. 50
- Figura 3 – Aplicação do potencial para a DPV e voltamograma resultante..... 51
- Figura 4 – Célula eletroquímica contendo: eletrodo de trabalho (GC), contra eletrodo (placa de Pt) e eletrodo de referência (Ag/AgCl)..... 54
- Figura 5 – Voltamograma cíclico da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrado em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. Eletrodo auxiliar: Platina. Eletrodo de referência: Ag/AgCl. Intervalo de varredura: $-0,1$ a $0,6 \text{ V}$. $v = 0,05 \text{ V/s}$ 59
- Figura 6 – Voltamogramas cíclicos da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. Eletrodo auxiliar: Platina. Eletrodo de referência: Ag/AgCl. (A) Intervalo de varredura anódica: $-0,1 \text{ V}$ a $0,4 \text{ V}$. $v = 0,05 \text{ V/s}$. E_{ac} : $1,4 \text{ V}$. t_{ac} : 30 s . (B) Intervalo de varredura catódica: $0,4$ a $-0,1 \text{ V}$. $v = 0,05 \text{ V/s}$. E_{ac} : $1,4 \text{ V}$. t_{ac} : 30 s . (C) Comparação dos voltamogramas cíclicos obtidos para a Amilorida com aplicação de intervalo de varredura catódica e anódica 60
- Figura 7 – Voltamograma cíclico da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. Eletrodo auxiliar: Platina. Eletrodo de referência: Ag/AgCl . Intervalo de varredura catódica: $0,4$ a $-0,1 \text{ V}$. $v = 0,05 \text{ V/s}$. Sem potencial de acumulação aplicado..... 61
- Figura 8 – (A) Voltamogramas cíclicos da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) com diferentes potenciais de acumulação (E_{acc}), com $t_{acc} = 30 \text{ s}$. Intervalo de varredura catódica: de $0,4$ a $-0,2 \text{ V}$, $v = 0,05 \text{ V/s}$. (B) Valores de corrente de pico anódica (I_{pa}) e corrente de pico catódica (I_{pc}) obtidos em cada valor de E_{acc} 62

Figura 9 – (A) Voltamogramas cíclicos da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), em diferentes tempos de acumulação (t_{acc}), com $E_{acc} = 1,35 \text{ V}$, Intervalo de varredura catódica: de 0,4 a -0,1 V, $v = 0,05 \text{ V/s}$. ; (B) Valores de corrente de pico anódica (I_{pa}) e corrente de pico catódica (I_{pc}) obtidos em cada valor de t_{acc} 63

Figura 10 – Voltamogramas cíclicos da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes valores de pH, com $E_{acc} = 1,35 \text{ V}$ e $t_{acc} = 40 \text{ s}$, $v = 0,05 \text{ V/s}$ 64

Figura 11 – (A) Valores de correntes de pico anódicas (I_{pa}) e catódicas (I_{pc}) obtidos em função do aumento do pH; (B) Valores de potenciais de pico anódicos (E_{pa}) e catódicos (E_{pc}) obtidos em função do aumento do pH 65

Figura 12 – Mecanismo proposto para a oxirredução da AMI..... 66

Figura 13– Voltamogramas cíclicos da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,5) em diferentes velocidades de varredura 67

Figura 14– Gráfico de I_{pa} e I_{pc} em função de (A) Velocidade de varredura e (B) Raiz quadrada da velocidade de varredura 68

Figura 15– Gráfico do $\log I_{pa}$ vs $\log v$ e de $\log I_{pc}$ vs $\log v$ 69

Figura 16– Voltamogramas de pulso diferencial da AMI $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,5) com o eletrodo de carbono vítreo, no intervalo de varredura: de 0,4 a -0,1 V, com amplitude de pulso de 20 mV e variando a velocidade de pulso de 1 a 10 mV s^{-1} . (Inserido: Gráfico de I_p vs velocidade de pulso) 71

Figura 17– Voltamogramas de pulso diferencial da AMI $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,5) com o eletrodo de carbono vítreo, no intervalo de varredura: de 0,4 a

-0,1 V, variando a amplitude de pulso no intervalo de 10 a 100mV, a uma velocidade de pulso de 10 mVs⁻¹.(Inserido: Gráfico de I_pvs amplitude de pulso) 72

Figura 18– Voltamogramas de pulso diferencial da AMI com concentrações variando de 9,90 a 90,9 μmol L⁻¹ registrados em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 1,5) com o eletrodo de carbono vítreo, no intervalo de varredura: de 0,4 a -0,1 V, com amplitude de pulso de 70 mV e velocidade de pulso de 10 mVs⁻¹ 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da pressão arterial de indivíduos maiores de 18 anos	35
Tabela 2 – Lista dos reagentes químicos utilizados, procedência e pureza.....	54
Tabela 3– Valores de corrente de pico (I_p), corrente de pico média (I_{pmed}) e desvio padrão relativo (DPR) das dez medidas realizadas no mesmo dia para as 24,4; 47,6 e 90,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMI	74
Tabela 4– Valores de corrente de pico (I_p), corrente de pico média (I_{pmed}) e desvio padrão relativo (DPR) das medidas realizadas em cinco dias diferentes para as 24,4; 47,6 e 90,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMI	74
Tabela 5– Efeito de alguns possíveis compostos interferentes na determinação de AMI. [interferente adicionado] = 4,76 mmol L^{-1} , [AMI] 47,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	75
Tabela 6– Resultados da adição e recuperação de AMI em amostras de urina humana usando a metodologia desenvolvida	76
Tabela 7– Resultados da adição e recuperação de AMI em amostras de soro humano usando a metodologia desenvolvida	77
Tabela 8– Comparação entre algumas características do método analítico proposto para determinação da AMI com outros métodos analíticos descritos na literatura.....	79

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 $-\text{LOD} = \frac{3 \times S_b}{b}$	48
Equação 2 $-\text{LOQ} = \frac{10 \times S_b}{b}$	49
Equação 3 $-E_{pa} = (0,253 \pm 0,009) - (0,036 \pm 0,003) \text{ pH}$	65
Equação 4 $-E_{pc} = (0,205 \pm 0,006) - (0,036 \pm 0,002) \text{ pH}$	65
Equação 5 $-\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59 \text{ mV} / n$	65
Equação 6 $-\Delta E / \Delta \text{pH} = (59 \text{ mV} / n) \times N_{H^+}$	65
Equação 7 $-\log I_{pa} = - (0,606 \pm 0,130) + (0,361 \pm 0,018) \log v$	69
Equação 8 $-\log I_{pc} = - (0,499 \pm 0,156) + (0,366 \pm 0,021) \log v$	69
Equação 9 $-I_p (\mu\text{A}) = -0,06 \pm 0,02 [\text{AMI}] / \mu\text{mol L}^{-1} + 0,0120 \pm 0,0005 (\mu\text{A})$	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdSDPV	Voltametria de pulso diferencial com redissolução adsortiva, do inglês <i>adsorptive stripping differential pulse voltammetry</i>
Ag/AgCl	Prata/Cloreto de prata
AGT	Angiotensinogênio
AGTR1	Receptor tipo 1 de angiotensina II
AMI	Amilorida
AML	Amlodipina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATN	Atenolol
b	Valor do coeficiente angular da curva analítica
BIA-MPA	Amperometria de múltiplos pulsos com análise por injeção em batelada, do inglês <i>Batch injection analysis with multiple pulse amperometry</i>
BR	Britton-Robinson
CPE	Eletrodo de pasta de carbono, do inglês <i>carbon paste electrode</i>
CV	Voltametria Cíclica do inglês <i>cyclic voltammetry</i>
CYP11B2	Aldosteronasintetase
DPAAdCS	Voltametria de pulso diferencial de redissolução catódica do inglês <i>differential-pulse adsorptive cathodic stripping</i>
DPR	Desvio padrão relativo
DPV	Voltametria de pulso diferencial, do inglês <i>diferencial pulse voltammetry</i>
E_{acc}	Potencial de acumulação
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica do inglês <i>electrochemical impedance spectroscopy</i>
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
GCE	Eletrodo de carbono vítreo, do inglês <i>glassy carbon electrode</i>

HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HAS-P	Hipertensão arterial sistêmica primária
HAS-R	Hipertensão arterial sistêmica resistente
HAS-S	Hipertensão arterial sistêmica secundária
HCl	Ácido clorídrico
HCTZ	Hidroclorotiazida
HDL-c	Colesterol lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>High density lipoprotein cholesterol</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>
I	Corrente elétrica
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
I_p	Corrente de pico
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
IUPAC	Internacional Union of Pure Applied Chemistry
K^+	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
LDL-c	Colesterol lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>Low density lipoprotein cholesterol</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of detection</i>
Log	Logaritmo
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of quantification</i>
n	Número de elétrons transferidos no processo redox
Na^+	Sódio
NAF-CNT-GCE	Eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme composto de Nafion e nanotubos de carbono, do inglês <i>Nafion-carbon nanotube-nano-composite film modified glassy carbon electrode</i>
NaOH	Hidróxido de sódio

PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
pH	Potencial hidrogeniônico
Pt	Platina
RM	Receptor de mineralocorticóide
Sb	Desvio padrão da média de 10 brancos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SEM	Microscopia eletrônica de varredura, do inglês <i>scanning electron microscopy</i>
SPEs	Eletrodos de carbono impressos, do inglês <i>screen-printed carbon electrodes</i>
SUS	Sistema único de saúde
SWAdCS	Voltametria de onda quadrada de redissolução catódica, do inglês <i>square-wave adsorptive cathodic stripping</i>
SWV	Voltametria de onda quadrada, do inglês <i>square-wave voltammetry</i>
T _{acc}	Tempo de acumulação
TIM	Timolol
TRI	Triamtereno
UV	Ultravioleta
V	Volts
$v^{1/2}$	Raiz quadrada da velocidade de varredura
v	Velocidade de varredura
\bar{x}	Média aritmética de um pequeno número de medições

|

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo principal	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	35
3.1 Hipertensão arterial	35
3.2 Tratamento farmacológico da hipertensão arterial	38
3.3 Métodos gerais de análises de anti-hipertensivos	40
3.4 Métodos eletroquímicos para determinação de amilorida	42
3.5 Validação do método analítico	45
3.6 Técnicas eletroquímicas	49
3.6.1 <i>Voltametria cíclica (CV)</i>	50
3.6.2 <i>Voltametria de pulso diferencial (DPV)</i>	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Equipamentos utilizados	53
4.1.1 <i>Potenciostato</i>	53
4.1.2 <i>pHmetro</i>	53
4.1.3 <i>Célula eletroquímica e eletrodos</i>	53
4.2 Reagentes e soluções	54
4.2.1 <i>Reagentes</i>	54
4.2.2 <i>Soluções</i>	55
4.2.2.1 <i>Solução tampão Britton-Robinson (BR)</i>	55
4.2.2.2 <i>Solução estoque de AMI</i>	55
4.2.2.3 <i>Preparo das amostras</i>	55
4.2.2.3.1 <i>Preparo da amostra de urina humana para determinação de AMI</i>	55
4.2.2.3.2 <i>Preparo da amostra de soro humano para determinação de AMI</i>	56

4.3 Metodologia	56
4.3.1 <i>Determinação das quantidades de AMI presentes em urina</i>	56
4.3.2 <i>Determinação das quantidades de AMI presentes em soro</i>	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Voltametria cíclica (CV)	59
5.1.1 <i>Estudo do perfil voltamétrico da AMI sobre a superfície do GCE</i>	59
5.1.2 <i>Estudo da variação dos parâmetros voltamétricos</i>	62
5.1.2.1 <i>Variação do potencial de acumulação (E_{acc})</i>	62
5.1.2.1 <i>Variação do tempo de acumulação (t_{acc})</i>	63
5.1.2.3 <i>Estudo da variação do pH</i>	63
5.1.2.4 <i>Estudo da variação da velocidade de varredura por voltametria cíclica</i>	67
5.2 Voltametria de pulso diferencial (DPV)	69
5.2.1 <i>Otimização dos parâmetros da DPV</i>	70
5.2.1.1 <i>Estudo da variação da velocidade do pulso</i>	70
5.2.1.2 <i>Estudo da variação da amplitude do pulso</i>	71
5.2.2 <i>Construção da curva analítica para a determinação de AMI</i>	72
5.2.3 <i>Estudos de repetibilidade intradia e interdia</i>	74
5.2.4 <i>Determinação de AMI em amostras biológicas</i>	75
5.2.4.1 <i>Estudos de interferentes</i>	75
5.2.4.2 <i>Determinação de AMI em amostras de urina e soro humano</i>	76
5.2.5 <i>Comparação com outros métodos analíticos descritos para análise da AMI</i>	77
6 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	83
ANEXO A	89
ANEXO B	91

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte no mundo. Estima-se que aproximadamente 29,6 % das mortes sejam causadas por algum tipo de doença cardiovascular, sendo este número o dobro das mortes ocasionadas pelas diversas patologias oncológicas (NICHOLS et al., 2014). Dentre as diversas causas das doenças cardiovasculares está a hipertensão arterial, que pode ser tratada com a utilização dos medicamentos anti-hipertensivos.

Os anti-hipertensivos atuam causando a redução do volume vascular, o relaxamento do músculo liso vascular ou a diminuição do débito cardíaco (TOY *et al.*, 2015). Dentre as várias subclasses dos anti-hipertensivos, temos os diuréticos, que foram desenvolvidos na década de 1950 e agem aumentando a perda de Na^+ e água, resultando em uma redução inicial na pressão sanguínea (RIERA, 2000; TOY *et al.*, 2015).

Sendo assim, os diuréticos vêm sendo utilizados em tratamentos de pacientes hipertensos, uma vez que reduz tanto a pressão sistólica quanto a diastólica desses pacientes, além de apresentarem boa eficácia, baixo custo e poucos efeitos colaterais (RIERA, 2000).

Entre os tipos de diuréticos existentes podemos citar os diuréticos poupadores do potássio, que atuam nos receptores da aldosterona nos túbulos distais, prevenindo a perda de potássio, como é o caso da amilorida, fármaco que foi dado ênfase nesse estudo (GOODMAN; GILMAN, 2005).

A amilorida (AMI) ou 3,5-diamino-6-cloro-N-(diaminometilideno)pirazina-2-carboxamida é um fármaco anti-hipertensivo/diurético normalmente combinada com diuréticos tiazídicos para tratar hipertensão ou insuficiência cardíaca congestiva. A ingestão de baixas doses deste fármaco proporciona um aumento do volume de urina excretada, dificultando assim sua detecção, logo, métodos suficientemente sensíveis para a sua quantificação poderiam ser úteis para controle da sua utilização e dos seus níveis circulantes (ENSAFI, 2008).

Devido a importância dos diuréticos no tratamento da hipertensão arterial, insuficiência renal, insuficiência cardíaca ou cirrose hepática (pois a perda de sódio provoca redução de líquido extracelular), faz-se necessário garantir que as formulações farmacêuticas possuam a quantidade adequada e declarada do fármaco (princípio ativo) de modo a garantir a eficácia do tratamento destas doenças. Assim é importante o desenvolvimento de métodos de análise que assegurem o controle de qualidade destas formulações, como já foi reportado em

alguns estudos que serão brevemente abordados no decorrer deste estudo. Além disso, durante a fase do desenvolvimento farmacotécnico, a preocupação com os níveis de concentração de princípios ativos e seus metabolitos em fluidos biológicos e tecido é de suma importância. Esse monitoramento é fundamental para que os riscos de superdosagem e suas consequências tóxicas sejam minimizados em pessoas que tenham seu metabolismo alterado por complicações hepáticas e renais. Ainda, outro fator importante é que a determinação de fármacos em fluidos biológicos como urina e sangue tem sido cada vez mais explorada nas análises de doping de atletas que se beneficiam de forma ilícita ao utilizar substâncias como diuréticos e beta bloqueadores. Desta forma, a determinação de anti-hipertensivos também em fluidos biológicos tem despertado interesse, pois permite o monitoramento da concentração plasmática e da taxa de excreção de fármacos em pacientes que estão realizando o tratamento, sendo estes dois parâmetros importantes para os estudos farmacocinéticos.

A maioria dos métodos para detecção/quantificação de anti-hipertensivos baseia-se em métodos espectrofotométricos ou cromatográficos. As técnicas eletroanalíticas constituem uma importante ferramenta analítica que pode ser usada de forma alternativa ou complementar à utilização de técnicas espectrofotométricas e cromatográficas com detecção UV devido à sua alta sensibilidade, velocidade de análises, redução no consumo de solventes e amostras, desnecessidade de etapas de separação e extração, além de baixo custo operacional quando comparadas aos métodos analíticos que se baseiam em técnicas espectrofotométricas ou de separação.

Assim, neste trabalho foi realizada a análise do anti-hipertensivo amilorida utilizando métodos eletroanalíticos voltamétricos com o emprego do eletrodo de carbono vítreo e foi desenvolvida uma metodologia sensível para a quantificação deste composto em amostras biológicas de urina e sangue.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Desenvolver uma metodologia eletroanalítica para a determinação do anti-hipertensivo AMI em amostras biológicas (sangue e urina) utilizando um eletrodo de carbono vítreo.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Estudar a resposta voltamétrica da solução do anti-hipertensivo AMI, com o uso do eletrodo de carbono vítreo;
- 2) Realizar estudos voltamétricos por Voltametria Cíclica, como a variação da velocidade de varredura para caracterizar o sistema de acordo com os critérios de reversibilidade em voltametria;
- 3) Investigar os efeitos de aplicação de potencial e tempo de acumulação;
- 4) Avaliar a influência do pH e do eletrólito suporte na resposta eletroquímica do anti-hipertensivo AMI;
- 5) Obter informações físico-químicas para as reações redox da molécula do anti-hipertensivo AMI, como: potencial redox e número de elétrons envolvidos;
- 6) Otimizar os parâmetros da técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV) como: a velocidade de varredura e a amplitude de pulso da DPV para o desenvolvimento de um método de análise do anti-hipertensivo AMI;
- 7) Desenvolver uma metodologia eletroanalítica nas condições otimizadas da DPV para a análise e quantificação do anti-hipertensivo AMI em amostras reais de fluidos biológicos (sangue e urina);

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Hipertensão arterial

A pressão arterial (PA) é uma medida fisiológica da pressão que o sangue exerce sobre as paredes do endotélio vascular, podendo ser definida a partir da relação entre o débito cardíaco, que representa o volume de sangue que é ejetado pelo coração a partir do seu bombeamento, e da resistência vascular periférica, que pode ser classificada pela espessura das artérias (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016; BRASIL, 2013).

A regulação da pressão arterial sistêmica envolve complexos mecanismos integrados que relacionam os sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino. Basicamente, quando o coração promove o bombeamento sanguíneo, a pressão máxima atingida nesse momento no endotélio vascular é denominada de Pressão Arterial Sistólica (PAS) e a pressão mínima alcançada durante este período é a Pressão Arterial Diastólica (PAD)(SANJULIANI, 2002). A Tabela 1 representa os valores padrões de PA e sua classificação em indivíduos maiores de 18 anos:

Tabela 1 - Classificação da pressão arterial de indivíduos maiores de 18 anos.

Classificação	Pressão Sistólica (PAS)	Pressão diastólica (PAD)
Ótima	<120	<80
Normal	<130	<85
Limítrofe*	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥180	≥110
Hipertensão sistólica Isolada	≥140	<90

Legenda: *Pressão normal-alta ou pré-hipertensão são termos que se equivalem na literatura. Quando as pressões sistólica e diastólica situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial.

Fonte: Diretrizes Brasileiras de Hipertensão VI, 2013.

Uma elevação crônica da PA leva o indivíduo a um quadro de hipertensão arterial sistêmica (HAS), que pode ser definida quando há a ocorrência sustentada de uma PAS maior ou igual a 140 mmHg e de PAD maior ou igual a 90 mmHg. Uma HAS elevada pode também associar-se a outras alterações importantes a nível funcional e estrutural de órgãos vitais como o coração, encéfalo, rins e a própria vasculatura periférica. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

Em relação a seus dados epidemiológicos, estima-se que a HAS possa ser a doença circulatória de maior prevalência mundial, com aproximadamente 600 milhões de pessoas vivendo nessa condição, gerando por volta de 7,1 milhões de óbitos anualmente. Nos Estados Unidos da América, a HAS esteve associada em cerca de 75-77% dos casos clínicos de acidente vascular encefálico e de insuficiência cardíaca. No Brasil, a HAS acomete a saúde de 36 milhões de adultos e mais da metade da população idosa do país, estando associada com aproximadamente 30% das mortes anuais em território nacional (MALTA et al., 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

A HAS pode ser classificada também em Primária (HAS-P), secundária (HAS-S) ou resistente (HAS-R), de acordo com os fatores envolvidos na promoção do seu quadro e também no seu controle. A HAS-P corresponde a 95% dos casos, sendo aquela caracterizada por não possuir uma causa definida/conhecida, podendo ser influenciada pelo meio ambiente e seus fatores como a alimentação e o estresse cotidiano, além de múltiplos sistemas regulatórios que participam da manutenção da PA (mecanismos neuro-humorais) (LOPES et al., 2015; FREITAS, 2006). Na HAS-S, que representa 5% dos casos, existe uma relação de causa e efeito entre uma doença/medicamento e o aumento da PA. A HAS-S ocorre quando há presença de lesões significativas em órgãos-alvo; consumo excessivo de álcool ou sal; apneia do sono e a síndrome metabólica; utilização de anfetaminas, esteróides anabolizantes, inibidores do apetite, cafeína e cocaína (GUIA DE REFERÊNCIA RÁPIDA, 2013). A HAS-R é um subtipo da HAS-S, definida quando não há um controle da PA pela medicação tradicional e dos hábitos de vida, estando presente em cerca de 15% dos indivíduos dessa classe e sendo de elevado risco de morbimortalidade (JÚNIOR, 2011; BRITO; BORTOLOTTI, 2011).

A HAS pode ser considerada uma síndrome multifatorial e multisistêmica, sendo necessária uma boa anamnese ou rastreamento dos fatores envolvidos em sua etiologia para o seu diagnóstico precoce, bem como para o seu tratamento e/ou controle. De uma forma geral, após o diagnóstico de HAS, é importante a mudança dos hábitos de vida e também os

comportamentais, além de um acompanhamento por uma equipe multidisciplinar. Os fatores de risco também podem ser estratificados em duas subclasses: os modificáveis/controláveis e os não modificáveis/controláveis. Em relação aos primeiros, são fatores comumente encontrados a obesidade, o tabagismo, dislipidemias e o sedentarismo; por outro lado, entre os fatores não modificáveis estão listados principalmente a idade e a pré-disposição genética (IBIAPINA et al., 2013; SOUSA, et al., 2012).

Com relação ao excesso de peso/obesidade, os seus índices vêm aumentando vertiginosamente nos últimos anos em todo o mundo. Um quadro de obesidade traz consigo uma dieta desbalanceada, rica em açúcares e gorduras saturadas e do tipo *trans*, macronutrientes que podem gerar um maior acúmulo de gordura corporal e, conseqüentemente a elevação dos índices de colesterol. A presença no sangue de maiores concentrações do colesterol do tipo LDL-c e de baixas do tipo HDL-c são fatores de risco para o desenvolvimento de placas ateroscleróticas e da elevação da pressão arterial. Outro fator importante envolvendo a dieta de pessoas obesas é o alto consumo de sal. A grande quantidade de sódio presente na comida pode influenciar na elevação da pressão arterial e também em uma hipertrofia ventricular esquerda. Por fim, um peso corporal elevado associado a altos índices de sedentarismo observados nessa população pode culminar em um remodelamento cardíaco, levando a hipertrofia do órgão e aumento da pressão arterial como fator compensatório (ARAÚJO et al., 2015; SANTOS; PEREIRA, 2014).

Apesar da redução dos índices de tabagismo nos últimos anos, através do incremento de políticas públicas contra a sua utilização, esse fator ainda está fortemente ligado ao aumento dos índices de HAS. A nicotina é a principal substância presente nos cigarros, com potencial altamente viciante, e que pode provocar o aumento pressão arterial através de uma elevação do trabalho cardíaco, também levando a disfunção do endotélio capilar e a liberação de catecolaminas, que por sua vez, ativam a hiper-reatividade vascular (MENDES, 2014).

Dentro dos fatores não controláveis a idade é um fator de risco de grande importância. A população idosa (acima de 65 anos) vem crescendo mundialmente, muito devido às melhoras na saúde e tecnologia para o controle e tratamento de doenças. No entanto, existe uma relação direta e linear da PA com a idade, sendo a prevalência de HAS superior a 60% na faixa etária acima de 65 anos. O remodelamento cardíaco e endotelial natural que ocorre com a idade são as principais causas de HAS nessa classe de indivíduos, sendo que, a grande maioria dos idosos apresenta elevação isolada ou predominante da pressão sistólica, o que

pode acarretar eventos cardiovasculares fatais ou comprometedores das funções normais do órgão (COSTA et al., 2012).

Os fatores genéticos também desempenham um papel importante na HAS. A síndrome, quando hereditária, na maioria dos casos é complexa e poligênica, sendo resultado da variância de genes como do angiotensinogênio (AGT), enzima conversora de angiotensina (ECA), receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1), aldosterona sintetase (CYP11B2) e do receptor de mineral o corticóide (RM) (FREITAS, 2006). Devido a essa questão é que pessoas com histórico familiar de hipertensão ou outros problemas cardíacos devem estar sempre atentas e fazer um monitoramento adequado e periódico para o controle da HAS (MACHADO et al., 2012).

Ressalta-se também que, independente se o indivíduo já possui uma pré-disposição a HAS devido a um fator genético ou pela idade, um estilo de vida inadequado, com uma alimentação desbalanceada, sedentarismo ou o tabagismo pode favorecer ainda mais o aparecimento da doença (CENATTI et al., 2013).

3.2 Tratamento farmacológico da hipertensão arterial

Embora seja estimulado na maioria dos casos o tratamento da HAS com um método mais conservador, através da adoção de práticas mais saudáveis como a diminuição do sedentarismo, melhora na alimentação, redução/retirada do tabaco, o tratamento farmacológico é muitas vezes recomendado (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

O uso de medicamentos na HAS deve-se levar em consideração não apenas a PA do indivíduo, mas também o risco cardiovascular. Os anti-hipertensivos são medicamentos altamente importantes na farmacologia e são usados com a finalidade de tratar a hipertensão arterial, atuando através da redução do volume vascular, do relaxamento do músculo liso vascular ou pela diminuição do débito cardíaco (TOY et al., 2015). Dentro da classe dos anti-hipertensivos, podemos classificar as subclasses como: diuréticos, inibidores adrenérgicos, vasodilatadores diretos, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima de conversão da angiotensina II, bloqueadores do receptor da AT1 da angiotensina II e inibidores da renina. A escolha do medicamento deverá resguardar as indicações e as contraindicações específicas, podendo ser utilizado apenas um medicamento ou ser feita a combinação de anti-hipertensivos (MINAS GERAIS, 2013).

Uma das primeiras estratégias no controle da hipertensão arterial consistiu em alterar o balanço do Na^+ ao restringir o sal da dieta. A alteração em longo prazo do balanço do Na^+ com drogas tornou-se possível na década de 1950, com o desenvolvimento dos diuréticos, que agem aumentando a perda de Na^+ e água, resultando em uma redução inicial na pressão sanguínea (RIERA et al., 2000; TOY et al., 2015). A partir de então, os diuréticos têm sido utilizados no tratamento de pacientes hipertensos por reduzir tanto a pressão sistólica quanto a diastólica (TOY et al., 2015).

Existem dois tipos de diuréticos: os que modificam o conteúdo do filtrado glomerular, dificultando indiretamente a reabsorção da água e sal; e aqueles que atuam diretamente nos túbulos renais, modificando a sua atividade secretora e absorvente. Dentre os diuréticos que atuam diretamente nos túbulos renais podemos citar os diuréticos poupadores de potássio, como aespirlactona, a amilorida, e o triantereno. Esses são frequentemente utilizados em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva e são quase sempre prescritos em conjunto com outros dois tipos de diuréticos: os diuréticos tiazídicos, como a hidroclorotiazida, a clortalidona e a indapamida, que atuam no túbulo distal, aumentando moderadamente a eliminação de urina e agindo como vasodilatadores sanguíneos, diminuindo a pressão arterial; e os diuréticos de alça, que pode-se citar a furosemida, a bumetanida, a piretanida e o ácido etacrínico, os quais atuam na alça de Henle, removendo uma grande quantidade de sódio dos rins, produzindo um aumento do fluxo urinário (GOODMAN; GILMAN, 2005; TOY et al., 2015).

Os diuréticos administrados como monoterapia ou em associação com outros agentes anti-hipertensivos constituem a base terapêutica para a maioria dos hipertensos. São muito utilizados devido à sua eficácia, baixo custo e poucos efeitos colaterais. Dentre os anti-hipertensivos/diuréticos, a amilorida (AMI) ou 3,5-diamino-6-cloro-N-(diaminometilideno)pirazina-2-carboxamida (FIGURA 1) é um fármaco que atua aumentando a excreção de íons Na^+ e poupando K^+ nos túbulos distais (GOODMAN; GILMAN, 2005; TOY et al., 2015).

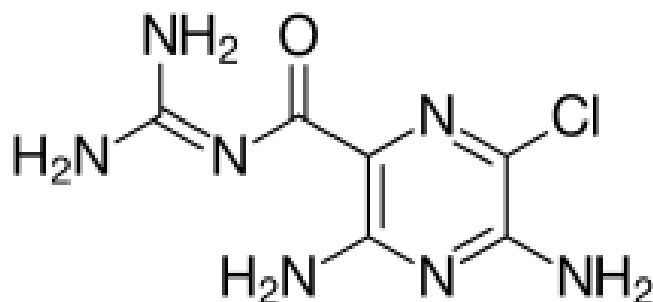


Figura 1- Estrutura química da AMI

Por ser considerado um diurético relativamente fraco, a amilorida normalmente é combinada com diuréticos tiazídicos para tratar hipertensão ou insuficiência cardíaca congestiva. A ingestão de baixas doses deste fármaco, que variam entre 5 a 50 mg, proporciona um aumento do volume de urina excretada, dificultando assim sua detecção, logo, métodos suficientemente sensíveis para a sua quantificação podem ser úteis para controle da sua utilização e dos seus níveis circulantes.

Dentre os tiazídicos mais combinados com a amilorida para tratamento da hipertensão, pode-se citar a furosemida. Ambas, amilorida e furosemida podem ser encontradas em formulações farmacêuticas combinadas na proporção de 1:4 (m/m), o que evita que haja uma perda grande de potássio e também distúrbios gastrointestinais quando há uma suplementação de potássio. Ademais, a furosemida possui uma absorção rápida, enquanto que a amilorida tem uma duração maior, fazendo com que haja um equilíbrio de ação terapêutica nessa associação (GOODMAN; GILMAN, 2005; TOY et al., 2015).

3.3 Métodos gerais de análises de anti-hipertensivos

Vários métodos de análises para a determinação de anti-hipertensivos em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos têm sido descritos na literatura, dentre os principais são os métodos espectrofluorimétricos, espectrofotométricos e os cromatográficos e eletroforéticos associados a diferentes técnicas de detecção. Alguns trabalhos que utilizaram estes métodos citados para a análise da amilorida em formulações farmacêuticas e fluídos biológicos serão brevemente abordados a seguir.

Poulou-Parissiet al.(1989) desenvolveram um método para determinação de amilorida e hidroclorotiazida separadas ou em associação utilizando espectrometria de segunda

derivada. Amilorida e a hidroclorotiazida foram monitoradas e determinadas em 278 e 381 nm, respectivamente. Para a determinação separada de amilorida e hidroclorotiazida a faixa linear obtida foi de 2-7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 2-12 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente e em combinação foi de 2-7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20-70 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os autores não observaram interferência dos excipientes dos comprimidos na determinação, e obtiveram um desvio padrão relativo de 1,3%.

Toralet al.(2002) determinaram amilorida e furosemida usando um método espectrofotométrico de derivada digital. A determinação simultânea de amilorida e furosemida foi realizada em 241,4 e 343,6 nm, respectivamente. A faixa linear de concentração obtida foi de $6,8 \times 10^{-8}$ a 16×10^{-5} e $6,8 \times 10^{-8}$ a $8,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} e com desvio padrão relativo de 0,9 e 0,6 % para amilorida e furosemida, respectivamente. O método foi aplicado em formulações farmacêuticas e os autores não observaram a interferência dos excipientes na determinação de amilorida e furosemida.

Myunget al.(2008) validaram um método analítico para o estudo farmacocinético da amilorida em plasma humano utilizando HPLC com detecção UV. A fase estacionária usada foi a C18 e a fase móvel composta de acetonitrila 12% com 0,4 % de ácido acético e detecção a 360,0 nm com fluxo de 1 mL/min. O desvio padrão relativo da precisão intra e inter dia foram inferiores a 15%. O limite de quantificação obtido foi de 0,2 ng mL^{-1} , a curva de calibração foi obtida na faixa de 0,2 -50 ng/mL com coeficiente de correlação (R^2) igual 1,00.

Peralta et al.(2010) descrevem um método espectrofluorimétrico simples para determinação de amilorida e furosemida em formulações farmacêuticas. O método consistiu na extração de amilorida utilizando uma membrana de nylon seguida pela determinação no espectrofluorímetro de ambas as drogas. A furosemida foi monitorada em 237 e 415 nm seguida de 365 e 406 para amilorida, obtendo uma faixa linear de concentração no intervalo de $3,20 \times 10^{-4}$ a $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ para amilorida e de $1,33 \times 10^{-3}$ a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a furosemida. Os limites de detecção calculados foram de $9,62 \times 10^{-5}$ e $4,01 \times 10^{-4} \mu\text{g mL}^{-1}$, não observando interferência dos excipientes na determinação de amilorida e furosemida, respectivamente. O método foi aplicado com sucesso na determinação em formulações farmacêuticas.

Al Azzamet al.(2010) determinaram atenolol e amilorida em formulações farmacêuticas utilizando eletroforese capilar acoplada a um detector de condutividade. A curva de calibração foi obtida no intervalo entre 5 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos os analitos estudados, o desvio padrão relativo intra e inter dia e as áreas de pico foram menores do que

6,0%. O método proposto apresentou boa precisão e exatidão e foi aplicado com sucesso na determinação simultânea de atenolol e amilorida em diferentes formulações farmacêuticas.

Todos esses métodos descritos nos trabalhos supracitados são importantes em um ambiente clínico tanto para a determinação dos anti-hipertensivos em formulações farmacêuticas como para a determinação da concentração destes em fluidos biológicos. Tais métodos são necessários para assegurar níveis adequados do fármaco que podem ser mantidos evitando a concentração tóxica. No entanto, estes métodos apresentam algumas características indesejáveis na sua aplicação como, por exemplo, necessidade de derivatização da amostra ou a necessidade de uma etapa demorada de extração, além de utilizarem geralmente instrumentações dispendiosas e alto custo de funcionamento. Uma alternativa à utilização destes métodos é a aplicação de métodos eletroquímicos, dentre os quais podemos citar o uso das técnicas eletroquímicas voltamétricas para a determinação destes compostos.

3.4 Métodos eletroquímicos para determinação de amilorida

As técnicas eletroquímicas voltamétricas possuem como vantagem a sua rapidez na obtenção dos resultados, facilidade de manuseio, e possibilidade da medida ser realizada sem pré-tratamentos da amostra ou purificações. Os métodos eletroanalíticos desenvolvidos utilizando as técnicas eletroquímicas voltamétricas constituem, desta forma, uma alternativa simples, rápida, sensível e de baixo custo para a análise de fármacos (GRUPTA et al., 2011). Dentre as etapas empregadas para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos descritos na literatura pode-se destacar a identificação da eletroatividade da molécula, isto é, se a molécula sofre um processo de oxidação ou redução na superfície do eletrodo, identificação de possíveis produtos de degradação gerados pelo processo eletroquímico, a influência dos componentes da matriz e de produtos secundários na resposta eletroquímica do analito, comparação da metodologia desenvolvida com outro método não eletroquímico descrito na literatura, uso da curva analítica para determinar a faixa linear de trabalho utilizando o método de adição-padrão, testes de recuperação pelo método do padrão interno, estudos de repetibilidade e reprodutibilidade e determinação dos limites de detecção e quantificação (KAUFFMANN; VIRE, 1993).

A seguir serão descritos alguns trabalhos que reportam a utilização de métodos eletroquímicos voltamétricos para a determinação de amilorida em formulações farmacêuticas e fluídos biológicos.

El-Hefnawy et al. (2004) estudaram o comportamento eletroquímico do cloridrato de amilorida em tampão Britto-Robinson no intervalo de pH de 1,9 a 11 por polarografia. Foi observado que em valores de pH inferiores a 2,0 existe apenas um único pico catódico de 4 elétrons enquanto que em valores de pH superiores a 2,0 um segundo pico de 2 elétrons irreversível apareceu em potenciais mais negativos. O primeiro pico foi atribuído à clivagem da dupla ligação do grupo CH= NH no grupo amino liberando NH. Enquanto que o segundo pico pode ser devido à saturação do C=O na porção carboxamida. A curva de calibração foi construída no intervalo de $2,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, onde os limites de detecção e de quantificação obtidos foram $1,0 \times 10^{-5}$ e $3,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, respectivamente. Também foi desenvolvido pelos autores um método para aplicação no doseamento de concentrações em níveis inferiores onde se utilizou como condições ideais pH 8,0, potencial de acumulação (E_{acc}) = -0,9 V, tempo de acumulação (t_{acc}) = 30 s, velocidade de varredura = 20 mV s⁻¹ e amplitude do pulso = 90 mV. A curva de calibração obtida foi no intervalo de $2,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, sendo aplicado em amostras de comprimidos sem a necessidade de pré-tratamento ou qualquer extração da amostra.

Hamman (2004) utilizou o eletrodo suspenso de gota de mercúrio e através da voltametria cíclica mostrou um único pico catódico irreversível de quatro elétrons bem definido no tampão Britton-Robinson (BR) de pH 2. Em valores mais altos de pH (pH ≥ 3), dois picos irreversíveis foram obtidos correspondentes à transferência de quatro (primeiro pico) e dois (segundo pico) elétrons. Devido ao caráter adsorptivo interfacial da AMI na superfície do eletrodo de mercúrio, um procedimento voltamétrico simples, sensível e de baixo custo de remoção catódica por adsorção de onda quadrada (SWAdCS) foi otimizado para sua análise. Foi constatado que a faixa linear de trabalho da AMI nas condições estudadas era de $2,0 \times 10^{-9}$ a $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de $1,9 \times 10^{-10}$ e $6,3 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹, respectivamente. A determinação de amilorida foi realizada em formulação farmacêutica e enriquecida em soro humano. O LOD e LOQ da amilorida fortificada no soro humano foram $5,7 \times 10^{-10}$ e $1,9 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, respectivamente.

Desai; Srivastava (2012) desenvolveram um método eletroquímico para determinar amilorida utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme compósito de Nafion e nanotubos de carbono (NAF-CNT-GCE). Técnicas voltamétricas e a espectroscopia

de impedância eletroquímica (EIS) foram utilizadas para estudar o comportamento eletroquímico da amilorida, onde foi observada a oxidação da amilorida sobre o eletrodo NAF-CNT-GCE e foi proposto um mecanismo de oxidação. A faixa linear de trabalho e o limite de detecção obtido foram de $9,07 \times 10^{-9}$ a $5,06 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $7,02 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, respectivamente. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação de amilorida em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos como plasma e urina.

Zayed et al. (2013) estudaram o comportamento voltamétrico do cloridrato de amilorida em tampão Britton-Robinson pH 2,96 utilizando eletrodo de pasta de carbono e as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. Os estudos por voltametria cíclica indicaram que o processo de oxidação é irreversível e controlado por adsorção. O intervalo linear de concentração estudado foi de 0,60 a 4,23 µg mL⁻¹ com limite de detecção e de quantificação igual a 0,26 e 0,87 µg mL⁻¹, respectivamente. O método foi aplicado com sucesso na determinação de amilorida em comprimidos.

Utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro, Pereira et al. (2016) realizou em formulações farmacêuticas a determinação simultânea da AMI e furosemida em um sistema de análise por injeção de batelada com detecção amperométrica por múltiplos pulsos (BIA-MPA). O método proposto apresentou boa estabilidade (DPR <1,1%), limites de detecção (0,13 e 0,94 mg L⁻¹ para amilorida e furosemida, respectivamente) e limites de quantificação baixos (0,43 e 3,13 mg L⁻¹ para amilorida e furosemida, respectivamente), alto rendimento (72 injeções h⁻¹), produção mínima de resíduos (~ 150 µL por análise) e faixas lineares de trabalho de 3,0 a 160,0 e 12,0 a 160 mg L⁻¹ para amilorida e furosemida, respectivamente.

Recentemente, Morais et al. (2017) desenvolveram um método avançado para determinação simultânea de uma mistura quaternária dos anti-hipertensivos bensilato de amlodipina (AML), cloridrato de amilorida (AMI), hidroclorotiazida (HCTZ) e atenolol (ATN) utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro pré tratado anodicamente, em solução tampão de amônia de pH 9,0 e utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. Os estudos mostraram que os fármacos em questão possuem picos de oxidação em 0,68, 0,89, 1,04, 1,21 V, respectivamente. Os autores mostraram que, em condições experimentais otimizadas, as alturas de picos aumentaram linearmente na faixa de concentração de 0,90 a 31, de 8,7 a 125, de 29 a 260 e de 11 a 91 µmol L⁻¹ e apresentaram limites de detecção de 0,30, 0,09, 0,08 e 0,06 µmol L⁻¹ para AML, AMI, HCTZ e ATN, na devida ordem. O método mostrou resposta satisfatória na quantificação dos fármacos avaliados em amostras de água de torneira e em formulações farmacêuticas, apresentando valores de recuperação de 93,9 a

104%. Khorshed et al.(2019) desenvolveram uma metodologia eletroquímica para determinação individual de 5 medicamentos de anti-hipertensivos: propranolol (PRO), timolol (TIM), amlodipina (AML), amilorida (AMI) etriamtereno (TRI) utilizando voltametria de pulso diferencial em eletrodos de carbono impressos em tela nus / não modificados(SPEs) na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) e aplicada em formulações farmacêuticas e amostras de urina humanas.A utilização do SDS sobreSPEs ofereceu maior sensibilidade para a definição de amplas faixas de lineares de trabalhos anti-hipertensivos. Sendo os valores de 0,33 a 22,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a encontrada para a AMI e um limite de detecção de 0,18 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3.5 Validação do método analítico

Para que haja uma maior confiabilidade em uma medida ou determinação analítica realizada através de um método novo, é necessário que seja feita uma validação deste método. Para isso, avaliam-se os parâmetros como a seletividade, a linearidade, a precisão (repetitividade e precisão intermediária) e a exatidão promovida pelo novo método de análise desenvolvido. (MIRANDA et al., 2015; RIBANI et al., 2004).

As técnicas eletroanalíticas constituem uma importante ferramenta analítica que pode ser usada de forma alternativa ou complementar à utilização das técnicas tradicionalmente utilizadas para validações de metodologias (ex: espectrofotométricas e cromatográficas). Seu baixo custo, aliado à sua alta sensibilidade, velocidade de análises, redução no consumo de solventes e amostras (devido a uma não necessidade de etapas de separação e extração), quando comparadas aos métodos analíticos descritos nos compêndios oficiais farmacopeicos, as tornam alternativas mais interessantes para determinação de compostos em formulações farmacêuticas ou mesmo em fluidos biológicos.

No entanto, todo método eletroanalítico também deve ser validado no momento em que está sendo desenvolvido, quando passa a ser utilizado rotineiramente para um determinado fim, ou quando vai ser utilizado em outro laboratório. Além disso, é necessária uma validação quando quaisquer condições de sua utilização mudam, como alterações nos equipamentos, amostras ou soluções (concentração da solução, pH, força iônica) (GUMUSTAS: OZKAN, 2011).

- Seletividade

A presença de interferentes na amostra é comum em determinações analíticas, logo, um método deve possuir seletividade, que é a capacidade de aferir um ou mais compostos de interesse com exatidão, sem que haja a interferência de impurezas ou produtos de degradação em sua determinação (ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004).

- Sensibilidade

A técnica analítica utilizada também deve possuir uma grande sensibilidade, que é a capacidade desta em distinguir duas concentrações diferentes de um mesmo analito em uma mesma matriz. A sensibilidade geralmente é determinada através de uma curva de calibração, que ao aumentar a concentração da amostra, apresenta uma inclinação característica de uma resposta proporcional à quantidade de analito presente. (GUMUSTAS; OZKAN,2011).

- Linearidade

A linearidade tem como fundamental importância a descrição se uma resposta a um analito é diretamente proporcional a sua concentração na faixa de concentração das soluções da amostra em questão, dessa forma, uma metodologia linear gera um gráfico de calibração da resposta eletroanalítica versus a concentração com um valor de R próximo de 1(ou seja, uma reta linear) (GUMUSTAS;OZKAN, 2011).

- Precisão

A precisão está diretamente relacionada com o erro presente na técnica empregada, sendo muitas vezes descrita através do desvio padrão. Para que haja uma alta precisão em uma determinação analítica é necessária a ocorrência de uma concordância entre os resultados de uma série de testes individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a uma

mesma amostra, ou seja, os percentuais de desvio padrão relativo devem ser menores ou iguais a 5,0% (ANVISA, 2003; GUMUSTAS; OZKAN, 2011).

- Exatidão

A exatidão de uma determinação quando utilizado um método eletroanalítico é tratada como a proximidade entre um valor de referência que é adotado e o valor encontrado após o emprego da técnica, sendo, portanto, o parâmetro de maior importância nesse tipo de análise (GUMUSTAS; OZKAN, 2011).

Geralmente, a precisão é representada e determinada por estudos de recuperação. A precisão do método é indicada pela proximidade de 100% do valor de recuperação. O viés e repetibilidade do método pode ser derivado da média e do desvio padrão dos dados percentuais de recuperação. Para determinação da exatidão de um método podem ser empregadas diversas técnicas, como comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão.

Através dos ensaios de recuperação, podem ser investigadas as possíveis interferências e os efeitos potenciais entre os ingredientes inativos e o composto estudado. A recuperação em cada nível de concentração estudado é determinada através da comparação com a quantidade conhecida adicionada, sendo necessários pelo menos três experimentos repetidos em cada nível. Além disso, os resultados obtidos podem ser convertidos como porcentagem de recuperação com seus valores de viés para mostrar a exatidão do método proposto. Na técnica de adição padrão, uma matriz de amostra que já contém alguma quantidade do composto investigado, tem sua quantidade conhecida de composto aumentada em diferentes níveis. A diferença resultante entre as amostras com e sem adição do composto é a parte recuperada do analito adicionado, que pode ser comparada com a quantidade conhecida adicionada. (GUMUSTAS; OZKAN, 2011).

- Limites de detecção (LOD)

Alguns analitos possuem concentrações muito baixas nas amostras a serem investigadas, como é caso das amostras biológicas e dos produtos de degradação. Assim, é importante que, ao delinear um método eletroanalítico para determinação de um analito, seja

aferido também o seu limite de detecção (LOD) que é a quantidade mais baixa que pode ser detectada do analito em uma matriz, com a ressalva de que esse mínimo detectável seja livre de incertezas (INMETRO, 2007; GUMUSTAS; OZKAN, 2011). O limite de detecção (LOD) pode ser expresso pela equação 1 como:

$$LOD = \frac{3 \times Sb}{b}$$

Onde S_b representa uma estimativa do desvio padrão encontrado no resultado de avaliação da amostra, admitindo-se tanto a estimativa do desvio padrão do branco como a do coeficiente linear da equação. O termo b é relativo à inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica. Dessa forma, é necessário que uma curva analítica seja construída utilizando-se a matriz contendo o analito de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção.

- Limite de quantificação (LOQ)

O LOQ está diretamente relacionado ao LOD, visto que ele é a concentração mais baixa do composto de interesse medido na própria matriz da amostra, ressaltando-se níveis aceitáveis de exatidão e precisão. Existem diferentes formas para determinar o limite de quantificação, dependendo se o processo é não instrumental ou instrumental.

- Método de avaliação visual: em que o LOQ é determinado pela eletroanálise de compostos ativos do fármaco com concentrações conhecidas de analito e estabelecendo o nível mínimo no qual a quantidade de composto pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis.
- Método da relação sinal / ruído: o LOQ pode ser aplicado apenas em métodos de medição que exibem ruído de linha de base, como métodos cromatográficos e espectrométricos. Em estudos eletroanalíticos, o ruído não pode ser obtido claramente, devido à natureza da metodologia e do eletrólito de suporte.
- 3. Com base no cálculo usando o desvio padrão da resposta e o método da inclinação: a maneira mais utilizada desse método para o cálculo da LOQ pode ser expressa pela equação2 :

$$LOQ = \frac{10 \times Sb}{b}$$

Sendo empregadas novamente as variáveis Sb e b .(INMETRO, 2007; GUMUSTAS; OZKAN, 2011)

Na prática o LOQ deve corresponder ao primeiro nível de concentração da curva analítica e para que ele possa ser aceito como LOQ, a resposta para o analito deve ser de pelo menos cinco vezes a resposta obtida para a amostra do branco e a resposta (sinal medido) deve ser identificável e reprodutível com uma precisão de 20% e exatidão de 80 a 120%. A ANVISA acrescenta que o LOQ pode ser obtido também através da análise da amostra do branco adicionada de concentrações crescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. (ANVISA, 2003; EUROPEAN COMMISSION, 2002).

3.6 Técnicas Eletroquímicas

As técnicas eletroanalíticas são utilizadas para determinação de analitos em soluções/formulações através do uso das suas propriedades elétricas como corrente, diferença de potencial e carga para propiciar a identificação, especificação e quantificação dos mesmos. Portanto, quando escolhida uma técnica eletroanalítica é importante verificar se o analito em questão possui propriedades elétricas (WANG, 2001).

Dentre os métodos eletroanalíticos, um dos mais importantes é o da voltametria, que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Na voltametria, são obtidas as informações sobre o analito através da medição da intensidade da corrente elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar quando se aplica uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (PACHECO *et al.*, 2013).

Espécies carregadas positivamente ou negativamente são predominantemente atraídas por um eletrodo, reagindo ou não na sua superfície. E espécies neutras também interagem com o eletrodo via adsorção. Sendo assim, a reação eletródica é composta por uma série de etapas; considerando primeiro o transporte das espécies até a superfície do eletrodo e em seguida, a reação que ocorre no eletrodo, logo, a corrente é governada por processos de

transferência de massa, transferência de carga e reações químicas que precedem ou sucedem a transferência de elétrons (PACHECO *et al.*, 2013).

Neste trabalho, será dado enfoque a dois tipos específicos de voltametria: a cíclica e a de pulso diferencial.

3.6.1 Voltametria cíclica (CV)

Dentre as técnicas voltamétricas, a voltametria cíclica é a mais utilizada para se obter informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. Através dela são fornecidas informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos. A CV é uma técnica dependente do tempo, visto que o potencial varia de forma linear em função deste, iniciando-se como uma aplicação inicial que vai aumentando gradativamente até chegar a um potencial final e, nesse ponto, ocorre uma inversão do potencial, que reduz até chegar de novo ao inicial (Fig2A).

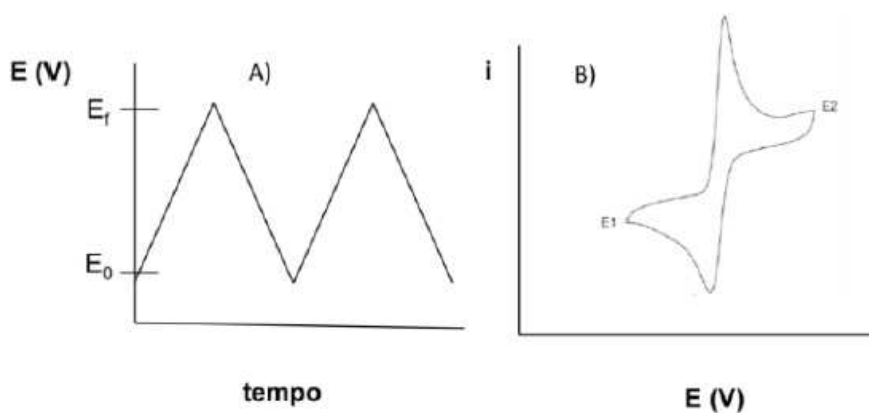


Figura 2 – Aplicação do potencial para a CV (A) Potencial com varredura linear e (B). Voltamograma cíclico obtido para um sistema reversível.

Fonte: PACHECO *et al.*, 2013.

Durante a varredura da CV, caso o analito possua características eletroativas, o que irá ser observado é o aparecimento de correntes faradaicas em função do potencial aplicado (Fig 2B), o que pode ser classificado como os processos típicos de oxidação e/ou redução (também chamados de anódicos e catódicos, respectivamente) na superfície do eletrodo de trabalho. Todo esse processo é dependente não só das características do analito, mas também da faixa

onde ocorrerá a varredura e do próprio eletrodo de trabalho (que pode estar ou não com a superfície modificada) (PACHECO et al., 2013).

Dependendo da complexidade da análise a ser desenvolvida, é necessária a realização de vários ciclos consecutivos, sendo o eletrodo de trabalho normalmente utilizado de forma estacionária. O perfil do voltamograma observado depende do tipo de mecanismo redox que o composto estudado sofre no eletrodo, o que torna a voltametria cíclica uma valiosa ferramenta para estudos mecanísticos (PACHECO, et al. 2013).

3.6.2 Voltametria de pulso diferencial (DPV)

As técnicas de pulso sob enfoque analítico se apresentam, como mais rápidas, sensíveis e melhores resolvidas em picos que as voltametrias de varredura linear e cíclica. ADPV é caracterizada pela aplicação de pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente ao eletrodo de trabalho (Fig 3)

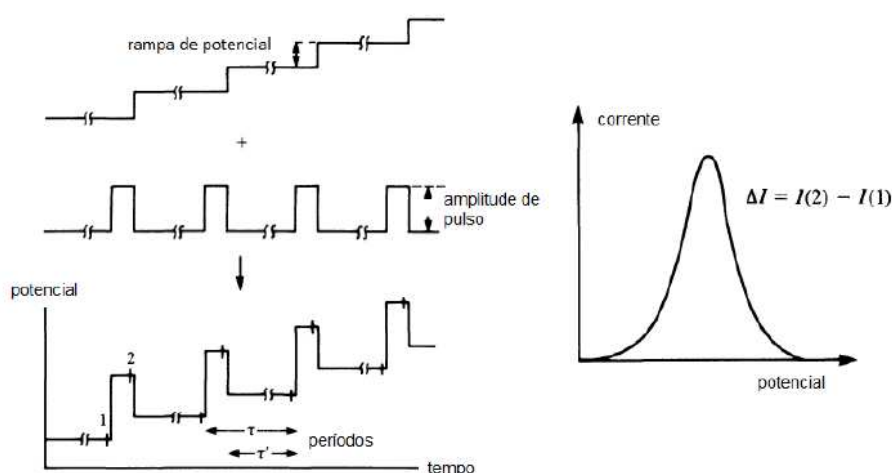


Figura 3 – Aplicação do potencial para a DPV e voltamograma resultante

Fonte: PACHECO et al., 2013.

Nessa técnica, a corrente é medida duas vezes, a primeira ocorre antes da aplicação do pulso e a segunda após a aplicação do pulso. A diferença das correntes, conforme visto na Figura 3 é plotada versus o potencial aplicado. Essa diferença de correntes tem como finalidade realizar a correção da corrente capacitiva e isso permite a obtenção de limites de

detecção dez vezes menores (podendo chegar à ordem de 10^{-8} mol L⁻¹) ao se comparar, por exemplo, com a Voltametria Cíclica (PACHECO, et al. 2013).

Assim, considerando as vantagens associadas ao uso das técnicas eletroquímicas voltamétricas e a importância da determinação dos fármacos anti-hipertensivos em amostras biológicas, este trabalho teve como foco a análise do anti-hipertensivo amilorida utilizando métodos eletroanalíticos voltamétricos com o emprego do eletrodo de carbono vítreo e a quantificação deste composto em sangue e urina. Desta forma, todas as etapas de análises realizadas para o desenvolvimento do método eletroanalítico e os resultados obtidos serão discutidos nos próximos tópicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos utilizados

4.1.1 Potenciostato

Com o auxílio de um potenciostatogalvanostatoAutolab® PGSTAT 128 N (Fig. 2) monitorado pelo software NOVA® 1.11.0, instalado em um computador, foram realizadas as medidas eletroquímicas.

4.1.2 pHmetro

As medidas de pH das soluções foram efetuadas com o auxílio do um pHmetro Metrohm 827, previamente calibrado com soluções tampão padrões de pH 4,0 e 7,0, à temperatura ambiente.

4.1.3 Célula eletroquímica e eletrodos

A célula eletroquímica utilizada para a execução das medidas voltamétricas foi composta de uma célula de vidro com capacidade para 50 mL e três eletrodos imobilizados por uma tampa de Teflon®, como pode ser visto na Figura 4.

O eletrodo de trabalho utilizado foi um eletrodo de carbono vítreo (GC) de área igual a 0,070 cm². O contra eletrodo empregado foi uma placa de platina de 1,0 cm². E o eletrodo de referência foi o Ag/AgCl em solução de KCl 3 mol L⁻¹.

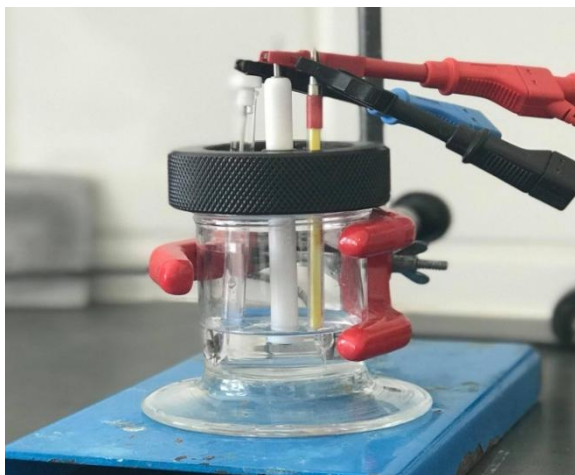


Figura 4 - Célula eletroquímica contendo: eletrodo de trabalho (GC), contra eletrodo (placa de Pt) e eletrodo de referência (Ag/AgCl)

Fonte: Acervo pessoal

4.2 Reagentes e soluções

4.2.1 Reagentes

Todos os reagentes químicos utilizados possuam grau analítico. Na Tabela 2 encontram-se listados os reagentes utilizados nas análises, bem como suas fórmulas químicas, marca e graus de pureza.

Tabela 2 - Lista dos reagentes químicos utilizados, procedência e pureza

Reagente	Fórmula Química	Marca	Pureza (%)
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH	Proquimios	99,8
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	Isosfar	99,0
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Alphatec	99,5
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	Vetec	99,5
Ácido clorídrico	HCl	Alphatec	37,0
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	Dinamica	85,0
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Vetec	99,0
Ácido úrico	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	Isosfar	99,0
AMI	C ₆ H ₈ N ₇ ClO	Sigma-Aldrich	99,0
Hidróxido de sódio	NaOH	Proquimios	99,0

4.2.2 Soluções

4.2.2.1 Solução tampão Britton-Robinson (BR)

Através da mistura de ácido fosfórico, ácido acético e ácido bórico, foi preparada a solução tampão Britton-Robinson (BR) na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, não sendo realizado o ajuste da força iônica. O pH tampão BR foi ajustado através da adição de alíquotas de solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ou de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ até o valor de pH desejado.

4.2.2.2 Solução estoque de AMI

Para a preparação da solução estoque de AMI $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi pesada uma massa de $0,0023 \text{ g}$ de AMI e dissolvida em 10 mL de solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 1,5. A solução estoque foi armazenada ao abrigo de luz e sob-refrigeração em uma temperatura de cerca de $4,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para a preparação da solução estoque de AMI $0,30 \text{ mmol L}^{-1}$ foi pipetado um volume de 3 mL da solução estoque de AMI $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para um balão volumétrico de 10 mL e seu volume foi completado com solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 1,5 até o menisco. A solução foi armazenada ao abrigo de luz e sob-refrigeração em uma temperatura de cerca de $4,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.2.3 Preparo das amostras

4.2.2.3.1 Preparo da amostra de urina humana para determinação de AMI

As amostras da urina foram coletadas de voluntários e mantidas sob-refrigeração à temperatura de aproximadamente $4,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Com o intuito de evidenciar a aplicabilidade da metodologia, na faixa linear de concentração da curva analítica, foram feitas determinações de AMI em amostras de urina nas concentrações de $47,6$; $65,4$ e $90,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Após a coleta da urina, volumes de $10,0 \text{ mL}$ de amostras de urina foram fortificados através de adições de 4760 , 6540 e $9090 \text{ } \mu\text{L}$ de uma solução padrão estoque de AMI na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, atingindo-se as concentrações finais de AMI iguais a 476 , 654 e $909 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Uma alíquota de $1000 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de AMI, na presença de urina, foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL e o volume final do balão foi completado com

solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 1,5$) até o menisco e foi adicionada à célula eletroquímica para análise. Através do método de adição de padrão, foram realizadas as adições sucessivas de volume de solução padrão de AMI.

4.2.2.3.2 Preparo da amostra de soro humano para determinação de AMI

As amostras de soro foram coletadas de voluntários e mantidas sob-refrigeração à temperatura de aproximadamente $4,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$. De forma análoga as amostras de urina, foram feitas determinações de AMI em amostras de soro nas concentrações de $30,0$; $54,5$ e $75,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Após a coleta do soro, alíquotas de $1000 \text{ } \mu\text{L}$ de amostras de soro foram adicionadas a balões volumétrico de 10 mL e o volume final dos balões foram completados com solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 1,5$) até o menisco, que foram chamadas de branco. Através de adições de 1000 , 2000 e $3000 \text{ } \mu\text{L}$ de uma solução estoque de AMI na concentração de $0,30 \text{ mmol L}^{-1}$ nos balões, foram obtidas as concentrações finais de AMI adicionadas à célula eletroquímica para análise.

4.3 Metodologia

4.3.1 Determinação das quantidades de AMI presente em urina

Através do método da adição de padrão foi realizada a determinação de AMI nas amostras de urina. Empregando a técnica de DPV, primeiro foi registrado o branco (solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,5$) aplicando um potencial na direção catódica no intervalo de potencial de $0,4$ a $-0,1 \text{ V}$, em seguida, uma alíquota de $1000 \text{ } \mu\text{L}$ da solução da amostra de urina fortificada previamente descrita na sessão 4.2.2.3.1 foi adicionada à célula eletroquímica, que continha o branco, e então os voltamogramas de pulso diferencial para as amostras foram registrados. Posteriormente, foram realizadas adições sucessivas do padrão de AMI e registrados os voltamogramas resultantes após cada adição.

4.3.2 Determinação das quantidades de AMI presente em soro

Através do método da adição de padrão foi realizada a determinação de AMI nas amostras de soro. Empregando a técnica de DPV, primeiro foi registrado o branco,

previamente descrito na sessão 4.2.2.3.2, aplicando um potencial na direção catódica no intervalo de potencial de 0,4 a -0,1 V, em seguida volumes de 1000 μL da solução estoque de AMI $0,30 \text{ mmol L}^{-1}$ foram adicionados sucessivamente à célula eletroquímica, que continha o branco, e então os voltamogramas de pulso diferencial para as amostras foram registrados após cada adição.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos preliminares foram realizados por voltametria cíclica (CV) e foram avaliados os critérios de reversibilidade pela técnica de CV, os efeitos do potencial de acumulação, do tempo de acumulação, do pH e da velocidade de varredura na resposta eletroquímica do analito. Para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica foi empregada a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV) e foram otimizados os parâmetros como a velocidade de varredura e a amplitude de pulso da DPV. Por fim, a metodologia desenvolvida foi validada e aplicada na análise de amostras de sangue e urina.

5.1 – Voltametria cíclica (CV)

5.1.1 – Estudo do perfil voltamétrico da AMI sobre a superfície do GCE

A Figura 5 apresenta os resultados obtidos em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 2,0$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ na concentração de AMI de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em um intervalo de varredura de $-0,1$ até $1,6 \text{ V}$.

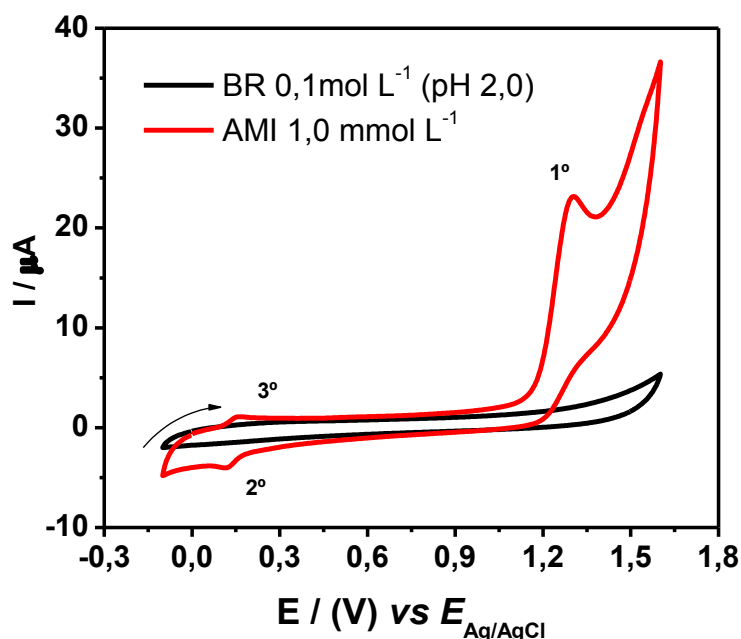


Figura 5- Voltamograma cíclico da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrado em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} 2,0$). Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. Eletrodo auxiliar: Platina. Eletrodo de referência: Ag/AgCl. Intervalo de varredura: $-0,1$ a $1,6 \text{ V}$. $v = 0,05 \text{ V/s}$.

Na Figura 5, foi possível observar que a AMI apresentou um pico de oxidação irreversível em 1,30 V (1°), assim como descrito por Desai; Srivastava (2012). No entanto, o fármaco também apresentou um processo de oxirredução que inicialmente foi classificado com reversível e posteriormente será comprovado pelos critérios de reversibilidade, com potencial de pico catódico (E_{pc}) em 0,12 V (2°) e potencial de pico anódico (E_{pa}) em 0,15 V (3°), ainda não descrito na literatura, logo, esse processo redox foi selecionado para uma investigação mais detalhada e também para o desenvolvimento de uma metodologia de análise de AMI.

Ao limitar o intervalo de varredura de potencial até o valor máximo de 0,6 V, ou seja, antes do processo irreversível de oxidação da AMI (Fig 6), foi observado que esse analito não apresenta o processo de oxirredução reversível anteriormente descrito. Dessa forma, foi constatado que o processo de oxirredução reversível da AMI é dependente do processo de oxidação que ocorre em 1,30 V.

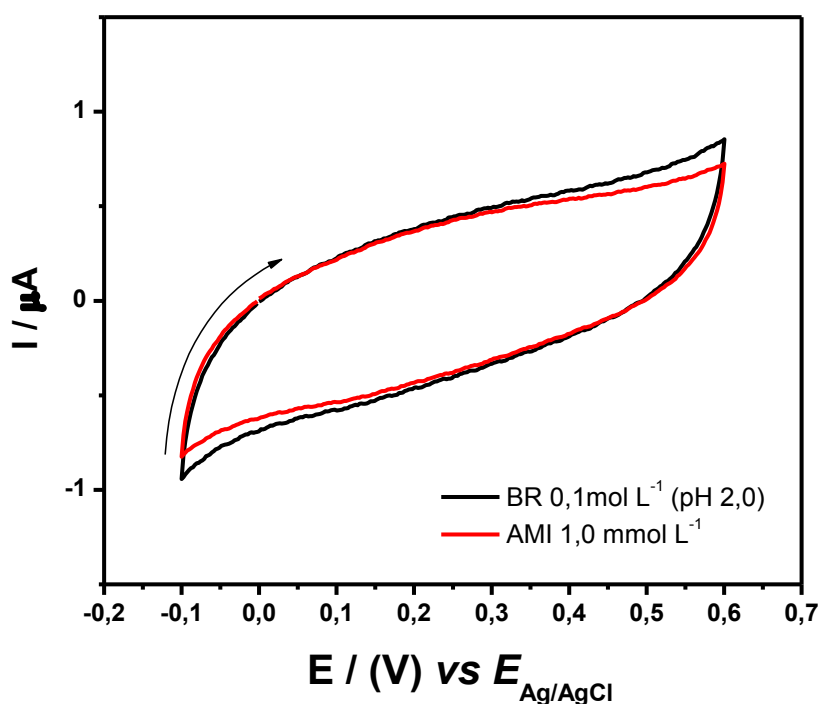


Figura 6- Voltamograma cíclico da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrado em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. Eletrodo auxiliar: Platina. Eletrodo de referência: Ag/AgCl. Intervalo de varredura: -0,1 a 0,6 V. $v = 0,05 \text{ V/s}$.

A partir do resultado apresentado na Figura 6 que mostra que o surgimento do processo de oxirredução reversível da AMI é dependente da oxidação que ocorre em 1,30 V, foi avaliada a aplicação de um potencial de acumulação (E_{acc}) de 1,40 V, valor este próximo do valor do potencial de pico de oxidação irreversível da AMI durante um tempo de acumulação (t_{acc}) de 30 s. A Figura 7 mostra o resultado obtido neste estudo. Pode-se observar também na Figura 7 que foi realizado o estudo da direção da varredura de potencial, sendo a varredura de potencial avaliada na direção anódica no intervalo de potencial de -0,1 a 0,4 V (Fig. 7A) e, em seguida, a varredura de potencial foi avaliada na direção catódica, no intervalo de potencial de 0,4 a -0,1 V (Fig. 7B).

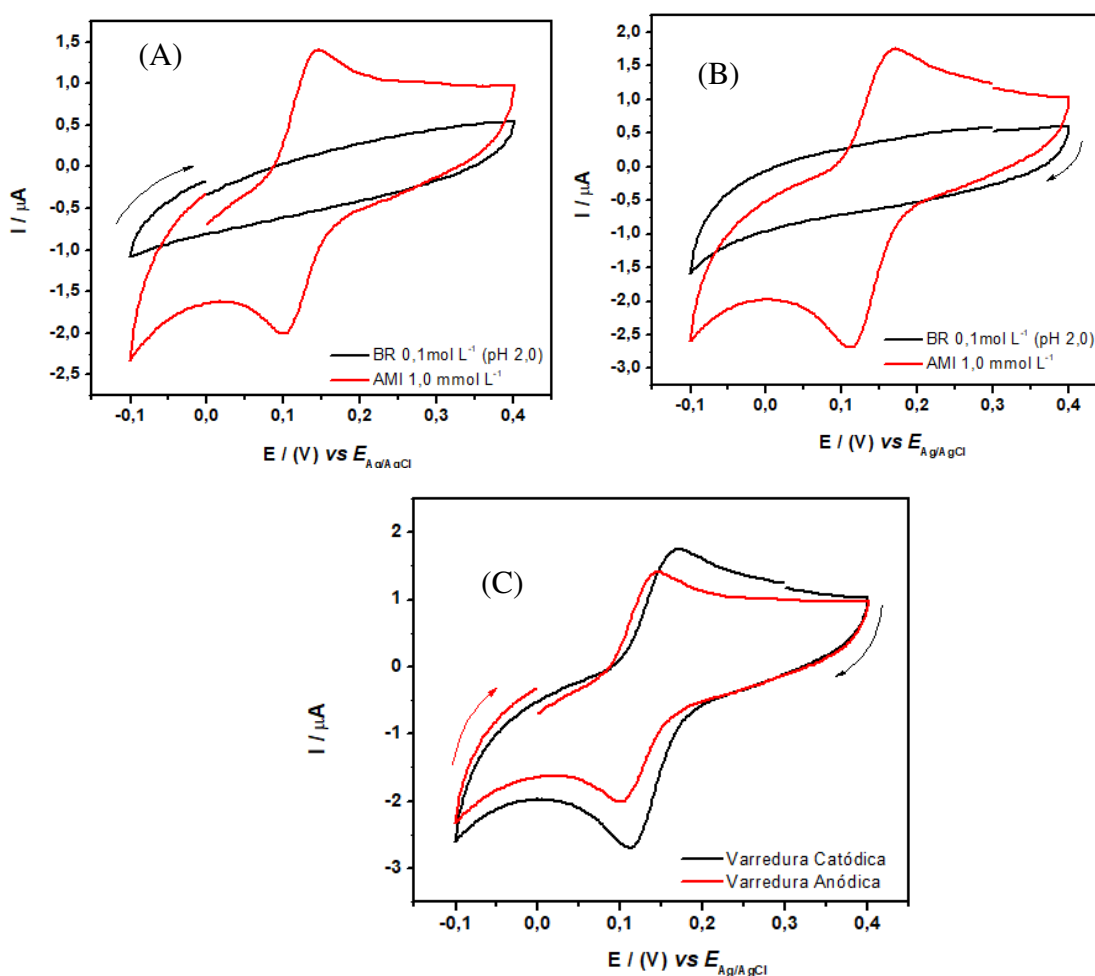


Figura 7- Voltamogramas cíclicos da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. Eletrodo auxiliar: Platina. Eletrodo de referência: Ag/AgCl. (A) Intervalo de varredura anódica: -0,1 V a 0,4 V. $v = 0,05 \text{ V/s}$. E_{acc} : 1,4 V. t_{acc} : 30 s. (B) Intervalo de varredura catódica: 0,4 a -0,1 V. $v = 0,05 \text{ V/s}$. E_{acc} : 1,4 V. t_{acc} : 30 s. (C) Comparação dos voltamogramas cíclicos obtidos para a amilorida com aplicação de intervalo de varredura catódica e anódica.

Com a análise da direção da varredura de potencial, foi possível observar que com a utilização de um potencial de acumulação de 1,40 V e de um tempo de acumulação de 30 s, o voltamograma cíclico da AMI registrado na direção da varredura catódica apresentou maiores valores de corrente de pico de oxidação e de redução (Fig. 7C), e por isso essa direção da varredura de potencial foi selecionada para as demais análises realizadas.

5.1.2 – Estudo da variação dos parâmetros voltamétricos

5.1.2.1 – Variação do potencial de acumulação (E_{acc})

Foi realizado um estudo da aplicação de diferentes valores de E_{acc} , para a otimização deste parâmetro, mantendo-se o tempo de acumulação (t_{acc}) em 30 s. A Figura 8A mostra os voltamogramas cíclicos obtidos neste estudo, onde verifica-se que a aplicação do E_{acc} foi avaliada no intervalo de 1,20 a 1,60 V. As correntes de pico (I_{pa} e I_{pc}) obtidas nos voltamogramas da Fig. 8A foram medidas e avaliadas em função do E_{acc} aplicado, como mostra a Figura 8B. Os resultados mostram que no valor de E_{acc} 1,35 V ocorreu a oxidação máxima da AMI, em que foram obtidos os maiores valores de I_{pa} e I_{pc} e em E_{acc} maiores a AMI oxidada dá origem a uma outra espécie que é posteriormente reduzida, sendo o valor de E_{acc} de 1,35 V selecionado para otimização desse parâmetro.

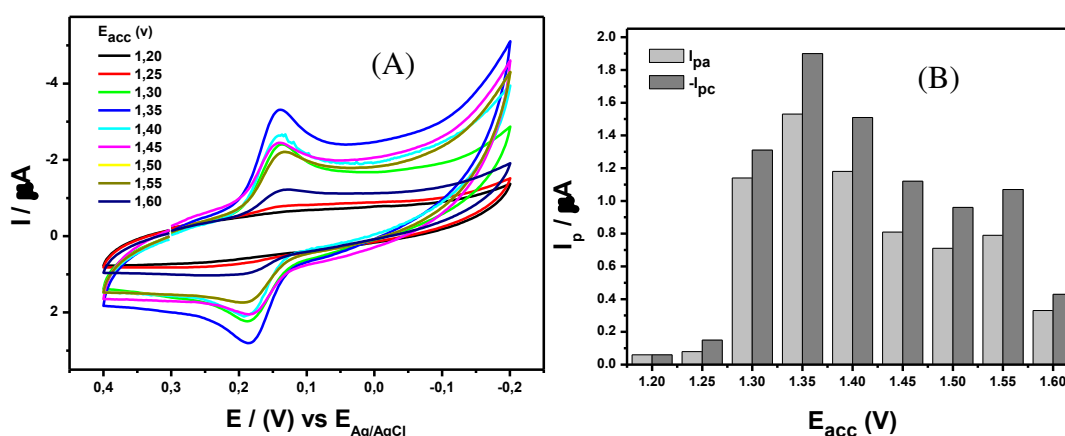


Figura 8– (A) Voltamogramas cíclicos da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) com diferentes potenciais de acumulação (E_{acc}), com $t_{acc} = 30 \text{ s}$. Intervalo de varredura catódica: de 0,4 a -0,2V, $v = 0,05 \text{ V/s}$. (B) Valores de corrente de pico anódica (I_{pa}) e corrente de pico catódica (I_{pc}) obtidos em cada valor de E_{ac} .

5.1.2.2 – Variação do tempo de acumulação (t_{acc})

Após a definição do potencial de acumulação em 1,35 V, foi realizado o estudo da variação do tempo de acumulação (t_{acc}) no intervalo de 10 a 80 s. A Figura 9A mostra os voltamogramas cíclicos da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), em diferentes tempos de acumulação (t_{acc}).

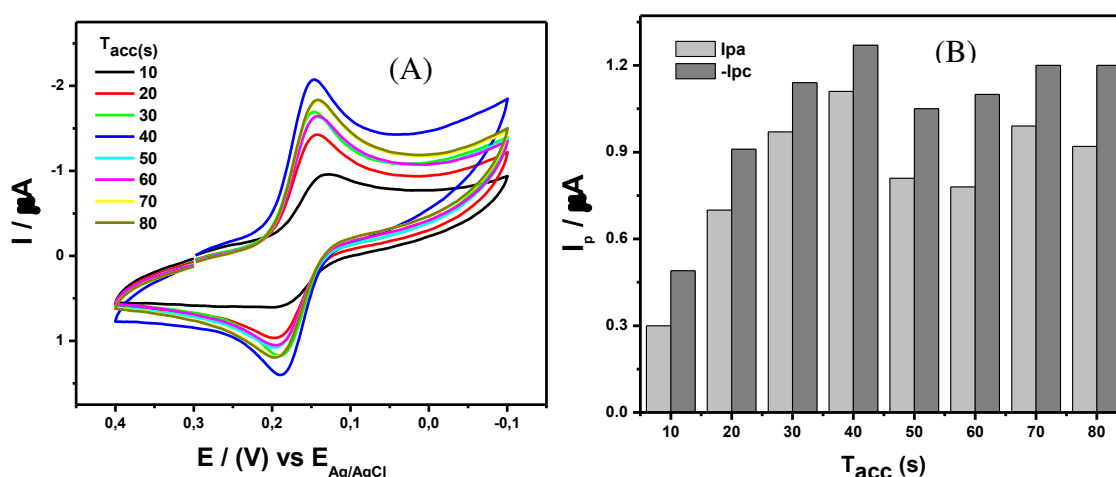


Figura 9– (A) Voltamogramas cíclicos da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), em diferentes tempos de acumulação (t_{acc}), com $E_{acc} = 1,35 \text{ V}$, Intervalo de varredura catódica: de 0,4 a -0,1 V, $v = 0,05 \text{ V/s}$. ; (B) Valores de corrente de pico anódica (I_{pa}) e corrente de pico catódica (I_{pc}) obtidos em cada valor de t_{acc} .

Pode-se observar que as correntes de pico anódicas e catódicas (I_{pa} e I_{pc}) aumentaram em função da variação do tempo de acumulação até um tempo de 40 s, e em tempos maiores do que 40 s as respectivas correntes diminuíram, provavelmente devido a oxidação de muitas moléculas dificultando a difusão, como mostra a Figura 9B. Assim, foi selecionado um tempo de acumulação de 40 s, uma vez que neste tempo se obtém maiores valores de I_{pa} e I_{pc} .

5.1.2.3 – Estudo da variação do pH

A influência do pH na resposta eletroquímica da AMI foi estudada em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de pH de 1,0 a 4,0 contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AMI, conforme mostram os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 10.

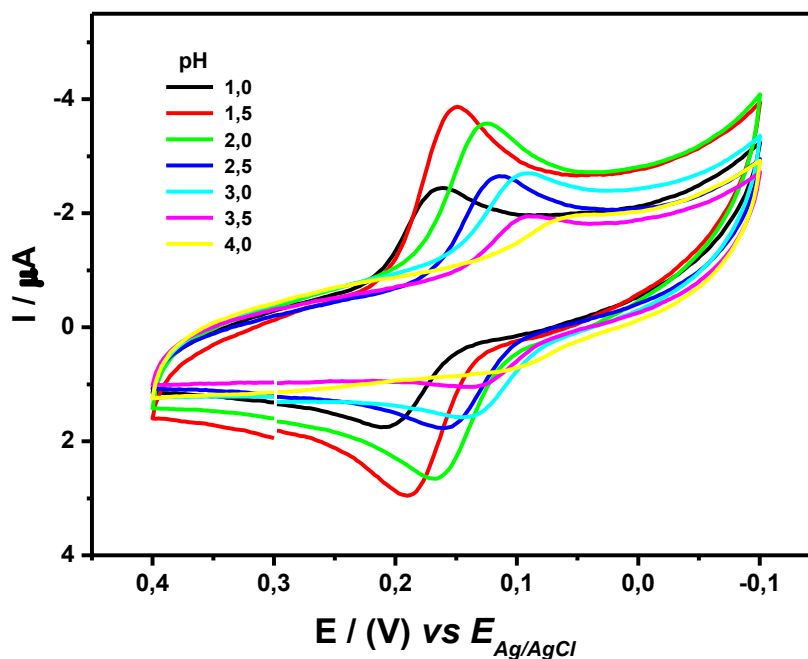


Figura 10 - Voltamogramas cíclicos da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes valores de pH, com $E_{\text{acc}} = 1,35 \text{ V}$ e $t_{\text{acc}} = 40 \text{ s}$, $v = 0,05 \text{ V/s}$.

A partir dos voltamogramas cíclicos registrados (Fig. 10), foi possível plotar um gráfico da relação das correntes de pico anódicas (I_{pa}) e de pico catódicas (I_{pc}) em função do aumento do pH (Figura 11A). Pode-se observar a partir desta Figura que os maiores valores de I_{pa} e I_{pc} foram obtidos no valor de pH de 1,5, sendo este valor otimizado utilizando nos demais experimentos.

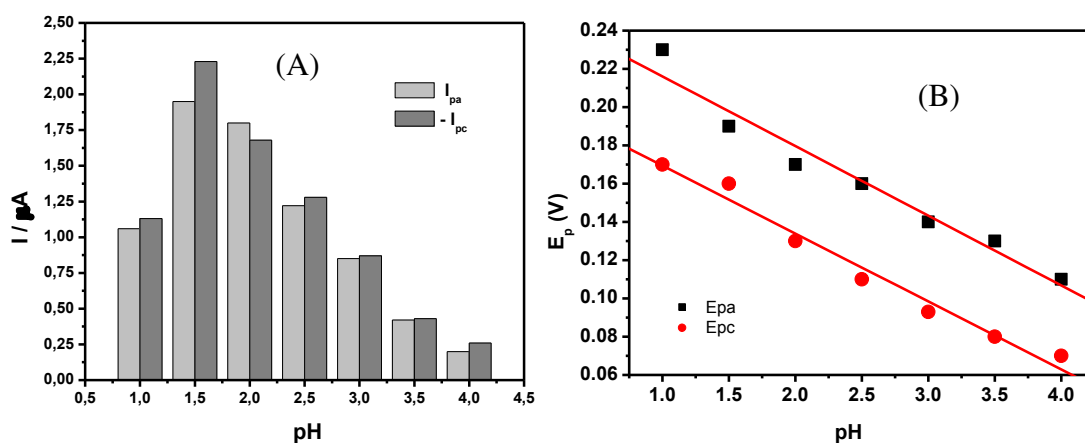


Figura 11 (A)- Valores de correntes de pico anódicas (I_{pa}) e catódicas (I_{pc}) obtidos em função do aumento do pH; **(B)** Valores de potenciais de pico anódicos (E_{pa}) e catódicos (E_{pc}) obtidos em função do aumento do pH.

Também, a partir dos voltamogramas cíclicos da Fig.10 foi possível avaliar a influência do pH nos valores dos potenciais de pico anódicos (E_{pa}) e catódicos (E_{pc}), como mostra a Figura 11B. Verifica-se na Fig.11B que os valores dos potenciais E_{pa} e E_{pc} deslocam-se para valores menos positivos com o aumento do pH, sugerindo o envolvimento de prótons na reação. Também pode ser verificado na Fig.11B que existe uma relação linear entre os valores de E_{pa} e E_{pc} e o pH, com inclinação de $-0,036V\text{ pH}^{-1}$, para o gráfico de E_{pa} vs pH (Equação 3), e também uma inclinação de $-0,036V\text{ pH}^{-1}$ para o gráfico de E_{pc} vs pH (Equação 4).

$$E_{pa} = (0,253 \pm 0,009) - (0,036 \pm 0,003) \text{ pH} \quad (R^2 = 0,958) \quad \text{(Equação 3)}$$

$$E_{pc} = (0,205 \pm 0,006) - (0,036 \pm 0,002) \text{ pH} \quad (R^2 = 0,978) \quad \text{(Equação 4)}$$

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 59\text{mV} / n \quad \text{(Equação 5)}$$

$$\Delta E / \Delta \text{pH} = (59\text{mV} / n) \times N_{\text{H}^+} \quad \text{(Equação 6)}$$

Utilizando a Equação 6 e a partir das inclinações encontradas nas Equações 3 e 4 é possível encontrar o número de prótons envolvidos na reação eletroquímica ($n_p=1$). O número de elétrons envolvidos na oxirredução da AMI pode ser determinado pela Equação 5 (BARD e FAULKNER, 2001) utilizando o voltamograma da Figura 10, os valores de E_{pa} , E_{pc} , e para AMI em pH 1,5 foram de 189mV, 148mV, respectivamente. Logo o número de elétrons transferidos (n) na oxirredução da AMI pode ser estimado sendo próximo a 1. Portanto, pode-se sugerir que no processo de oxirredução da AMI estudado, o número de prótons seja igual ao número de elétrons envolvidos.

De acordo com os números de prótons e elétrons encontrados, foi proposto um possível mecanismo de oxirredução para a AMI. Nesse mecanismo, a AMI (estrutura I) é oxidada a 1,30 V para formar as espécies mostradas na estrutura II. Esse resultado é consistente com o mecanismo proposto no trabalho de Desai; Srivastava (2012). Posteriormente, foi proposto que a espécie II formada é protonada e reduzida para formar um radical terciário, relativamente estável, com potencial de 0,12 V (espécie III), que é reoxidado em 0,15 V. O mecanismo proposto é mostrado na Figura 12.

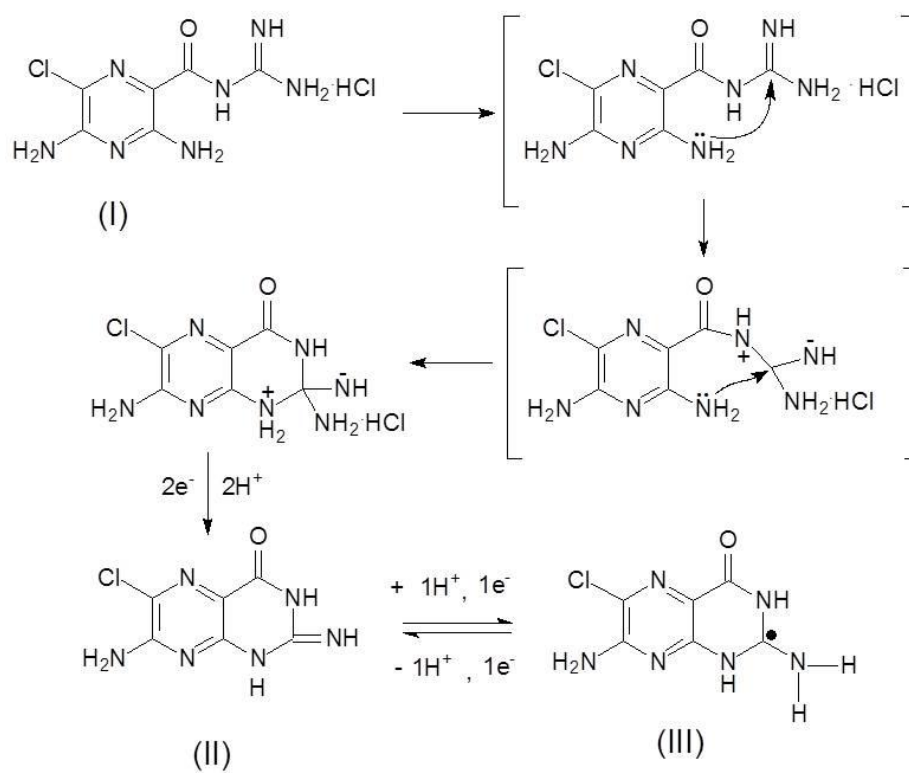


Figura 12- Mecanismo proposto para a oxirredução da AMI.

5.1.2.4 – Estudo da variação da velocidade de varredura por voltametria cíclica

Tomando como parâmetro de análise a influência da velocidade de varredura (v) nas correntes e potenciais relativos ao analito, Brett (1993) afirmou que é possível caracterizar o processo redox em superfícies de eletrodos planos ou esféricos através da técnica de voltametria cíclica. Assim, também foi realizado o estudo de variação da velocidade de varredura por voltametria cíclica de uma solução de amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,5$ em um intervalo de velocidades variando de 10 a 100 mVs^{-1} . A Figura 13 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos neste estudo, onde se verifica um aumento das correntes de I_{pa} e I_{pc} em função do aumento da velocidade de varredura e também verifica-se que os potenciais de pico anódicos (E_{pa}) e catódicos (E_{pc}) praticamente não variam como aumento da velocidade de varredura (dados também mostrados na Tabela 3).

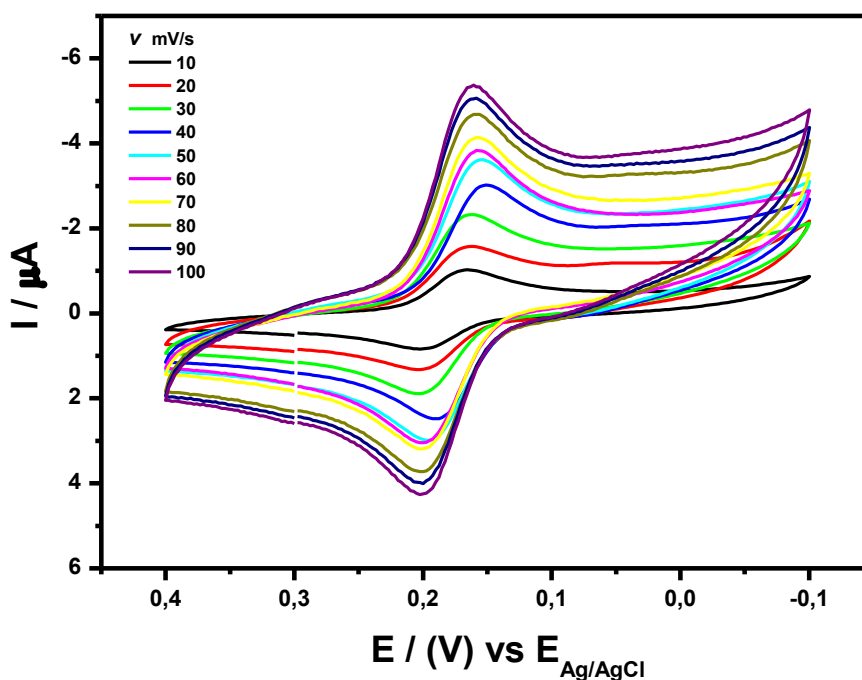


Figura 13- Voltamogramas cíclicos da amilorida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} 1,5$) em diferentes velocidades de varredura.

A partir dos voltamogramas cíclicos obtidos na Fig13 foi possível obter dados adicionais relativos à reação redox da amilorida, como mostra a Figura 14(A) e (B).

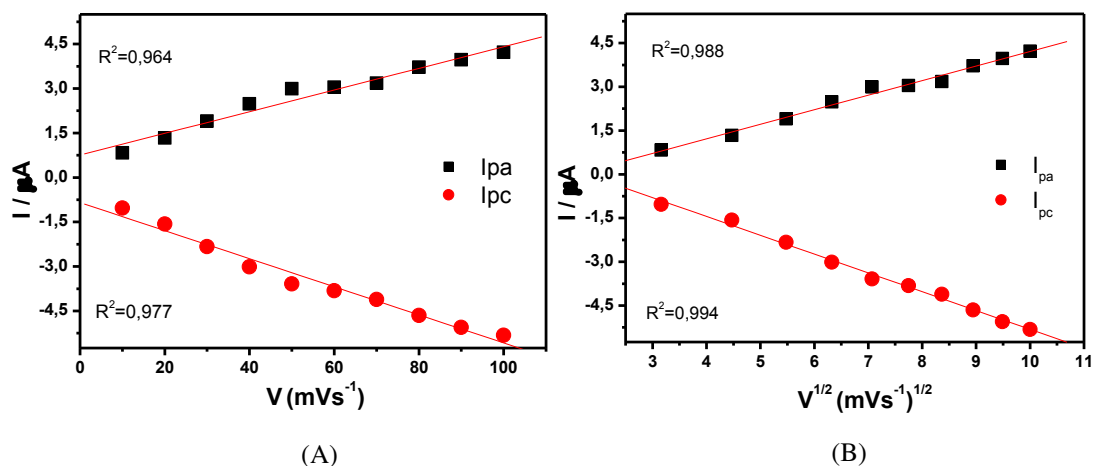


Figura 14- Gráfico de I_{pa} e I_{pc} em função de (A) Velocidade de varredura e (B) Raiz quadrada da velocidade de varredura

A partir da Figura 14A, verifica-se que as correntes de picos anódica e catódica da amilorida registradas nas condições apresentada na Fig13, variaram linearmente com a velocidade de varredura em um intervalo de 10 a 100 mVs^{-1} . Esse resultado mostra que o processo é reversível, o que também é observado no voltamograma cíclico apresentado. O mesmo perfil linear foi observado para as correntes de picos anódicas e catódicas em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, como mostra a Figura 14B. Esse resultado está relacionado com a possibilidade de um processo controlado somente por difusão.

Para comprovar se a etapa determinante da velocidade da reação redox da amilorida é somente controlada por difusão, também foram construídos gráficos de $\log I_p$ vs $\log v$. A Figura 15 mostra os resultados obtidos.

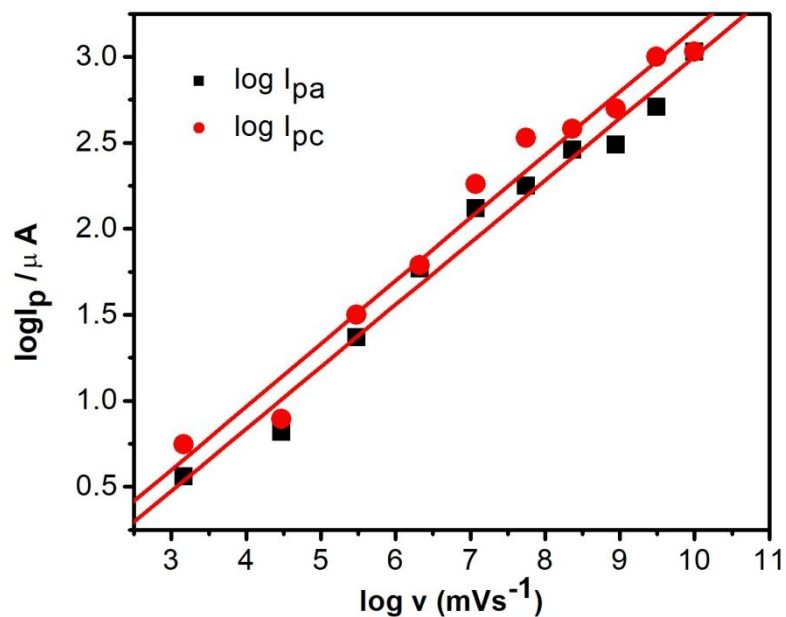


Figura 15- Gráfico do $\log I_{pa}$ vs $\log v$ e de $\log I_{pc}$ vs $\log v$

As equações das regressões lineares obtidas a partir da Figura 15 são apresentadas a seguir:

$$\log I_{pa} = - (0,606 \pm 0,130) + (0,361 \pm 0,018) \log v \quad (R^2 = 0,981) \quad (\text{Equação 7})$$

$$\log I_{pc} = -(0,499 \pm 0,156) + (0,366 \pm 0,021) \log v \quad (R^2 = 0,974) \quad (\text{Equação 8})$$

Verifica-se nas equações (7) e (8) que existe uma relação linear entre $\log I_{pa}$ vs $\log v$ e de $\log I_{pc}$ vs $\log v$ ambas apresentando valores de inclinações próximas a 0,5. De acordo com a literatura, quando o valor de inclinação de um gráfico linear de $\log I_p$ x $\log v$ for 0,5 o processo é controlado por difusão, e para uma inclinação de 1,0 o processo é controlado por adsorção, sendo os valores intermediários de inclinações observados, uma composição entre os processos por difusão e adsorção (BARD: FAULKNER, 2001). Como o valor das inclinações encontradas foram de aproximadamente 0,5 pode-se considerar que a etapa determinante da velocidade da reação redox da amilorida é controlada por um processo de difusão.

5.2 – Voltametria de pulso diferencial (DPV)

Após o estudo do perfil voltamétrico da AMI e da otimização dos parâmetros experimentais por voltametria cíclica, foi escolhida a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV) para o desenvolvimento de uma metodologia para a análise da amilorida, uma vez que essa técnica apresenta maior sensibilidade analítica do que a voltametria cíclica. Logo, a otimização dos parâmetros da técnica de DPV tais como a velocidade e amplitude do pulso foi realizada.

5.2.1 – Otimização dos parâmetros da DPV

5.2.1.1 – Estudo da variação da velocidade do pulso

Foi realizado inicialmente o estudo da variação da velocidade de pulso (v) para a escolha daquela que apresentava a maior resposta de corrente para o analito. O estudo foi realizado em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,5$, na concentração de AMI de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, no intervalo de velocidade de 1 a 10 mV s^{-1} , fazendo-se a varredura de potencial de $0,4$ a $-0,1 \text{ V}$. A Figura 16 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos neste estudo, onde se verifica que a AMI apresenta um pico de redução bem definido com $E_p = 0,18 \text{ V}$.

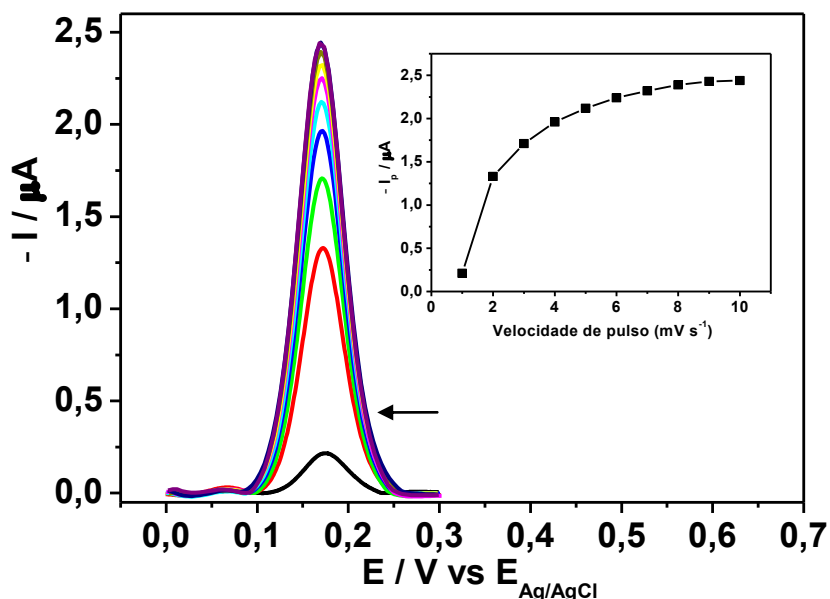


Figura 16- Voltamogramas de pulso diferencial da AMI $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ registrados em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,5) com o eletrodo de carbono vítreo, no intervalo de varredura: de 0,4 a -0,1 V, com amplitude de pulso de 20 mV e variando a velocidade de pulso de 1 a 10 mV s^{-1} . (Inserido: Gráfico de I_p vs velocidade de pulso).

Conforme mostrado inserido na Figura 16, ocorreu um aumento da corrente de pico, com o aumento da velocidade de pulso até a velocidade de 8 mVs^{-1} , permanecendo os valores de corrente de pico praticamente constantes até a velocidade de 10 mV s^{-1} . Assim, a velocidade de 10 mV s^{-1} foi selecionada visto que o resultado mostra uma corrente de pico que é constante e de intensidade máxima neste valor, além de apresentar uma boa definição do pico voltamétrico.

5.2.1.2 – Estudo da variação da amplitude do pulso

Após o estudo da variação da velocidade de pulso (v), foi realizado o estudo da variação da amplitude de pulso (a). Este estudo foi realizado em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 1,5, na concentração de AMI de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, com uma velocidade de pulso de 10 mV s^{-1} e no intervalo de amplitude de 10 a 100 mV. A Figura 17 mostra os voltamogramas de pulso diferencial registrados.

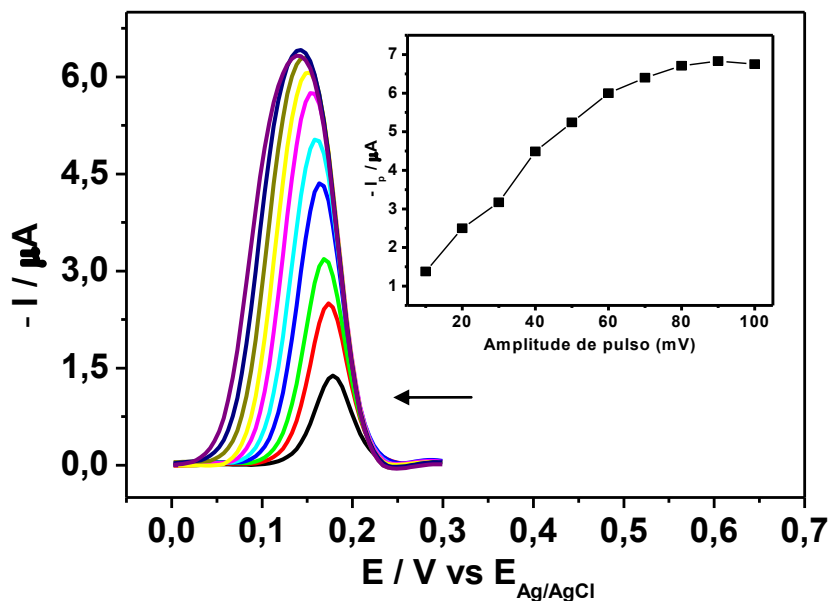


Figura 17- Voltamogramas de pulso diferencial da AMI 1,0 mmol L⁻¹ registrados em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 1,5) com o eletrodo de carbono vítreo, no intervalo de varredura: de 0,4 a -0,1 V, variando a amplitude de pulso no intervalo de 10 a 100mV, a uma velocidade de pulso de 10 mVs⁻¹.(Inserido: Gráfico de I_pvs amplitude de pulso).

Verifica-se nos voltamogramas da Figura 17 que ocorreu um aumento da corrente de pico (I_p) acompanhado de um deslocamento do potencial de pico (E_p) para valores menos positivos. Porém, concomitantemente ao aumento da I_p, houve uma diminuição da resolução do sinal voltamétrico, observado pelo alargamento da base do voltamograma. Pode ser verificado inserido na Figura 17 que a corrente de pico aumentou de forma linear como aumento da amplitude de pulso até o valor de amplitude de 70 mV, não ocorrendo aumento significativo de I_p acima deste valor. Portanto, a amplitude de 70 mV foi escolhida para as análises posteriores.

5.2.2 - Construção da curva analítica para a determinação de AMI

Após otimizados os parâmetros para a determinação da AMI por DPV ($v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e $a = 70 \text{ mV}$), em uma célula eletroquímica, a concentração de AMI foi variada com a adição de alíquotas de uma solução padrão de AMI 1,0 mmol L⁻¹ em 10 mL de tampão BR 0,1 mol L⁻¹, pH = 1,5 e em seguida, foram registrados os voltamogramas de pulso diferencial. A concentração foi variada no intervalo de 9,90 a 90,9 μmol L⁻¹. Na Figura 18 estão

apresentados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos neste estudo, os quais foram utilizados para a construção da curva analítica inserida na mesma figura. Verifica-se nos voltamogramas que a corrente aumenta em função do aumento da concentração de AMI.

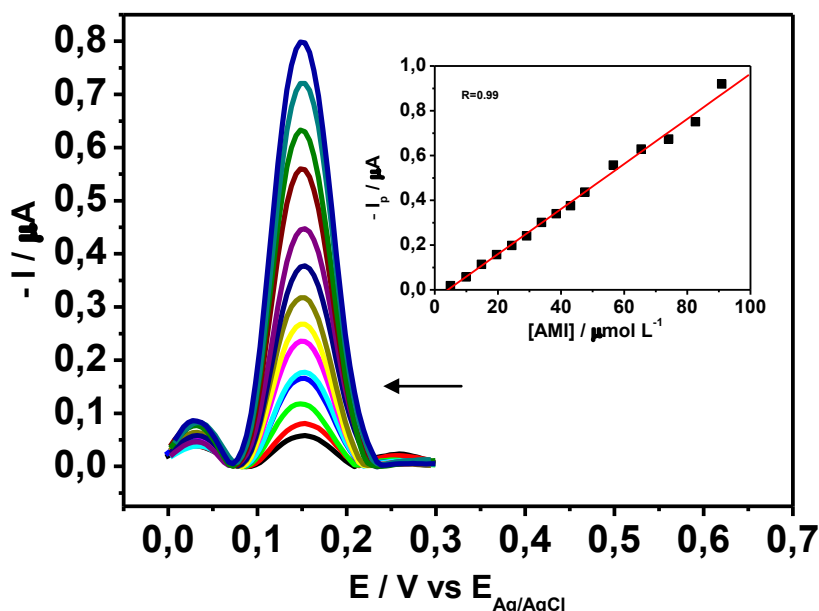


Figura 18– Voltamogramas de pulso diferencial da AMI com concentrações variando de 9,90 a 90,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ registrados em tampão BR 0,1 mol L^{-1} (pH 1,5) com o eletrodo de carbono vítreo, no intervalo de varredura: de 0,4 a -0,1 V, com amplitude de pulso de 70 mV e velocidade de pulso de 10 mVs^{-1} .

Na curva analítica inserida na Figura 18 é possível observar que existe uma relação linear entre a concentração de AMI e a intensidade de corrente de pico no intervalo estudado, sendo essa relação expressa pela equação 9.

$$I_p (\mu\text{A}) = -0,065 \pm 0,025 [\text{AMI}] / \mu\text{mol L}^{-1} + 0,012 \pm 5,058E^{-4} (\mu\text{A}) \quad (\text{Equação 9})$$

O coeficiente de correção linear (R) obtido foi igual a 0,99.

Os valores de LOD e LOQ encontrados com o método proposto foram iguais a 5,19 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 17,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, quando aplicados as equações 1 e 2 descritas no item 3.5. Entretanto, na aplicação prática e seguindo os critérios propostos pela European Commission (2002) em que a resposta obtida para a amostra do branco é de 0,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o primeiro ponto da curva analítica (9,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$) que é pelo menos cinco vezes maior que o da amostra do branco, o LOQ pode ser considerado igual a 9,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Quando

comparados aos métodos de detecção da AMI já descritos na literatura (ver Tabela 8), esses valores de LOD e LOQ são semelhantes, demonstrando assim que o método desenvolvido apresenta boa sensibilidade.

5.2.3 - Estudos de repetibilidade intradia e interdia

Com o intuito de avaliar a precisão da metodologia desenvolvida, foram realizadas medidas em três níveis de concentrações dentro do intervalo da curva analítica (24,4; 47,6 e 90,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$). As repetibilidades intradia foram efetuadas por dez voltamogramas consecutivos ($n = 10$) em um mesmo dia. Já para as repetibilidades interdia, as medidas foram realizadas em cinco dias diferentes ($n = 5$). As Tabelas 3 e 4 mostram os resultados obtidos para o estudo de repetibilidade intradia e interdia.

Tabela 3- Valores de corrente de pico (I_p), corrente de pico média ($I_{p_{med}}$) e desvio padrão relativo (DPR) das dez medidas realizadas no mesmo dia para as 24,4; 47,6 e 90,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMI.

	Repetibilidade intradia (n=10)											
[AMI] $\mu\text{mol L}^{-1}$	- I_p / μA – referentes ao número da medida										- $I_{p_{med}}$ / μA	DPR %
24,4	0,195	0,192	0,195	0,196	0,194	0,194	0,196	0,197	0,194	0,197	0,195	0,80
47,6	0,557	0,561	0,565	0,567	0,561	0,559	0,567	0,556	0,557	0,558	0,561	0,75
90,9	1,190	1,185	1,181	1,186	1,188	1,195	1,179	1,184	1,193	1,188	1,1869	0,42

Tabela 4- Valores de corrente de pico (I_p), corrente de pico média ($I_{p_{med}}$) e desvio padrão relativo (DPR) das medidas realizadas em cinco dias diferentes para as 24,4; 47,6 e 90,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMI.

	Repetibilidade interdia (n=5)						
[AMI] $\mu\text{mol L}^{-1}$	- I_p / μA – referentes ao número da medida					- $I_{p_{med}}$ /uA	DPR %
24,4	0,223	0,224	0,218	0,234	0,246	0,229	4,86
47,6	0,552	0,542	0,554	0,542	0,559	0,5498	1,37
90,9	1,050	1,110	1,097	1,061	1,081	1,0798	2,29

De acordo com os resultados dos desvios padrões relativos (DPRs) apresentados nas Tabelas 3 e 4, para ambas as repetibilidades e nos diferentes níveis de concentrações

estudados, os valores obtidos foram inferiores a 5,0 %, indicando que a metodologia proposta para determinação da AMI apresenta boa precisão.

5.2.4 – Determinação de AMI em amostras biológicas

5.2.4.1 - Estudos de interferentes

Com o intuito de analisar a seletividade da metodologia proposta, foi realizado um estudo de substâncias que são potencialmente interferentes presentes em urina e soro humano (ácido cítrico, ácido úrico e ácido ascórbico). As soluções dos interferentes estudados foram preparadas na relação (solução de AMI: interferente) de 1:100 nas condições otimizadas (tampão BR 0,1 mol L⁻¹ e pH = 1,5) em concentração fixa de AMI 47,6 μmol L⁻¹. Para se obter uma resposta relativa, as correntes de pico registradas para a solução de AMI na presença de interferentes foram comparadas com as correntes de pico registradas para a solução de AMI sem interferentes. Com o propósito de alcançar melhor confiabilidade dos resultados, todas as medidas foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5– Efeito de alguns possíveis compostos interferentes na determinação de AMI. [interferente adicionado] = 4,76 mmol L⁻¹, [AMI] 47,6 μmol L⁻¹.

Substâncias interferentes	Resposta relativa %
Ácido cítrico	96,8(±0,1)
Ácido úrico	96,2(±3,0)
Ácido ascórbico	-

Na Tabela 5 é possível constatar que as respostas relativas estudadas para a AMI na presença dos interferentes, ácido cítrico e ácido úrico foram próximas a 100%, indicando que essas substâncias testadas não interferem significativamente na resposta eletroquímica da AMI. Entretanto, o ácido ascórbico interferiu na resposta eletroquímica da AMI quando avaliado em uma concentração 100 vezes maior do que a concentração de AMI. Este composto geralmente encontra-se presente nas amostras de soro humano, sendo, portanto, um potencial interferente para a análise de AMI neste tipo de amostra.

5.2.4.2 – Determinação de AMI em amostras de urina e soro humano

Com o propósito de analisar a exatidão do método desenvolvido para a determinação de AMI em urina, foram realizados testes de adição e recuperação com a adição de três quantidades conhecidas de AMI (47,6; 65,4 e 90,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de urina. De forma análoga, para análise em soro, testes de adição e recuperação foram realizados com a adição de três quantidades conhecidas de AMI (30,0; 54,5 e 75,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de soro. Para uma maior confiabilidade dos resultados, os testes de adição e recuperação foram realizados em triplicata (n=3). O valor percentual de recuperação foi obtido através da razão entre a concentração de AMI (amostra + padrão adicionado) encontrada e a concentração de AMI esperada multiplicada por 100. Nas tabelas 6 e 7 estão apresentados os resultados dos testes de adição e recuperação de AMI em amostras de urina humana e de soro humano.

Tabela 6 - Resultados da adição e recuperação de AMI em amostras de urina humana usando a metodologia desenvolvida.

Amostra de Urina Humana	[AMI] adicionada (μmolL^{-1}) (n=3)	[AMI] esperada (μmolL^{-1}) (n=3)	[AMI] encontrada (μmolL^{-1}) (n=3)	Recuperação (%) (n=3)
A	0,0	–	0,0	–
	47,6	47,6	47,2(\pm 1,7)	99,2(\pm 3,6)
	65,4	65,4	68,2(\pm 2,4)	104,3(\pm 3,5)
	90,9	90,9	91,5(\pm 1,7)	100,6(\pm 1,9)
B	0,0	–	0,0	–
	47,6	47,6	50,6(\pm 2,0)	106,3(\pm 4,0)
	65,4	65,4	62,4(\pm 4,0)	95,4(\pm 6,4)
	90,9	90,9	92,1(\pm 1,7)	101,3(\pm 1,8)
C	0,0	–	0,0	–
	47,6	47,6	47,9(\pm 3,6)	100,6(\pm 7,5)
	65,4	65,4	67,0(\pm 4,0)	102,4(\pm 6,0)
	90,9	90,9	91,5(\pm 4,7)	100,7(\pm 5,1)

Tabela 7 - Resultados da adição e recuperação de AMI em amostras de soro humano usando a metodologia desenvolvida.

Amostra de Soro Humano	[AMI] adicionada (μmolL^{-1}) (n=3)	[AMI] esperada (μmolL^{-1}) (n=3)	[AMI] encontrada (μmolL^{-1}) (n=3)	Recuperação (%) (n=3)
A	0,0	–	0,0	–
	30,0	30,0	24,7(\pm 2,3)	82,3(\pm 9,3)
	54,5	54,5	51,3(\pm 7,9)	94,1(\pm 15,4)
	75,0	75,0	79,5(\pm 8,6)	106,0(\pm 10,8)
B	0,0	–	0,0	–
	30,0	30,0	24,7(\pm 2,3)	82,3(\pm 9,3)
	54,5	54,5	52,1(\pm 8,9)	95,6(\pm 17,1)
	75,0	75,0	79,0(\pm 7,4)	105,3(\pm 9,4)
C	0,0	–	0,0	–
	30,0	30,0	28,3(\pm 1,6)	94,3(\pm 5,7)
	54,5	54,5	51,2(\pm 5,1)	93,9(\pm 10,0)
	75,0	75,0	78,1(\pm 4,2)	104,1(\pm 5,4)

Conforme apresentado nas Tabelas 6e 7, a metodologia proposta apresentou bons percentuais de recuperação de AMI nas amostras de urina e soro humano analisadas, com valores de recuperação compreendidos entre $95,4 \pm 6,4\%$ a $106,3 \pm 4,0\%$ e $82,3 \pm 9,3\%$ a $106,0 \pm 10,8\%$, respectivamente, comprovando a boa exatidão do método desenvolvido.

5.2.5 Comparação com outros métodos analíticos descritos para análise da AMI

Foi realizada uma comparação do método eletroquímico desenvolvido neste trabalho com métodos previamente descritos na literatura para análise da AMI em amostras reais. Essa comparação foi elaborada com base em alguns parâmetros definidos, sendo eles: eletrodo de trabalho, técnica, intervalo linear de concentração, limite de detecção, limite de quantificação e o tipo de amostra analisada. A Tabela 8 mostra uma síntese do comparativo desses métodos descritos na literatura. Com a análise da tabela é possível perceber que o método proposto no

presente trabalho apresentou valores comparáveis com os métodos descritos na literatura, apresentando-se como uma alternativa rápida, direta e sensível para a determinação de AMI em fluidos biológicos.

Tabela 8 - Comparação entre algumas características do método analítico proposto para determinação da AMI com outros métodos analíticos descritos na literatura.

Ref.	Eletrodo	Técnica	Intervalo linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Amostra
(MORAES et al., 2017)	Diamante dopado com boro	SWV	8,70 a $1,25 \times 10^2$	$9,00 \times 10^{-2}$	-	Formulação farmacêutica e Água de torneira
(HAMMAM, 2004)	Mercúrio	SWAdCS	$2,00 \times 10^{-3}$ a 0,20	$1,90 \times 10^{-4}$ $5,7 \times 10^{-4}$	$6,30 \times 10^{-4}$ $1,90 \times 10^{-3}$	Formulação farmacêutica e Soro humano
(EL-HEFNAWY et al., 2004)	Mercúrio	Polarografia a/DPAdCS	$2,50 \times 10^1$ a $2,50 \times 10^2$ $2,0 \times 10^{-2}$ a 1,00	$1,00 \times 10^1$	$3,30 \times 10^2$	Formulação farmacêutica
(DESAI:SRIVASTA VA2012)	NAF-CNT-GCE	AdSDPV	$9,07 \times 10^{-3}$ a $5,06 \times 10^1$	$7,02 \times 10^{-3}$	-	Formulação farmacêutica e fluidos biológicos
(ZAYED et al., 2013)	CPE	DPV	2,61 a $1,84 \times 10^1$	1,13	3,79	Formulação farmacêutica
(PEREIRA et al., 2016)	Diamante dopado com boro	BIA-MPA	$1,31 \times 10^1$ a $6,97 \times 10^2$	0,57	1,87	Formulação farmacêutica
(KHORSHEDE et al., 2019)	SPEs	DPV	0,33 a $2,28 \times 10^1$	0,18	-	Formulação farmacêutica e Urina humana
Presente trabalho	Carbono Vítreo	DPV	9,90 a $9,09 \times 10^1$	5,19	9,90	Soro humano e Urina

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreveu o desenvolvimento de uma metodologia eletroquímica, utilizando a voltametria de pulso diferencial (DPV), para a determinação direta de AMI em fluidos biológicos empregando o GCE.

Através da voltametria cíclica foi estudado o processo de oxirredução da AMI que ocorre no intervalo de potencial de 0,4 a - 0,1 V, sendo este processo caracterizado como reversível e controlado por difusão. Foi mostrado que o processo de oxirredução da AMI comporta-se como um sistema nernstiano e é dependente do pH do eletrólito suporte, sendo envolvidos um mesmo número de prótons e elétrons no processo (1H^+ e 1e^-).

O método proposto para determinação de AMI apresentou, após a otimização dos parâmetros da DPV, uma considerável faixa linear de 9,90 a 90,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$, LOD (5,19 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e LOQ (9,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$) baixos e boa precisão para os valores de repetibilidade intradia e interdia (DPR inferiores a 5,0 %) para os diferentes níveis de concentrações estudados (24,4; 47,6 e 90,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente).

O método foi aplicado na determinação de AMI em amostras de urina e soro humano de forma direta, não sendo necessário o tratamento prévio das amostras, apresentando boa exatidão, a qual foi avaliada através dos resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação do analito nas amostras.

Ao realizar o estudo de interferentes, os resultados evidenciaram que os compostos encontrados em fluidos biológicos tais como ácido cítrico, ácido úrico e ácido ascórbico, não interferem na determinação de AMI em urina. No entanto, o ácido ascórbico, que normalmente está presente em amostras de soro, mostrou ser um potencial interferente para a determinação de AMI neste tipo de matriz. Esse resultado evidencia que o método proposto é seletivo para a determinação da AMI em amostra de urina. Porém o método apresenta como limitação a determinação da AMI em amostra de soro.

O método eletroquímico desenvolvido exibiu características relevantes para um método de determinação analítico, como baixo custo, exatidão, simplicidade, reprodutibilidade, sensibilidade, sendo, apropriado para a determinação e quantificação, com seletividade, de AMI em amostras de urina.

REFERÊNCIAS

- AL AZZAM, K. M.; SAADA, B. ABOUL-ENEIN, Y. Simultaneous determination of atenolol and amiloride in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection; *Biomed. Chromatogr.*, v. 24, p. 948–953, 2010.
- ANVISA. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003, p. 1–15, 2003.
- ARAÚJO, T. M. E. et al. Prevalência da hipertensão arterial sistólica entre caminhoneiros que trafegam pela cidade de teresina. *SANARE-Revista de Políticas Públicas*, v. 14, n. 1, 2015.
- BARD, A.J., FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2. ed. New York: [s.n.]
- BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. *Plano nacional de saúde: PNS 2016-2019*. 2016. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/ultimas_noticias/2016/docs/planonacionalsaude_2016_2019.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica. Hipertensão Arterial Sistêmica. *Cadernos de Atenção Básica, n° 37*. Brasília – DF, 2013
- BRETT, Christopher et al. *Electrochemistry: principles, methods, and applications*. 1993.
- BRITO, T. M.; BORTOLOTTI, L. A. Denervação renal no tratamento de hipertensão arterial resistente. *Hipertensão*, v. 18, n. 4, p. 145-8, 2011.
- CABAFFN, L.M.; LASEMA, J. J.; Solid surface room-temperature phosphorescence analysis of banned substances in sport *Analytica Chimica Acta*, v. 270, p. 239-245, 1992.
- CENATTI, J. L. et al. Caracterización de pacientes hipertensos de una unidad básica de salud de la familia. *Revista de Enfermagem e Atenção a Saúde REAS*, v.2, n.1, p.21-31, 2013.
- COSTA, J. V. et al. Análise de fatores de risco para hipertensão arterial em adolescentes escolares. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 20, n. 2, p. 289-295, 2012.
- DESAI, P. B.; SRIVASTAVA, K. A. Determination of amiloride at Nafion–CNT-nano composite film sensor employing adsorptive stripping differential pulse voltammetry, *Sensors and Actuators B* v. 169, p. 341– 348, 2012.

EL-HEFNAWY, G. B.; EL-HALLAG, I. S.; GHONEIM, E. M.; GHONEIM, M. M. Electrochemical behavior and determination of amilorida drug in bulk form and pharmaceutical formulation at mercury electrodes, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 34, p. 899–907, 2004.

ENSAFI, A. A.; ALLAFCHIAN, A.R. Novel and selective potentiometric membrane sensor for amiloride determination in pharmaceutical compounds and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, p. 802-806, 2008.

EUROPEAN COMMISSION; *Official Journal of the European Communities*, 17/08/2002, L221/8-36

FERRARO, M. F.;CASTELLANO, P. M.;KAUFMAN, T. S. A spectrophotometric partial least squares (PLS-1) method for the simultaneous determination of furosemide and amiloride hydrochloride in pharmaceutical formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* v. 26, 443–451, 2001.

FERREIRA, M. M. C. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

FREITAS, S. R. S. *Epidemiologia Genética da Hipertensão Arterial Primária em Populações Brasileiras: Estudo de polimorfismos em genes do sistema renina angiotensina aldosterona e fatores clínicos/antropométricos*. Tese (doutorado). FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2006.

GOODMAN; GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. [tradução da 10. ed. original, Carla de Melo Vorsatz. et al] Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005).

GRUPTA,V. K.; JAINM, R.;RADHAPYARI,K.;JADON, N.; AGARWAL,S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—A review *Analytical Biochemistry*, v. 408, p. 179–196, 2011.

GUIA DE REFERÊNCIA RÁPIDA. Hipertensão Manejo clínico da hipertensão em adultos, Versão Profissionais. 1ª edição, 2013, *Superintendência de Atenção Primária*. Rio de Janeiro, 2013.

GUMUSTAS, M.; OZKAN, S. A. The Role ofandthePlaceofMethodValidation in DrugAnalysisUsingElectroanalyticalTechniques. *The Open Analytical Chemistry Journal*, v. 5, p. 1–21, 2011.

HAMMAN, E. Behavior and quantification studies of amiloride drug using cyclic and square-wave adsorptive stripping voltammetry at a mercury electrode. *JournalofPharmaceuticalandBiomedicalAnalysis*, v. 34, p. 1109-1116, 2004.

IBIAPINA, D. F. N.; SANTOS, A. N.; DE OLIVEIRA, L. N. R. Conhecimento dos pacientes com hipertensão arterial sobre a quantidade de sódio presente nos alimentos. *Revista Interdisciplinar*, v. 6, n. 4, p. 75-85, 2013.

INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos – DOQ CGCRE-008. *Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial*, p. 25, 2007.

JÚNIOR, O. P. Hipertensão resistente: como eu trato. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.18, n.4, p.160-2, 2011

KAUFFMANN, J. M.; VIRE, J. C. Pharmaceutical and biomedical applications of electroanalysis, *Anal. Chim. Acta*, v. 273, p. 329, 1993.

KHORSHED, A. A.; KHAIRY, M.; BANKS, C. E. Electrochemical determination of antihypertensive drugs by employing costless and portable unmodified screen-printed electrodes. *Talanta*, v. 198, p. 447-56, 2019.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. In: *Métodos cromatográficos de análise*. [s.l.] Rima, 2004. v. 6.

LOPES, N. P. et al. Perfil de fatores determinantes da HAS de uma população específica em uma região delimitada de Curitiba-PR. *Revista do Curso de Enfermagem*, v. 1, n. 01, 2015.

MACHADO, M. C.; PIRES, C. G. S.; LOBÃO, W. M. Perceptions of hypertensive people on risk factors for the disease. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 17, n. 5, p. 1357-1363, 2012.

MALTA, D. C. et al. A vigilância e o monitoramento das principais doenças crônicas não transmissíveis no Brasil - Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Rev. bras. Epidemiol.*, v.18, supl 2, p. 3-16, dez. 2015.

MENDES, M. S. F. et al. Avaliação dos fatores de risco cardiovasculares em uma população rural brasileira Cardiovascular risk factor assessment in a rural Brazilian population Evaluación de los factores de riesgo cardiovascular. *Cad. Saúde Pública*, v. 30, n. 6, p. 1183-1194, 2014.

MINAS GERAIS. Secretaria do Estado de Saúde. *Atenção à Saúde do Adulto: Linha Guia de Hipertensão Arterial Sistêmica, Diabetes Mellitus e Doença Renal Crônica*. Belo Horizonte: SAS/ MG 2013.

MIRANDA, L. et al. Validação intralaboratorial da determinação de metiltestosterona em águas naturais por voltametria usando eletrodo de gota pendente de mercúrio. *Quim. Nova*, v. 38, n. 3, p. 419-426, 2015.

MORAES, J. T. et al. Advanced sensing performance towards simultaneous determination of quaternary mixture of antihypertensives using boron-doped diamond electrode. *Microchemical Journal*, v. 134, p. 173-180, 2017.

MYUNG, C. S.; BAE, J. W.; PARK, Y. S.; KIM, M. J.; CHOI, C. I.; Song, Y.; AS, J. H.; JANG, C. G.; LEE, S. Y. Analytical HPLC Method Validation of Amiloride and Its

Pharmacokinetic Study in Humans *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.31, p. 2455–2466, 2008.

NICHOLS, M. et al. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *European Heart Journal*, v. 35, n. 42, p. 2950-2959, 2014.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; DE ALMEIDA, V. G.; RITTA, A. G. S.; AUCÉLIO, R.Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os conceitos. *Revista Virtual de Química*, v.5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PAWAR,P. Y.;JOSHI, R. S.;SANDHAN, V.;WAGH, S.;JANGALE, K. Simultaneous spectrophotometric estimation of Amlodipine Besylate and Benazepril HCl in pure and pharmaceutical dosage form, *Der Pharmacia Lettre*, v. 3, n. 3, p. 397-403, 2011.

PERALTA,C. M.;FERNÁNDEZ, L. P.; NASI, A. N.; A novel application of immobilization on membranes for the separation and spectrofluorimetric quantification of amiloride and furosemide in pharmaceutical samples, *Analytica Chimica Acta*, v. 661, p. 85–90, 2010.

PEREIRA, P.F. et al.A high-throughput BIA-MPA method for the simultaneous determination of amiloride and furosemide. *Analytical Methods*, v. 8, n. 44, p.7959-65, 2016.

POULOU-PARISSI, M.; REISOPOULOU, V.; KOUPPARIS, M.; MACHERAS, P. ; Second derivative UV spectrophotometric determination of hydrochlorothiazide and hydrochlorothiazide-amiloride combination in tablets *International journal of Pharmaceutics*, v. 511, p. 69-174, 1989.

REEUKIJK, H. J. E. M.; TJADEN, U. R. Van der GREEF, j. Simultaneous determination of furosemide and amiloride in plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, v. 515, p. 269-214, 1992.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química nova*, v. 27, p. 771–780, 2004.

RIERA, A. R. P. Hipertensão arterial: conceitos práticos e terapêuticos. *São Paulo: Atheneu*, 2000. 462p.

SANJULIANI, A. F. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica. *Rev da SOCERJ*, 2002.

SANTOS, A.; PEREIRA, C. Alimentação e Hipertensão Arterial em Portugal. *RevistaFactores de Risco*, n. 32, p. 13-17, 2014.

SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F. L.; CROUCH, S. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Cengage Learning, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretrizes Brasileiras De Hipertensão VI. *Revista Hipertensão*, v. 13, n. 1, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 95, n.1 supl.1, p. 1-51, 2010.

SOUSA, H. W. O. et al. Portadores de hipertensão arterial: fatores de risco e prática farmacológica. *RevistaTema*, v.13, n. 18-19, 2012.

THE BRITISH PHARMACOPEIA, Volume 1-2, HMSO, Stationery Office Books, London, 1988.

THE UNITED PHARMACOPOEIA, 21st revision, Easton PA, Mack Printing company, USP XXI, 1985.

TORAL, M. I.; POPE, S.; QUINTANILHA, S.; RICHTER, P.; Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first digital derivative spectrophotometry, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 249 p. 117-126, 2002.

TOY, E. C. et al. *Casos clínicos em farmacologia*. 3^a edição. AMGH Editora LTDA, 91 p. 2015.

TSVETKOVA, B. G.; PEIKOVA, L. p.; Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of Amlodipine Besylate and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage form, *Journal of Chemical and pharmaceutical Research*, v. 5, n. 1, p. 271-275, 2013.

WANG, S. *et al.* Electrochemical Enzyme-Linked Immunoassay for the Determination of Estriol Using Methyl Red as Substrate. *Analytical Letters*, v. 39, n. 5, p. 947–956, 2006.

ZAYED, S. I M.; ARIDA, H. A. M.; Preparation of Carbon Paste Electrodes and Its Using in Voltammetric Determination of Amiloride Hydrochloride Using in the Treatment of High Blood Pressure *Int. J. Electrochem. Sci.*, v. 8, p. 1340 – 1348, 2013.

ANEXO A - TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO

ARTIGO PUBLICADO

Thais O. Nascimento, Fernando R. F. Leite, Henrique A. J. L. Mourão, Andréa R. Malagutti. Development of an electroanalytical methodology using differential pulse voltammetry for amiloride determination. *J. Solid State Electrochem*, 2020.

Journal of Solid State Electrochemistry
<https://doi.org/10.1007/s10008-020-04559-5>

ORIGINAL PAPER



Development of an electroanalytical methodology using differential pulse voltammetry for amiloride determination

Thais O. Nascimento¹ · Fernando R. F. Leite¹ · Henrique A. J. L. Mourão² · Andréa R. Malagutti¹

Received: 31 January 2020 / Revised: 13 March 2020 / Accepted: 16 March 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

In this work, an analytical electrochemical method was developed using a glassy carbon electrode (GCE) for the determination of amiloride (AMI). To study the electrochemical behavior of AMI, the cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry techniques were used, adding a AMI solution in 0.1 mol L⁻¹ BR buffer solution (pH 2.0) to the electrochemical cell. A reversible AMI oxi-reduction process was revealed in the scan rate of +0.4 to -0.1 V. The DPV parameters optimized were the scan rate (10 mV s⁻¹) and amplitude (70 mV). After parameters optimization, the linear working range was from 9.90 to 90.9 μmol L⁻¹, with detection limit of 5.19 μmol L⁻¹ and quantification limit of 17.3 μmol L⁻¹. The validity of the electroanalytical method for the determination of AMI in biological fluids (urine and serum) was demonstrated. The proposed method is advantageous due to its good sensitivity, speed, simplicity, precision, and accuracy towards AMI quantification.

Keywords Amiloride · Electroanalysis · Differential pulse voltammetry · Cyclic voltammetry

ANEXO B - TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

NASCIMENTO, T. O.; LEITE, F. R. F.; MALAGUTTI, A. R. Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica utilizando voltametria de pulso diferencial para determinação de amilorida em urina humana. Trabalho apresentado na modalidade pôster no VII SINTEGRA UFVJM – **Semana da Integração Ensino, Pesquisa e Extensão**, Diamantina, MG, 2019.



NASCIMENTO, T. O.; LEITE, F. R. F.; MALAGUTTI, A. R. Electrochemical study of amiloride drug and its determination in urine using differential pulse voltammetry. Trabalho apresentado na modalidade pôster no XXII SIBEE – **Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Ribeirão Preto, SP, 2019.

