

Oxidação Eletroquímica de Anlodipino e Hidroclorotiazida Sobre o Eletrodo de Diamante Dopado com Boro: Potencialidade de Determinação Simultânea em Urina

Guilherme Roberto Mansano, Elen Romão Sartori*

Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, CEP: 86057-970, Londrina – PR, Brasil.

Article history: Received: 17 November 2014; revised: 25 February 2015; accepted: 26 February 2015. Available online: 22 March 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v7i1.673>

Abstract: The present study was undertaken to evaluate the use of boron-doped diamond electrode in the simultaneous voltammetric determination of antihypertensives amlodipine and hydrochlorothiazide in urine sample. Two very well-resolved and reproducible oxidation peaks of amlodipine and hydrochlorothiazide, with separation of 0.360 V, were obtained in Britton-Robinson buffer (pH 5.0). Under the optimum analytical experimental conditions, the square-wave voltammetric method exhibited linear responses for simultaneous determination of amlodipine and hydrochlorothiazide in the concentration range $1.0 \times 10^{-7} - 2.1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ and $2.0 \times 10^{-6} - 2.2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, with detection limits of 5.6×10^{-8} mol L⁻¹ and 1.6×10^{-7} mol L⁻¹, respectively. The proposed method was applied in the simultaneous determination of amlodipine and hydrochlorothiazide in urine sample.

Keywords: amlodipine determination; hydrochlorothiazide determination; voltammetry; boron-doped diamond electrode

1. INTRODUÇÃO

O besilato de anlodipino (ANL) e hidroclorotiazida (HCZ) são agentes anti-hipertensivos indicados e utilizados pelos pacientes hipertensivos em estágios da doença considerados moderados ou graves. O ANL é um bloqueador do canal de cálcio e a HCZ tem ação diurética, aumentando a eliminação de líquidos pela urina, que também pode aumentar ou potencializar a ação de outros compostos anti-hipertensivos. Ambos analitos são metabolizados no fígado, sendo em média excretado na urina em uma quantidade de 10% da dose consumida na forma inalterada [1]. A Agência Mundial Antidoping – AMA (World Anti-Doping Agency) apresenta a HCZ como substância proibida em práticas esportivas. Neste contexto, torna-se importante o desenvolvimento de um procedimento analítico visando um controle destes compostos em amostras biológicas, como testes para identificação de doping [2].

Existem diversos métodos analíticos descritos na literatura para a determinação simultânea de vários

anti-hipertensivos, no qual utilizam a cromatografia [3, 4], a espectrofotometria [3, 5] e a voltametria [6-8]. Dentre essas, a voltametria é bastante atrativa, devido ao seu baixo custo, rapidez de aquisição de resultados, fácil manuseio, além de dispensar o uso de reagentes orgânicos, de média ou alta toxicidade. Essas técnicas mensuram apenas as moléculas eletroativas de maneira muito sensível e específica, diminuindo o efeito de possíveis interferentes não eletroativos, tornando o tratamento da amostra mais fácil e com uma alta repetibilidade e exatidão, fornecendo ainda, dados para a interpretação do comportamento eletroquímico do sistema. Recentemente, nosso grupo reportou a determinação simultânea de alguns anti-hipertensivos em formulações farmacêuticas empregando o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) ou o eletrodo de pasta de nanotubos de carbono [6-8]. O EDDB é um material sintetizado que possui ótimas propriedades para sua aplicação na eletroanálise. Esse eletrodo surge como alternativa frente aos eletrodos convencionais por apresentar vantagens físicas e químicas, como ampla janela de potencial de trabalho

*Corresponding author. E-mail: elensartori@uel.br

(-1,5 V até 2,5 V vs Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹), baixa e estável corrente de fundo, fraca adsorção de moléculas, alta estabilidade física e térmica, não necessita de modificação de sua superfície e ainda, apresenta repetibilidade e reprodutibilidade nos dados obtidos [9-11]. Cabe ressaltar que não há algum método voltamétrico descrito na literatura para a determinação simultânea de ANL e HCZ em amostras biológicas.

Dessa forma, nesse trabalho é relatada a potencialidade do EDDB em conjunto com a voltametria de onda quadrada (VOQ) para o desenvolvimento de um procedimento analítico para a determinação simultânea de ANL e HCZ em amostra de urina, para identificação de possível doping em atletas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as soluções empregadas nos experimentos foram preparadas a partir de reagentes comerciais de grau analítico, sendo preparadas com água destilada e deionizada, purificada em um sistema Milli-Q (Millipore®). Os reagentes empregados foram anlodipino (como besilato) e hidrocortizida (Sigma-Aldrich); ácido fosfórico, ácido fosfórico e metanol (Merck); ácido acético, hidróxido de sódio e ácido bórico (Synth).

Soluções estoque de ANL e HCZ foram preparadas diariamente em metanol na concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Adequadas diluições foram feitas a partir dessas soluções diretamente no eletrólito suporte. O tampão BR, que foi selecionado como eletrólito suporte, foi preparado pela mistura do ácido acético, fosfórico e bórico na concentração de 0,04 mol L⁻¹, sendo o pH ajustado por adição de hidróxido de sódio 2,0 mol L⁻¹.

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PalmSens PC gerenciado pelo programa PalmSens PC. Para os experimentos voltamétricos foi utilizada uma célula de vidro de compartimento único de 15 mL equipada com uma tampa de Teflon®, contendo orifícios para o posicionamento de três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar). Como eletrodos de referência e auxiliar foram usados Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e uma placa de platina de 0,5 cm de largura e 1 cm de comprimento, respectivamente. O eletrodo de trabalho utilizado nas medidas voltamétricas foi o EDDB (dopado com 8000 ppm de boro) com área geométrica de 0,25 cm², fabricado pelo Centre Suisse de

Electronique et de Microtechnique AS (CSEM), em Neuchâtel, Suíça. Antes dos experimentos, o EDDB foi pré-tratado anódica e catódica em uma solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, por aplicação de 0,5 A cm⁻² durante 30 s, e posterior aplicação de -0,5 A cm⁻² durante 120 s, em um potenciostato Microquímica MQPG-01. Dessa forma, a superfície do EDDB foi predominantemente terminada em hidrogênio [9].

As medidas de pH das soluções empregadas nesse trabalho foram feitas utilizando-se um pHmetro Hanna Instruments, modelo HI-221 e um eletrodo de vidro combinado com um eletrodo de referência externa de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

As curvas analíticas simultâneas foram obtidas pela adição de alíquotas das soluções padrão de ANL $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e HCZ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ a célula eletroquímica contendo 10 mL de solução tampão BR (pH 5,0). Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos após cada alíquota adicionada. O limite de detecção (LD) foi calculado a partir da relação $LD = 3SB/b$, onde SB corresponde ao desvio padrão da média aritmética de 10 brancos e b é o valor do coeficiente angular da respectiva curva analítica [13].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Investigação do comportamento voltamétrico do ANL e HCZ no EDDB

A Figura 1 apresenta o voltamograma obtido para ANL e HCZ empregando-se o EDDB pré-tratado catódica. É possível observar a presença de dois processos de oxidação bem definidos em 0,781 V (ANL) e 1,14 V (HCZ), em que não é observado algum pico de redução na varredura reversa, indicando que ambos processos são irreversíveis. A diferença entre os potenciais de oxidação de ambos anti-hipertensivos permite propor um procedimento voltamétrico para a determinação simultânea de ANL e HCZ.

Efeito do tipo de pré-tratamento do EDDB na resposta voltamétrica simultânea de ANL e HCZ

O efeito do tipo de pré-tratamento (anódico e catódico) do EDDB na resposta voltamétrica simultânea de ANL e HCZ também foi investigado. Independente do tipo de pré-tratamento, foi observado processo de oxidação para ANL e HCZ. Entretanto, o EDDB pré-tratado catódica apresentou maior

magnitude de corrente para ambos anti-hipertensivos do que aquela observada quando o eletrodo foi pré-tratado anodicamente, em uma proporção de 5,0% para ANL e de 375% para HCZ, selecionando assim, este tipo de pré-tratamento para a determinação simultânea de ANL e HCZ. Este pré-tratamento foi realizado uma vez a cada dia de trabalho, sendo

precedido de um pré-tratamento anódico de 30 s com a finalidade de garantir resultados reprodutíveis. Esse comportamento indica que o eletrodo com terminações em hidrogênio proporciona maior eletroatividade para ambos anti-hipertensivos do que o eletrodo com terminações em oxigênio, como também observado por outros autores [7,9].

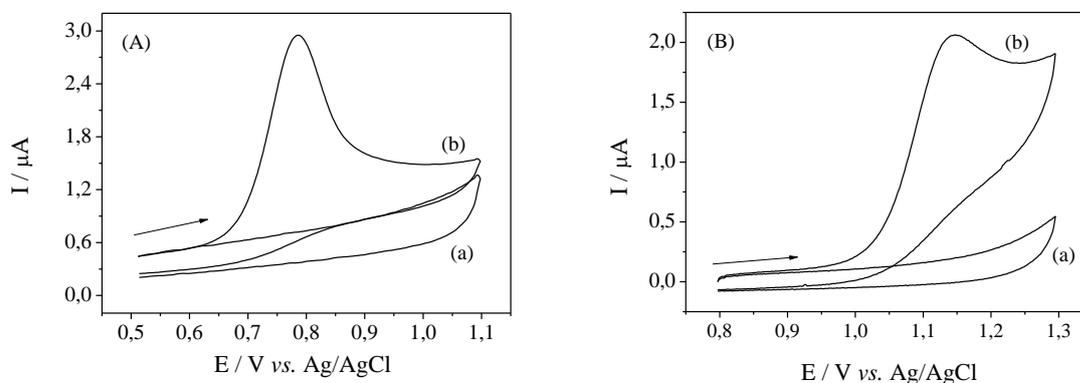


Figura 1. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR (pH 5,0) sem adição (a) e com adição (b) de ANL $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (A) e HCZ $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (B), utilizando-se o EDDB pré-tratado catódicamente a 40 mV s^{-1} .

Efeito do eletrólito suporte e velocidade de varredura

A influência do pH também foi investigado na oxidação simultânea de ANL $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e HCZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o EDDB no intervalo de 2,0 a 9,0. Os resultados indicaram que o potencial de oxidação de ANL e HCZ são influenciados pela variação do pH do meio, no qual há um deslocamento de potencial para valores menos positivos com o aumento do pH, principalmente para a HCZ. Para valores de pH superiores ou iguais a 10,0 não foram observados algum processo de oxidação para a HCZ sobre o EDDB. O maior valor de intensidade de corrente para ANL e HCZ foi obtido em valores de pH iguais a 4,0 e 2,0, respectivamente. Entretanto, foi selecionado o pH 5,0 para dar seqüência a determinação simultânea, uma vez que foi obtido melhor repetibilidade entre as medidas nesse valor de pH.

Neste mesmo valor de pH, as respostas voltamétricas de ANL e HCZ foram comparadas em diferentes eletrólitos suporte, como tampão fosfato, acetato e BR. Os resultados obtidos em solução tampão BR apresentaram maior intensidade de corrente, principalmente para HCZ, além de melhor repetibilidade. Não foi observado deslocamento de potencial nesses eletrólitos testados. A solução

tampão BR (pH 5,0) foi então selecionada para a determinação simultânea de ANL e HCZ.

O efeito da velocidade de varredura na oxidação do ANL e HCZ foi investigado no intervalo de 5 a 200 mV s^{-1} . Observa-se que a corrente de pico de ambos anti-hipertensivos aumenta e desloca para valores de potenciais mais positivos com o aumento da velocidade, indicando irreversibilidade do sistema [14]. A existência de uma linearidade entre as correntes de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura indica que na reação de oxidação de ANL e HCZ há predominância de um processo controlado por difusão. Além do mais, o gráfico do logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura apresentou comportamento linear com inclinação próxima a do previsto na literatura (0,50) para processo controlado por difusão das espécies [14].

Obtenção de curvas analíticas e aplicação do método proposto

A voltametria de onda quadrada foi utilizada para a determinação simultânea de ANL e HCZ em urina sintética. Essa técnica se mostra muito sensível, alcançando baixos limites de detecção, além de possibilitar uma análise mais rápida dos dados [15].

Assim, os parâmetros instrumentais dessa técnica foram investigados, no qual os valores foram: 10 – 80 mV para amplitude de pulso (a), 10 – 70 Hz para frequência e 1 – 4 mV para incremento de varredura (ΔE_S). Os valores selecionados foram $a = 40$ mV, $f = 30$ Hz e $\Delta E_S = 2$ mV.

Nas condições otimizadas, foram construídas curvas analíticas para a determinação simultânea de ANL e HCZ por meio de adição de alíquotas de solução padrão dos anti-hipertensivos em 10 mL de solução tampão BR (pH 5,0). A Figura 2 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para ANL e HCZ. A resposta obtida para cada curva analítica

apresentou boa linearidade e sensibilidade. As curvas analíticas para a determinação simultânea de ANL e HCZ foram obtidas na faixa de concentração de ANL $1,0 \times 10^{-7} - 2,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e de HCZ $2,0 \times 10^{-6} - 2,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. As curvas analíticas correspondentes são:

$$I_{\text{ANL}} (\mu\text{A}) = 0,055 + 1,7 \times 10^5 [c (\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,995)$$

$$I_{\text{HCZ}} (\mu\text{A}) = -0,19 + 7,2 \times 10^4 [c (\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,997)$$

Os valores de LD calculados para ANL e HCZ foram de $5,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente.

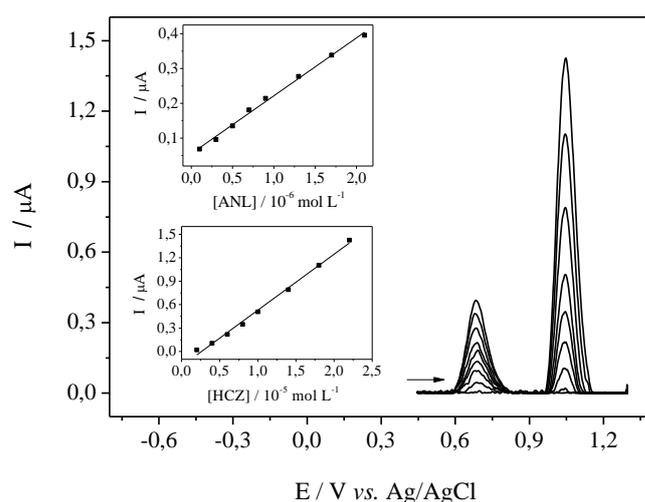


Figura 2. Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação de ANL e HCZ em um EDDB pré-tratado catodicamente em solução tampão BR (pH 5,0). Faixa linear de (2–8) $1,0 \times 10^{-7} - 2,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para ANL e (2–8) $2,0 \times 10^{-6} - 2,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para HCZ. Inserido: curvas analíticas de ANL e HCZ. Parâmetros da VOQ: $f = 30$ Hz, $a = 40$ mV, $\Delta E_S = 2$ mV.

A repetibilidade intra-dia da magnitude do pico de corrente foi obtido em medições ($n = 10$) de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de ANL e $4,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de HCZ em solução tampão BR (pH 5,0). Quando esses valores foram comparados foi possível obter um desvio padrão relativo (DPR) das medidas, de 2,0% e 1,7% para ANL e HCZ, respectivamente, mostrando a boa repetibilidade intra-dia do método proposto. A repetibilidade inter-dia da magnitude da corrente também foi feita para $n = 10$. Os resultados obtidos de DPR foram de 4,2% e 5,7% para ANL e HCZ, respectivamente, indicando que o método proposto resulta em uma adequada repetibilidade inter-dia.

O método proposto foi testado na determinação simultânea de ambos anti-hipertensivos em urina sintética, em dois valores de concentração para cada um dos analitos. A Tabela 1 apresenta os resultados

para a análise da amostra de urina sintética, em termos de porcentagem de recuperação. Este valor é a concentração da amostra determinada a partir das curvas analíticas, convertido a uma porcentagem. Foram obtidos bons resultados para a recuperação de ANL e HCZ na amostra de urina sintética utilizada, mostrando a potencialidade do uso do EDDB em conjunto com a VOQ para a detecção e determinação de ambos anti-hipertensivos em baixas concentrações. Além disso, alguns outros compostos, como dopamina, uréia, ácido úrico, cafeína e ácido ascórbico foram testados como possíveis interferentes na determinação de ambos anti-hipertensivos em amostra de urina. Verificou-se que esses compostos oxidam-se na superfície do EDDB em valores de potenciais menores que àqueles observados para o ANL. A cafeína oxida-se em valor mais positivo de potencial (maior que aquele observado para a HCZ), o

que indica que eles não interferem na determinação simultânea de ANL e HCZ. Em concentrações de ácido úrico na ordem de 100 vezes maior do que a de

ANL pode haver interferência, não sendo possível a determinação simultânea de ANL e HCZ em amostras reais.

Tabela 1. Resultados obtidos para adição e recuperação simultânea de ANL e HCZ em amostras de urina sintética.

Análito	Concentração ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado ^a	
ANL	0,12	0,11 \pm 0,01	91,7
HCZ	3,0	2,9 \pm 0,3	96,7
ANL	0,20	0,19 \pm 0,05	95,0
HCZ	4,0	3,9 \pm 0,2	97,5

^aMédia de 3 medidas.

O perfil voltamétrico de ANL e HCZ também foi obtido em uma amostra de urina humana (indivíduo saudável e não fumante) (Figura 3). Neste experimento uma alíquota de 100 μL de urina foi adicionada diretamente na célula eletroquímica contendo 10 mL de solução tampão BR (pH 5,0). Pode-se observar apenas um pico em torno de 0,5 V, que corresponde ao processo de oxidação do ácido úrico. Valores de recuperação de 91,4% e 92,0% foram obtidos respectivamente para ANL e HCZ

nessa amostra de urina humana, indicando que não houve interferência significativa da matriz da amostra, desde que não haja concentrações elevadas de ácido úrico. Švorc *et al.* [11] também realizou determinações individuais de ANL em amostras de urina humana empregando o EDDDB, demonstrando a viabilidade de se empregar este eletrodo e técnica em amostras biológicas, desde que não haja elevada concentração de ácido úrico nestes tipos de amostras, como também observado neste trabalho.

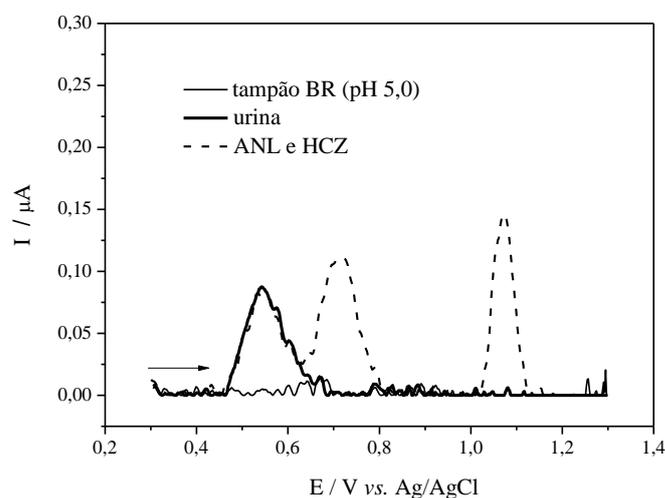


Figura 3. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a oxidação de ANL e HCZ em uma amostra de urina humana empregando um EDDDB pré-tratado catodicamente. Eletrólito suporte: tampão BR (pH 5,0). Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

4. CONCLUSÃO

Levando em consideração os resultados alcançados nesse trabalho, o EDDDB pré-tratado catodicamente em conjunto com a VOQ apresentam potencialidade para a determinação simultânea de ANL e HCZ em amostras de urina para testes de doping em atletas. O método proposto é simples e de

relativo baixo custo, sem demandar elevado tempo de análise ou de uso de reagentes que apresentam algum grau de toxicidade.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES,

Fundação Araucária do Paraná e UEL pelo apoio financeiro. Os autores também agradecem ao Prof. Luiz Henrique Dall'Antonia pela disponibilização dos potenciostatos para as medidas eletroquímicas.

6. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Hardman, J. G.; Limbird, L. E., Gilman, A. G. Goodman & Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed., McGraw-Hill: New York, **1996**.
- [2] *Prohibited List*, <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/prohibited-list>, acesso em 12/11/2014.
- [3] Sharma, M.; Kothari, C.; Sherikar, O.; Mehta, P. *J. Chromatogr. Sci.* **2013**, *51*, 1. [[CrossRef](#)]
- [4] Chaudhari, B. G. *J. Appl. Pharmac. Sci.* **2012**, *2*, 54. [[CrossRef](#)]
- [5] Mohamed, N. G. *Anal. Chem. Insights.* **2011**, *6*, 53. [[CrossRef](#)]
- [6] Valezi, C. F.; Duarte, E. H.; Mansano, G. R.; Dall'Antonia, L. H.; Tarley, C. R. T.; Sartori, E. R. *Sens. Actuators B* **2014**, *205*, 234. [[CrossRef](#)]
- [7] Eisele, A. P. P.; Mansano, G. R.; Oliveira, F. M.; Casarin, J.; Tarley, C. R. T.; Sartori, E. R. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *732*, 46. [[CrossRef](#)]
- [8] Santos, M. C. G.; Tarley, C. R. T.; Dall'Antonia, L. H.; Sartori, E. R. *Sens. Actuators B* **2013**, *188*, 263. [[CrossRef](#)]
- [9] Suffredini, H. B.; Pedrosa, V. A.; Codognoto, L.; Machado, S. A. S.; Rocha-Filho, R. C.; Avaca, L. A. *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 4021. [[CrossRef](#)]
- [10] Gandini, D.; Michaud, P.; Duo, I.; Mache, E.; Haenni, W.; Perret, A.; Conminellis, C. *Carbon. Technol.* **1999**, *9*, 303. [[CrossRef](#)]
- [11] Švore, L.; Cinková, K.; Sochr, J.; Vojs, M.; Michniak, P.; Marton, M. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *728*, 86. [[CrossRef](#)]
- [12] Laube, N.; Mohr, B.; Hesse, A. *J. Cryst. Growth* **2001**, *233*, 367. [[CrossRef](#)]
- [13] Long, G. L.; Winefordner J. D. *Anal Chem.* **1983**, *55*, 712. [[CrossRef](#)]
- [14] Gosser, D. K.; *Cyclic Voltammetry*, VCH Publishers, New York, **1994**.
- [15] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8 ed, Thomson, São Paulo, **2007**.