

## 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<sup>-1</sup> and  $2.0 \times 10^{-6} - 2.2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, with detection limits of  $5.6 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> and  $1.6 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, 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 esses, 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](mailto:elensartori@uel.br)

(-1,5 V até 2,5 V vs Ag/AgCl KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>), 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<sup>-1</sup>. 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<sup>-1</sup>, sendo o pH ajustado por adição de hidróxido de sódio 2,0 mol L<sup>-1</sup>.

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<sup>-1</sup>) 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 cm<sup>2</sup>, fabricado pelo Centre Suisse de

Electronique et de Microtechnique AS (CSEM), em Neuchâtel, Suíça. Antes dos experimentos, o EDDB foi pré-tratado anódica e catódicamente em uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>, por aplicação de 0,5 A cm<sup>-2</sup> durante 30 s, e posterior aplicação de -0,5 A cm<sup>-2</sup> 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<sup>-1</sup>).

As curvas analíticas simultâneas foram obtidas pela adição de alíquotas das soluções padrão de ANL  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e HCZ  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> 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

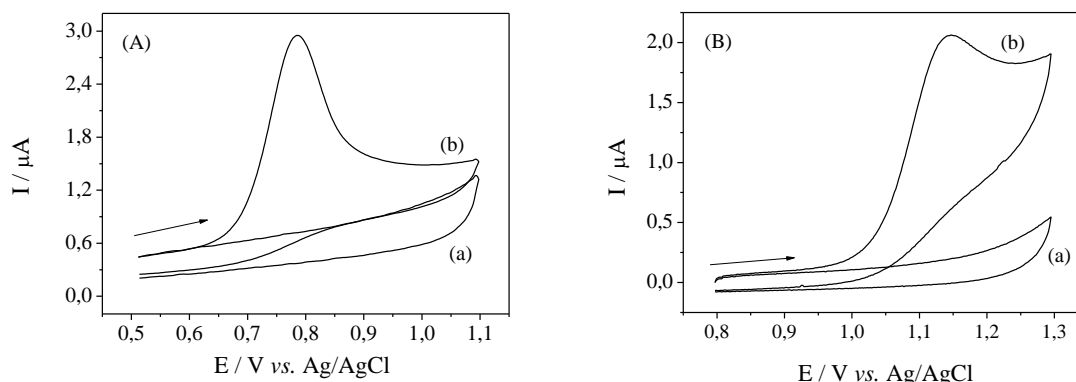
A Figura 1 apresenta o voltamograma obtido para ANL e HCZ empregando-se o EDDB pré-tratado catódicamente. É possível observar a presença de dois processos de oxidação bem definidos em 0,781 V (ANL) e 1,14 V (HCZ), em que não é observado algum pico de redução na varredura reversa, indicando que ambos 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 catódicamente 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 catodicamente a  $40 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 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  $200 \text{ mV s}^{-1}$ . 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 ( $\Delta E_S$ ). Os valores selecionados foram  $a = 40$  mV,  $f = 30$  Hz e  $\Delta E_S = 2$  mV.

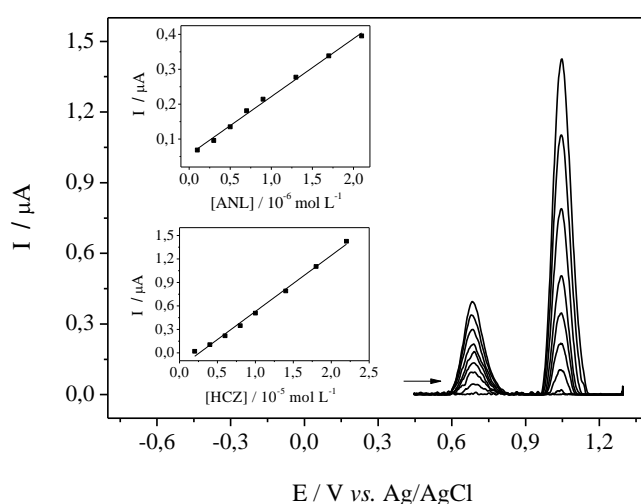
Nas condições otimizadas, foram construídas curvas analíticas para a determinação simultânea de ANL e HCZ por meio de adição de alíquotas de solução padrão dos anti-hipertensivos em 10 mL de solução tampão BR (pH 5,0). A Figura 2 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para ANL e HCZ. A resposta 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<sup>-1</sup> e de HCZ  $2,0 \times 10^{-6} - 2,2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. As curvas analíticas correspondentes são:

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

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

Os valores de LD calculados para ANL e HCZ foram de  $5,6 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> e  $1,6 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> para ANL e (2–8)  $2,0 \times 10^{-6} - 2,2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> de ANL e  $4,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> 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 percentagem de recuperação. Este valor é a concentração da amostra determinada a partir das curvas analíticas, convertido a uma percentagem. 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.

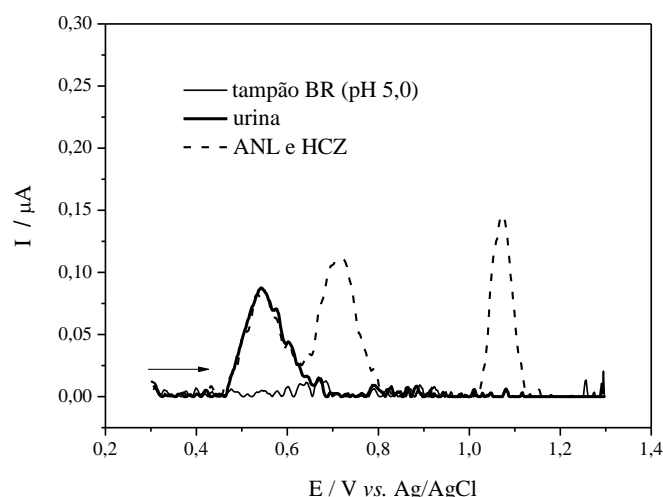
**Tabela 1.** Resultados obtidos para adição e recuperação simultânea de ANL e HCZ em amostras de urina sintética.

Análito	Concentração ( $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ )		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado <sup>a</sup>	
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

<sup>a</sup>Média 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  $\mu\text{L}$  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] Švorec, 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**.