



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
GRUPO DE ELETROQUÍMICA E CORROSÃO**

**Desenvolvimento de Metodologia Eletroanalítica para a
Determinação de Imipramina em Formulações Comerciais
Utilizando Eletrodo de Diamante Dopado com Boro**

Sâmeque do Nascimento Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Nunes Correia

Fortaleza – CE
Janeiro de 2010

Sâmeque do Nascimento Oliveira

**Desenvolvimento de Metodologia Eletroanalítica para a
Determinação de Imipramina em Formulações Comerciais
Utilizando Eletrodo de Diamante Dopado com Boro**

Dissertação de Mestrado submetida
à Comissão Julgadora do Curso de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Ceará,
como um dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Química Analítica.

Orientadora: Prof. Dra. Adriana Nunes Correia

Fortaleza – CE
Janeiro de 2010

O45d

Oliveira, Sâmeque do Nascimento

Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de Imipramina em formulações comerciais utilizando eletrodo de diamante dopado com Boro / Sâmeque do Nascimento Oliveira, 2010.

67f; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Nunes Correia

Área de concentração: Química Analítica

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Química, Fortaleza, 2010.

1. Química analítica 2. Imipramina 3. Semicondutores dopados
I. Correia, Adriana Nunes (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Química III. Título

CDD 540

Sâmeque do Nascimento Oliveira

**Desenvolvimento de Metodologia Eletroanalítica para a
Determinação de Imipramina em Formulações Comerciais
Utilizando Eletrodo de Diamante Dopado com Boro**

Esta Dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química Analítica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

Sâmeque do Nascimento Oliveira

Sâmeque do Nascimento Oliveira

Dissertação aprovada em: **27/01/2010**

Adriana Nunes Correia

**Dra. Adriana Nunes Correia
(Orientadora -UFC)**

Dr. Hugo Barbosa Suffredini

(UFABC)

Pedro de Lima Neto

**Dr. Pedro de Lima Neto
(UFC)**

Dedico a meus familiares por todo amor, carinho e incentivo.
E em memória de meu irmão Janderson.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e esperança que me tem fornecido frente aos obstáculos diários. Por ter me levantado tantas vezes, mas também por ter me deixado cair algumas vezes. Pelas perguntas respondidas, mas também pelo silêncio quando necessário. E, acima de tudo, pelo amor ágape que por mim tem tido desde antes mesmo de eu nascer.

À minha família e em especial à minha mãe e meu irmão Eleison que me ensinaram a manter-me firme nas dificuldades e a confiar em Deus, sob quaisquer circunstâncias.

À minha orientadora Profa. Dra. Adriana Nunes Correia pelo voto de confiança, por todos os momentos de compreensão e dedicação. Pelos conselhos, discussões, paciência e pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. Hugo Barbosa Suffredini por nos ter fornecimento o eletrodo de diamante dopado com boro e também pela presteza e pronta ajuda sempre que necessário.

Aos professores Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, Dr. Sandro Thomaz Gouveia e Dr. Pedro de Lima Neto pelas orientações, críticas e sugestões. Por terem contribuído para o desenvolvimento desse trabalho e principalmente pelo meu crescimento.

À Profa. Dra. Janete Eliza de Soares Lima pela colaboração e pelo fornecimento do padrão de cloridrato de imipramina.

Ao Laboratório de Química Ambiental e em especial à Profa. Dra. Helena Becker pelas medidas de UV-Vis e pelas contribuições e incentivo desde a época de graduação.

Ao amigo Tércio por sua colaboração fornecendo os artigos de difícil acesso.

À grande família GELCORR: Allan, Amanda, Andressa, Alexsander, Célia, Cristiane, Fernandes, Gerson, Gustavo, Josenir, Júnior, Leandro, Luanna, Nathalie, Othon, Naftali, Rafael, Regilany, Régis, Roger, Sanderlir, Thisiania, Vanessa e Wirley pelo companheirismo, apoio e espírito de grupo. E em especial aos amigos Othon e meu irmão

em Cristo Wirley pela ajuda, pelas parcerias e por me encorajarem sempre a seguir adiante.

Ao Prof. Dr. Walney Silva Araújo pelas orientações ainda mesmo antes do mestrado. Pela amizade e pela contribuição por meio da disciplina de Técnicas Eletroquímicas Aplicadas à Corrosão.

Ao Governo do Estado do Ceará por ter me liberado de minhas atividades de sala de aula para dedicar-me ao mestrado.

Aos professores de graduação responsáveis por minha formação inicial e em especial à Profa. Dra. Simone da Silveira Sá Borges pelo exemplo e referência de profissional e de pessoa.

“As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.

Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.

Para aqueles que se machucam.

Para aqueles que buscam e tentam sempre.

E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas... ”

Clarice Lispector

A vocês, pessoas, mestres que passam em minha vida e que aprendi a amar e admirar. A todos vocês meu muito obrigado pelas palavras e por todos os elementos de esperança a mim transmitidos e que hoje permanecem sendo ingredientes essenciais que me ajudam a enfrentar os desafios incertos do futuro. Muito obrigado!

“De tudo na vida,
ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um novo caminho...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...”

Fernando Pessoa

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de uma proposta de procedimento eletroanalítico para a determinação do antidepressivo tricíclico imipramina (IMP) em formulações farmacêuticas comerciais, utilizando eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) e voltametria de onda quadrada (VOQ). Os estudos da oxidação eletroquímica da IMP foram realizados em solução de tampão Britton-Robbinson (BR) 0,04 mol L⁻¹. Os resultados utilizando VOQ mostraram dois picos de oxidação bem definidos, com pico 1 em 0,04 V e pico 2 em 0,82 V versus Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol L⁻¹. Para o desenvolvimento dos estudos foi utilizado o pico 1 por ter se apresentado mais sensível e seletivo. O efeito dos parâmetros experimentais e voltamétricos foram avaliados e as melhores condições foram obtidas em pH 7,4, frequência de aplicação de pulsos de potencial de 100 s⁻¹, incremento de potencial de 2 mV e amplitude de 50 mV. Sob estas condições, foram construídas curvas analíticas com resposta linear na faixa de concentração de 1,73 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ a 2,53 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ ($r = 0,9984$), com um limite de detecção e de quantificação de 4,35 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ e 1,45 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, respectivamente. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação de IMP em formulações farmacêuticas comerciais e validado por comparação com método padrão de determinação de imipramina. Os resultados obtidos estiveram de acordo, em um nível de confiança de 95%, com aqueles obtidos usando o método oficial da Farmacopéia Britânica.

Palavras-chave: Imipramina, Voltametria de Onda Quadrada, Eletrodo de Diamante Dopado com Boro

ABSTRACT

This research describes the development of an electroanalytical procedure proposal for the determination of tricyclic antidepressant imipramine (IMP) in commercial pharmaceutical formulations, using Boron-Doped Diamond Electrode (BDDE) and Square-Wave Voltammetry (SWV). The electrochemical oxidation of imipramine was studied in 0.04 mol L^{-1} Britton-Robbinson buffer solution (BR). The results using VOQ showed two well-defined oxidation peaks with potentials of 0.04 V and 0.82 V versus $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^- 3 \text{ mol L}^{-1}$ for peaks 1 and 2, respectively. For the studies' development was used the peak 1 because it demonstrated to be more sensitive and selective. The effect of the experimental and voltammetric parameters were evaluated and the best performance was obtained in pH 7.4, pulses application frequency of potential of 100 s^{-1} , potential increment of 2 mV and amplitude of 50 mV. Under these conditions, the analytical curves were obtained in the linear range of concentration from $1.73 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ to $2.53 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0.9984$), with detection and quantitation limits $4.35 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $1.45 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectively. The proposed method was applied with success in the determination of IMP in commercial pharmaceutical formulations and validated by comparison with standard method for determination of imipramine. The obtained results were in close agreement, at a 95% confidence level, with those obtained using an official method of the British Pharmacopoeia.

Keywords: Imipramine, Square-Wave Voltammetry, Boron-Doped Diamond Electrode

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.**Representação ilustrativa do mecanismo de inibição da recaptação dos neurotransmissores serotonina e noradrenalina (NA) pelos antidepressivos tricíclicos (ADT), durante a sinapse.....2
- Figura 2.**Fórmulas estruturais dos neurotransmissores (A) noradrenalina (B) serotonina.....2
- Figura 3.**Fórmula estrutural do clodridrato de imipramina.....3
- Figura 4.**Fórmula estrutural da desipramina: principal metabólito da imipramina gerado pela perda de um grupo metila ligado ao nitrogênio da cadeia alifática.....3
- Figura 5.**(A) Fórmula estrutural geral para as iminobenzilas e (B) estrutura do acoplamento de dois radicais cátion gerada pela oxidação eletroquímica de duas moléculas de iminobenzila.....7
- Figura 6.**Mecanismo para a oxidação da imipramina e formação do dímero.....8
- Figura 7.**Fotografia do eletrodo de diamante dopado com boro de dopagem 8000 ppm.....11
- Figura 8.**Representação esquemática da célula eletroquímica montada constituída por três eletrodos: auxiliar, de referência e de trabalho.....12
- Figura 9.**Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se diferentes velocidades de varredura ($0,01 \text{ V s}^{-1}$ a $0,10 \text{ V s}^{-1}$), registrados em $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso de KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB. Condições experimentais: $E_{\text{inicial}} = -0,10 \text{ V}$, $E_{\text{inversão}} = 0,55 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,10 \text{ V}$17
- Figura 10.**Variação das correntes de pico anódico (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) obtidas a partir dos valores extraídos da Figura 318
- Figura 11.**Voltamogramas cíclicos para uma solução de imipramina $1,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4).Condições experimentais: $E_{\text{inicial}} = -0,40 \text{ V}$, $E_{\text{inversão}} = 1,20 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,40 \text{ V}$, $v = 0,10 \text{ V s}^{-1}$19
- Figura 12.**Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se diferentes velocidades de varredura ($0,02$ a $0,10 \text{ V s}^{-1}$) para imipramina $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), registrados no 2º ciclo de varredura. Condições experimentais: $E_{\text{inicial}} = -0,40 \text{ V}$, $E_{\text{inversão}} = 1,20 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,40 \text{ V}$21

- Figura 13.**Variação das correntes de pico anódico (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) para a oxidação do dímero ($E_{pa,1}$) e para a oxidação da imipramina ($E_{pa,2}$), obtidas a partir dos valores extraídos da Figura 12 22
- Figura 14.**Voltamogramas de onda quadrada para solução de imipramina $8,26 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 7,4), mostrando as componentes de corrente resultante, direta e reversa registradas no 2º ciclo. Condições experimentais: $f = 100$ s⁻¹, $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV 23
- Figura 15.**Voltamogramas de onda quadrada para imipramina $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, sobre EDDB, com $f = 100$ s⁻¹, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV, obtidos para diferentes valores de pH 25
- Figura 16.**Variação da corrente de pico anódico (I_{pa}) em função do pH do meio (●) para o pico de oxidação da imipramina e (■) para o pico de oxidação do dímero, obtidas a partir dos valores extraídos da Figura 15..... 26
- Figura 17.**Voltamogramas de onda quadrada para imipramina $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH 7,0 e 7,4, sobre EDDB e condições aplicadas de $f = 100$ s⁻¹, $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV 26
- Figura 18.**Voltamogramas de onda quadrada para imipramina $1,10 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em EDDB em diferentes frequências de aplicação de pulsos em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹. $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV 28
- Figura 19.**Relação entre as correntes de pico (I_{pa}) e a frequência de aplicação dos pulsos de potencial para a imipramina sobre EDDB para o pico de oxidação do dímero em (A) I_{pa} versus f e em (B) I_p versus $f^{1/2}$, obtidas a partir dos valores extraídos da Figura 18..... 29
- Figura 20.**Voltamogramas de onda quadrada para imipramina $1,10 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ sobre EDDB em diferentes amplitudes de pulso em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹. $f = 100$ s⁻¹ e $\Delta E_s = 2$ mV 30
- Figura 21.**Dependência da corrente de pico de oxidação do dímero (I_{pa}) com a variação de amplitude de pulso de potencial (a) para a imipramina, obtidas a partir dos valores retirados da Figura 20..... 31
- Figura 22.**Voltamogramas de onda quadrada para imipramina $1,10 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ sobre EDDB em diferentes incrementos de varredura de potencial em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹. $f = 100$ s⁻¹, $a = 50$ mV 32
- Figura 23.**Relação entre as correntes de pico da oxidação do dímero (I_{pa}) e o incremento de varredura de potencial (ΔE_s) para a imipramina sobre EDDB, a partir de dados retirados da Figura 22..... 33

Figura 24. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de imipramina em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 7,4) sobre EDDB; f = 100 s ⁻¹ , a = 50 mV, ΔE _s = 2 mV. (B) Curva analítica obtida a partir dos valores médios (n = 3) das correntes de pico com a concentração de imipramina, com suas respectivas barras de desvio, na faixa de linearidade encontrada.....	34
Figura 25. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidas variando-se a concentração de imipramina adicionada em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 7,4) sobre EDDB; f = 100 s ⁻¹ , a = 50 mV, ΔE _s = 2 mV. (B) Curva de recuperação em eletrólito puro para a imipramina obtida a partir dos valores médios de corrente de pico (n = 3), com suas respectivas barras de desvio padrão.	40
Figura 26. Fórmula estrutural química do pamoato de imipramina.	41
Figura 27. Curvas de recuperação obtidas a partir dos valores médios de corrente de pico para imipramina nas Formulações A e B em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ , pH 7,4, sobre EDDB, f = 100 s ⁻¹ , a = 50 mV e ΔE _s = 2 mV.	42
Figura 28. Espectros de absorção no UV-Vis para o padrão de imipramina em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 7,4) no intervalo de concentração: 5,00 x 10 ⁻⁵ a 2,50 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ . Inserção: Curva analítica para imipramina obtida a partir dos espectros de UV-Vis.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedência e pureza dos reagentes utilizados.....	13
Tabela 2. Valores de I_{pa} e E_p para o pico de oxidação do dímero e o pico da oxidação de imipramina, retirados dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 11.	27
Tabela 3. Relação entre amplitude de pulso de potenciais e os respectivos valores obtidos da largura de potencial de meia altura ($\Delta E_{p/2}$), para a imipramina sobre EDDB, com $f = 100 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	31
Tabela 4. Figuras de mérito obtidas para a metodologia eletroanalítica desenvolvida para a determinação de imipramina em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 7,4), $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	38
Tabela 5. Resultados obtidos para as curvas de recuperação para a imipramina em eletrólito de suporte (tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ , pH 7,4) sobre EDDB.	40
Tabela 6. Relação de excipientes presentes na composição química das formulações comerciais empregadas nos estudos.	42
Tabela 7. Resultados obtidos para as curvas de recuperação para a imipramina utilizando-se as Formulações A e B em eletrólito de suporte (tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ , pH 7,4) sobre EDDB.	43
Tabela 8. Figuras de mérito obtidas para a imipramina com a metodologia padrão da farmacopéia utilizando espectroscopia de absorção no UV-Vis.	45
Tabela 9. Resultados obtidos para as curvas de recuperação em UV-Vis para a imipramina em eletrólito e utilizando-se as Formulações A (cloridrato de imipramina) e B (pamoato de imipramina).	46
Tabela 10. Valores encontrados no teste F e t-pareado comparando os resultados de recuperação obtidos entre a metodologia eletroanalítica desenvolvida e a padrão recomendada pela Farmacopéia Britânica.....	47

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Os antidepressivos tricíclicos.....	1
1.1.1. A imipramina.....	3
1.2. Determinação eletroanalítica da imipramina	4
1.3. Estudos mecanísticos da oxidação eletroquímica da imipramina.....	6
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivos gerais	10
2.1.1. Objetivos específicos.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Instrumentação.....	11
3.2. Eletrodos e sistema eletroquímico	11
3.2.1. Eletrodo de trabalho	11
3.2.2. Eletrodo de referência	12
3.2.3. Eletrodo auxiliar	12
3.2.4. Célula eletroquímica	12
3.3. Reagentes e soluções utilizadas	13
3.3.1. Solução tampão Britton-Robbinson	13
3.3.2. Solução estoque do padrão de cloridrato de imipramina	13
3.3.3. Solução de ferrocianeto de potássio	14
3.3.4. Solução do comprimido da Formulação A (cloridrato de imipramina)	14
3.3.5. Solução das cápsulas da Formulação B (Pamoato de imipramina).....	14
3.4. Metodologia de trabalho	14
3.4.1. Condicionamento da superfície eletródica do EDDB	14
3.4.2. Estimativa da área eletroativa do EDDB.....	15
3.4.3. Desenvolvimento da metodologia eletroanalítica	15

3.4.4. Aplicação da metodologia desenvolvida.....	16
3.4.5. Validação por comparação com método padrão da farmacopéia.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Estimativa da área eletroativa do EDDB	17
4.2. Comportamento da imipramina por voltametria cíclica utilizando EDDB	19
4.3. Estudo de variação da velocidade de varredura em voltametria cíclica	20
4.4. Comportamento eletroquímico por voltametria de onda quadrada.....	22
4.5. Estudo da concentração hidrogeniônica do meio.....	24
4.6. Otimização dos parâmetros da VOQ	27
4.6.1. Efeito da frequência de aplicação de pulsos de potencial (f)	28
4.6.2. Efeito da amplitude de pulso de potencial (a)	30
4.6.3. Efeito do incremento de varredura de potencial (ΔE_s)	32
4.7. Construção da curva analítica e determinação da faixa de linearidade, dos limites de detecção e de quantificação, repetibilidade e reproduzibilidade	33
4.8. Testes de recuperação em eletrólito puro	38
4.9. Teste de recuperação em formulações farmacêuticas.....	41
4.10. Validação por comparação com método padrão da farmacopéia	43
5. CONCLUSÕES.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

De modo geral, as metodologias analíticas desenvolvidas para análise de fármacos tentam englobar duas metas: a primeira diz respeito ao monitoramento terapêutico em fluidos fisiológicos e a segunda, à análise de rotina em formulações farmacêuticas comerciais. O monitoramento dos antidepressivos, tanto no âmbito rotineiro das formulações farmacêuticas quanto das terapêuticas, constitui-se de extrema importância. Isto porque estes compostos, sobretudo os do grupo de antidepressivos tricíclicos, apresentam estreita faixa terapêutica (25 a 250 µg L⁻¹), riscos de toxicidade e metabólitos ativos [1].

1.1. Os antidepressivos tricíclicos

Os antidepressivos são drogas que aumentam o tônus psíquico, melhorando o humor e, consequentemente, a psicomotricidade de maneira global. Dentro desse grupo, de acordo com a literatura [2], os antidepressivos tricíclicos constituem uma classe de compostos constituída de aminas passíveis de oxidação eletroquímica, contendo, como parte aromática da molécula, um triciclo com um anel central alifático de seis ou sete membros. Estes compostos têm o efeito de elevar o ânimo, com baixo risco de provocar dependência química, apesar de apresentarem risco de overdose considerável. A amitriptilina, imipramina, nortriptilina e a desipramina são exemplos característicos desta classe de substâncias.

Os antidepressivos tricíclicos (ADT) foram os primeiros antidepressivos amplamente usados, os quais se caracterizam pela grande eficácia. Entretanto, são responsáveis por causar muitos efeitos colaterais pelo fato de afetarem substâncias químicas do cérebro não relacionadas com a depressão. Entre estes efeitos, pode-se citar a visão embaçada, boca seca, constipação, pressão arterial baixa, sonolência diurna e ganho de peso [3].

Acredita-se que o mecanismo de ação dos antidepressivos tricíclicos se dê à custa de um aumento da disponibilidade de neurotransmissores, notadamente da serotonina (5-HT) e da noradrenalina (NA), regulando seus baixos níveis causadores da depressão. O local de ação dos ADT é no sistema límbico (região do cérebro responsável pelas emoções) aumentando a NA e a 5-HT na fenda sináptica (espaço entre as extremidades de neurônios adjacentes). Este aumento da disponibilidade dos neurotransmissores é conseguido por meio de inibição da recaptação da NA e da 5-HT no neurônio pré-sináptico [4]. A Figura 1 ilustra essa ação dos ADT durante a sinapse.

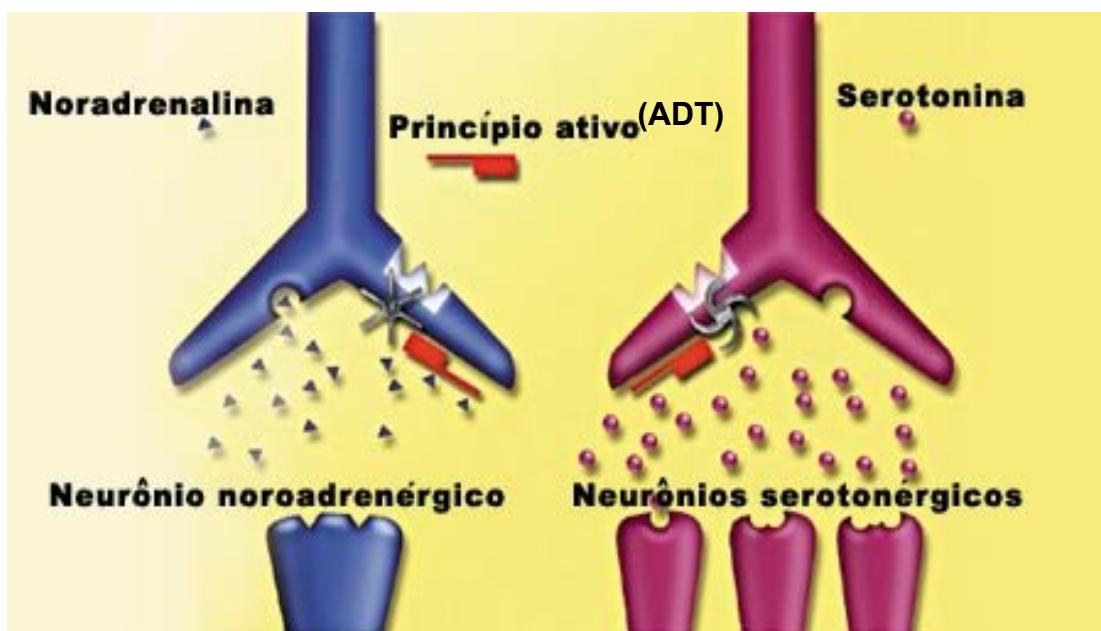


Figura 1. Representação ilustrativa do mecanismo de inibição da recaptação dos neurotransmissores serotonina e noradrenalina (NA) pelos antidepressivos tricíclicos (ADT), durante a sinapse [adaptado da ref. 5].

Existem indícios de que a habilidade dos fármacos tricíclicos atuarem como inibidores do mecanismo de recaptação neuronal está associada às suas similaridades conformativas com a NA e a 5-HT [6]. Na Figura 2 são mostradas as fórmulas estruturais para os neurotransmissores NA e 5-HT.

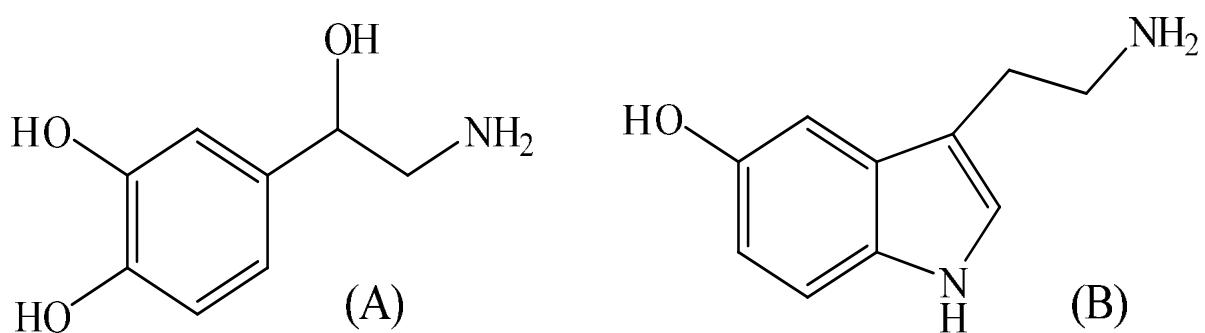


Figura 2. Fórmulas estruturais dos neurotransmissores (A) noradrenalina (B) serotonina.

1.1.1. A imipramina

A imipramina, 10,11-dihidro-N,N-dimetil-5H-dibenz[b,f]azepina-5-propanamina, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 3, foi o primeiro antidepressivo da classe dos tricíclicos utilizado no tratamento de várias formas de depressão, incluindo as endógenas, orgânicas e psicogênicas.

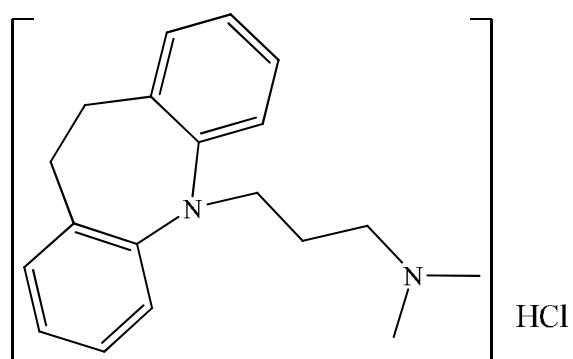


Figura 3. Fórmula estrutural do clodridrato de imipramina.

Após passar pelo fígado, a imipramina é metabolizada pela perda de um grupo metila ligado ao nitrogênio da cadeia alifática gerando a desipramina, a qual também exibe atividade antidepressiva, tornando imprescindível o monitoramento terapêutico de ambas as moléculas em fluidos biológicos [4]. A Figura 4 apresenta a fórmula estrutural para a desipramina.

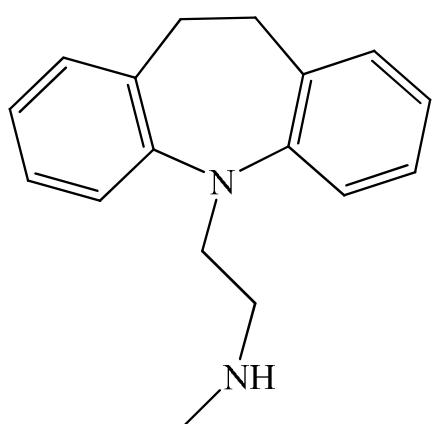


Figura 4. Fórmula estrutural da desipramina: principal metabólito da imipramina gerado pela perda de um grupo metila ligado ao nitrogênio da cadeia alifática.

1.2. Determinação eletroanalítica da imipramina

O monitoramento terapêutico e a análise em formulações farmacêuticas dos antidepressivos tricíclicos têm sido realizados aplicando-se as mais variadas técnicas analíticas, dentre elas a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta [7], eletroquímica [8] e por fluorescência [9]; cromatografia gasosa [10] e radio-imuno-ensaio [11]. No entanto, as técnicas eletroanalíticas têm ocupado um lugar de destaque em razão de várias vantagens, dentre as quais cita-se a sensibilidade, rapidez e seletividade alcançadas por meio, principalmente, das técnicas de pulso. Isto resulta, em alguns casos, na obtenção de limites de detecção tão baixos quanto os alcançados pelas técnicas cromatográficas. Além disso, deve-se enfatizar a possibilidade de se trabalhar em diversas matrizes sem a necessidade de se efetuar um pré-tratamento da amostra.

Biryol e colaboradores [12] utilizaram a técnica de voltametria cíclica com eletrodo de pasta de carbono modificado com poli(*n*-vinilimidazol) para a determinação de imipramina em formulações comerciais de Tofranil®. A estabilidade e a reprodutibilidade do eletrodo foram averiguadas em solução de ácido sulfúrico 0,10 mol L⁻¹ por meio de sucessivos ciclos de potencial. Os resultados obtidos foram satisfatórios, porém, quando o mesmo teste foi realizado em uma solução do antidepressivo, observou-se um decréscimo gradual da corrente devido à adsorção de moléculas do composto na superfície do eletrodo. Posteriormente, o perfil voltamétrico da imipramina foi comparado com eletrodo de pasta de carbono não contendo o modificador. A sensibilidade analítica, bem como o perfil voltamétrico, foram superiores quando o modificador foi adicionado à pasta de carbono. A metodologia analítica desenvolvida foi utilizada para a determinação de imipramina em formulações farmacêuticas disponíveis comercialmente, nas quais as recuperações ficaram em torno de 100,7%.

A detecção de imipramina também foi realizada utilizando eletrodos de carbono *screen-printed* modificados com filmes de polímeros de β-ciclodextrina (β-CDP) ou β-ciclodextrina carboximetilado (β-CDPA) em conjunto com a técnica de voltametria de pulso diferencial [13]. Uma série de experimentos, que incluiu a seleção do pH, do tempo e do potencial de pré-concentração, foi realizada para a otimização nas condições experimentais. Os voltamogramas foram registrados em tampão fosfato 7,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ (pH 7,4) com uma etapa de pré-concentração do analito na superfície do eletrodo de 120 segundos no potencial de - 0,15 V. Os resultados indicaram que a sensibilidade analítica para o eletrodo modificado com β-CDPA é maior que para o eletrodo de β-CDP, que, por sua vez, é ainda maior que para o eletrodo de carbono sem modificação. Uma explicação plausível para as diferentes

sensibilidades alcançadas seria a de que nos filmes de β -CDP estão disponíveis somente sítios inclusos de β -CD, ao passo que, nos filmes de β -CDPA, sítios de inclusão bem como de troca de íons no pH estudado estão presentes. A existência de sítios de troca de íons se deve aos grupos carboxílicos estarem dissociados e os analitos estarem protonados no pH estudado. Os limites de detecção calculados para a imipramina, utilizando os eletrodos de β -CDP e β -CDPA foram iguais a $5,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ ($158,4 \mu\text{g L}^{-1}$) e $1,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ ($31,7 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente.

O eletrodo de diamante dopado com boro foi utilizado para a detecção de antidepressivos tricíclicos, dentre eles a imipramina, em amostras de plasma sanguíneo [14]. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato $0,10$ mol L⁻¹ (pH 6,9) com eletrodo de diamante e também com eletrodo de carbono vítreo. O perfil voltamétrico da imipramina foi avaliado para os dois eletrodos, salientando que, com o eletrodo de diamante dopado com boro, obteve-se uma maior definição do pico de oxidação da imipramina, bem como do dímero formado em uma etapa química subsequente à transferência eletrônica. No estudo da variação do pH, no intervalo de 2 a 11, constatou-se que os potenciais de pico se deslocaram para valores menos positivos com o aumento do pH. O coeficiente angular do gráfico de potencial de pico em função do pH é igual a 28 mV/pH, o que está de acordo com um mecanismo envolvendo a participação de dois elétrons e um próton. Com alguns parâmetros electroquímicos conhecidos, o mecanismo de oxidação da imipramina foi proposto, devendo mencionar que, de acordo com os autores, o nitrogênio do anel seria o provável sítio de oxidação. Esta suposição foi extraída apenas dos estudos da metiliminobenzila e de alguns compostos relacionados [15] que apresentam estrutura similar à imipramina, ou seja, nenhuma nova evidência foi abordada pelos autores para confirmar o sítio de oxidação e também o acoplamento oxidativo para a formação do dímero. Em paralelo, foi realizada a detecção em fluxo da imipramina e de outros antidepressivos tricíclicos em amostras de sangue. O limite de detecção calculado foi de $3,00 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ ($0,95 \mu\text{g L}^{-1}$) e a quantidade recuperada de imipramina foi igual a 90,9%, para medidas realizadas em triplicata ($n = 3$).

Ghoroghchian e colaboradores [16] empregaram microeletrodos de fibra de carbono para a detecção de imipramina em urina e soro. O valor do limite de detecção calculado foi de $1,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ ($31,7 \mu\text{g L}^{-1}$). Uma das características inerentes à utilização de microeletrodos é a alta eficiência no transporte de massa, que torna possível a análise de antidepressivos tricíclicos em baixas concentrações sem a necessidade de se efetuar uma etapa de pré-concentração do analito na superfície do eletrodo.

Toledo e colaboradores [17] desenvolveram uma metodologia eletroanalítica para determinação de imipramina, utilizando eletrodo de grafite-poliuretano (GPU) em meio de tampão Britton-Robbinson (BR) 0,10 mol L⁻¹ (pH 7,0), empregando voltametria de onda quadrada, obtendo limite de detecção e de quantificação de $4,60 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ ($1,45 \mu\text{g L}^{-1}$) e $3,04 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ ($96,34 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. A metodologia foi testada em formulação comercial de Tofranil® e foram obtidas recuperações por métodos eletroquímicos ($97,60 \pm 0,90\%$) e espectrométricos ($87,10 \pm 0,90\%$). Ainda, no mesmo trabalho, propuseram um mecanismo de oxidação para a imipramina baseando-se em estudos eletroquímicos, químico- quânticos e de espectro de massa.

Norouzi e colaboradores [18] desenvolveram um método para a determinação de imipramina em formulações farmacêuticas e amostras biológicas, utilizando sistemas de injeção em fluxo. Introduziram um método de cálculo numérico computacional, baseado na determinação do sinal do analito e redução de ruídos. A resposta de eletrodo foi calculada baseando-se em trocas de carga parcial e total na superfície eletródica, após subtrair a corrente de fundo. Os pulsos de potenciais foram aplicados em um microeletrodo de disco de ouro com um raio de 12,5 μm. As melhores condições encontradas foram pH 2,0, taxa de varredura de 60 V s⁻¹, potencial de acumulação de 100 mV e o tempo de acumulação de 0,5 s. O método apresentou faixa de linearidade de concentração entre $4,44 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $7,10 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ ($r = 0,999$) com limites de detecção e de quantificação de $1,44 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ ($4,55 \text{ ng L}^{-1}$) e $4,44 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (14 ng L^{-1}), respectivamente.

1.3. Estudos mecanísticos da oxidação eletroquímica da imipramina

Alguns estudos reportados na literatura têm mencionado o mecanismo de oxidação da molécula de imipramina. Frank e colaboradores realizaram estudos para a reação de oxidação de iminobibenzila e de compostos relacionados, dentre eles a imipramina, por meio do acoplamento oxidativo de aminas aromáticas para formar uma variedade de derivados dimerizados [12]. Baseado nesses estudos, os autores propuseram que na primeira etapa da reação, ocorre a formação de um radical cátion com a perda de um elétron. Em uma etapa química posterior, de cinética muito rápida, há o acoplamento de dois radicais cátion com a perda de um próton por molécula de radical. Na Figura 5 está representada a fórmula estrutural geral para as iminobibenzilas e a estrutura apresentada pelos autores para o acoplamento dos radicais.

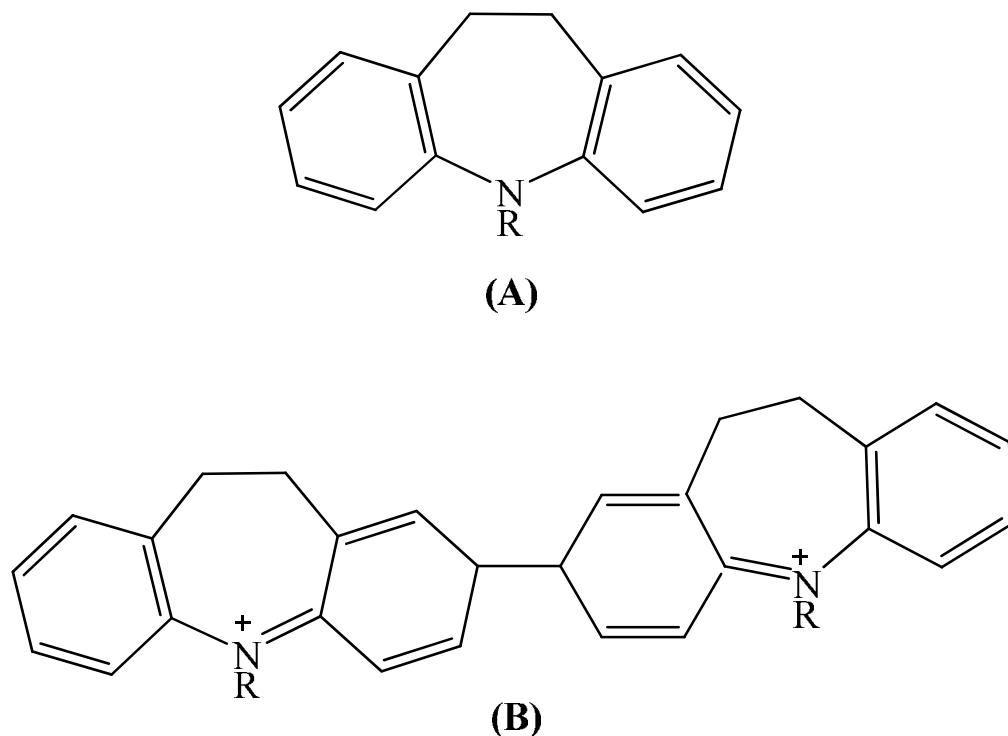


Figura 5. (A) Fórmula estrutural geral para as iminobibenzilas e (B) estrutura do acoplamento de dois radicais cátion gerada pela oxidação eletroquímica de duas moléculas de iminobibenzila [12].

Nenhuma evidência foi obtida para a redução do radical cátion durante a escala de tempo das medidas voltamétricas, levando-se a concluir que a velocidade da reação de acoplamento é rápida. Experimentos de eletrólise a potencial controlado ($E = 0,90\text{ V}$) indicaram que mais de dois elétrons são necessários para a oxidação completa da molécula de imipramina. Especulações a respeito do mecanismo não foram abordadas, porém foi sugerido que a imipramina tem um comportamento similar ao dos outros compostos estudados [12].

Em trabalho posterior realizado por Bishop e Hussein [19] utilizando os antidepressivos tricíclicos, dentre eles a imipramina, em meio de ácido sulfúrico $0,10\text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo de ouro [19], consideraram um provável mecanismo da reação de oxidação da imipramina levando-se em consideração seus resultados experimentais e também os resultados já obtidos no trabalho de Frank e colaboradores [15]. Segundo os autores, o fragmento ciclohepteno não é passível de oxidação; no entanto, a introdução de um heteroátomo (enxofre ou nitrogênio), que seja capaz de fornecer um elétron para a formação de um radical, confere eletroatividade ao antidepressivo. Assim, o provável mecanismo de

oxidação da imipramina ocorre, numa primeira etapa, após a saída de um elétron do nitrogênio do anel. Há a formação de um radical que reage com uma molécula de imipramina da solução, gerando o dímero. A reação de dimerização ocorre com a perda de dois prótons, mas que não se sabe se a perda ocorre antes ou após o acoplamento. O dímero é mais facilmente oxidado que o monômero de imipramina, sendo que o produto dicáton resulta da perda de dois elétrons por molécula de dímero.

Mais recentemente, baseando-se em informações já encontradas na literatura, Toledo e colaboradores [17] desenvolveram um trabalho para elucidar alguns aspectos da oxidação da imipramina usando estudos eletroquímicos, químico quânticos e de espectrometria de massa, a partir dos quais propuseram um mecanismo. Segundo os autores, a oxidação de uma molécula de imipramina se dá pela perda de dois elétrons oriundos do nitrogênio do anel e um próton, formando um radical dicáton. Em seguida, há a deslocalização de carga positiva pelo anel aromático. Posteriormente, ocorre um acoplamento entre o cátion e uma molécula em solução formando uma espécie que, por sua vez, pode perder um próton e gerar outra espécie. Esta outra espécie, pelos cálculos químico-quânticos, apresenta uma entalpia de formação menor, de modo que o equilíbrio é deslocado para a sua formação, que é energeticamente mais favorável. A Figura 6 apresenta as estruturas envolvidas no mecanismo proposto para a formação do dímero.

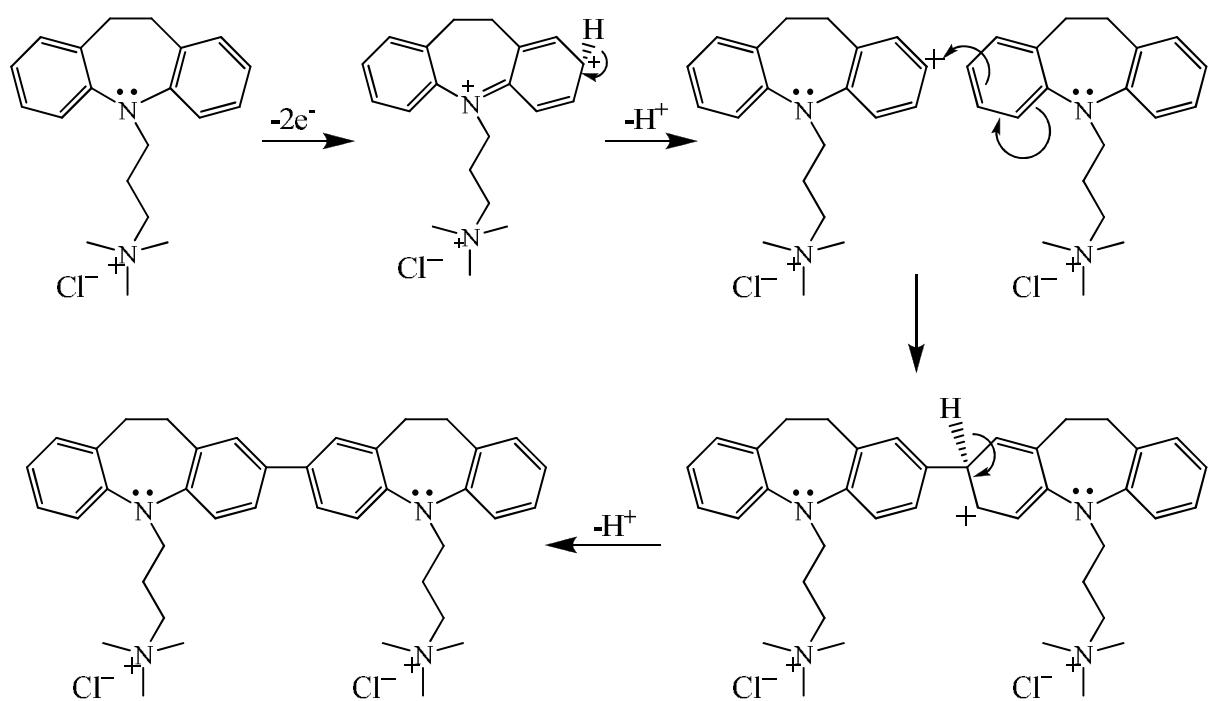


Figura 6. Mecanismo para a oxidação da imipramina e formação do dímero [17].

Em concordância com as outras propostas de mecanismos, a molécula do dímero pode ser ionizada nos dois átomos de nitrogênio do anel em mais uma etapa eletroquímica. Dessa forma, esse mecanismo proposto é descrito pelo tipo ECE (Eletroquímico / Químico / Eletroquímico), ou seja, após a oxidação da imipramina ocorre a formação do dímero pelo acoplamento de uma reação química e, então, a molécula resultante é facilmente reduzida em uma varredura reversa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho consiste em desenvolver uma metodologia eletroanalítica para a determinação de imipramina em formulações comerciais, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada e empregando eletrodo de diamante dopado com boro.

2.1.1. Objetivos específicos

Com os objetivos específicos, pretende-se:

- Estudar o comportamento eletroquímico da imipramina sobre o eletrodo de diamante dopado com boro, investigando sua eletroatividade e características;
- Otimizar os parâmetros que proporcionam melhor resposta eletroquímica e perfil voltamétrico como: meio eletrolítico, concentração hidrogeniônica do meio, frequência de aplicação de pulsos, amplitude dos potenciais aplicados e incremento de potenciais;
- Determinar os parâmetros de desempenho da metodologia (faixa de linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, seletividade e exatidão);
- Aplicar a metodologia desenvolvida em formulações comerciais, validando-a pela comparação com outra técnica empregada na detecção e quantificação da imipramina e recomendada pela farmacopéia britânica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Instrumentação

As medidas voltamétricas foram registradas utilizando potencioscópio/galvanostato AUTOLAB modelo PGSTAT 30 (Eco Chemie) acoplado a um microcomputador e gerenciado pelo software GPES versão 4.9.006. Todas as pesagens foram realizadas em uma balança analítica Kern®, modelo 410 com precisão de $\pm 0,1$ mg. A água usada na preparação das soluções e na lavagem das vidrarias foi purificada por tratamento em um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Inc.), apresentando resistividade 18,2 MΩ cm. As medidas de pH das soluções foram feitas utilizando-se um pHmetro Micronal® modelo B474.

As medidas espectrofotométricas na região do UV-Visível foram realizadas num Espectrofotômetro de feixe duplo modelo Cary 1E (Varian) com células de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

3.2. Eletrodos e sistema eletroquímico

3.2.1. Eletrodo de trabalho

O eletrodo de trabalho utilizado nos estudos voltamétricos foi o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB), fabricado pelo *Centre Suisse d'Electronique et d'Microtechnique*, Neuchâtel, Suíça, com teor de boro de 8000 ppm, com área geométrica estimada de $0,26\text{ cm}^2$. A Figura 7 apresenta uma fotografia do EDDB utilizado nas medidas desse trabalho.

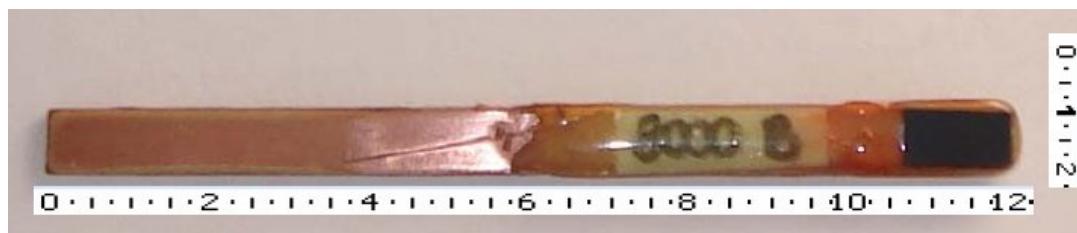


Figura 7. Fotografia do eletrodo de diamante dopado com boro de dopagem 8000 ppm.

No preparo do eletrodo, o DDB foi colado sobre uma placa de cobre usando cola de prata e, posteriormente, o eletrodo foi coberto por uma resina Araldite® (inerte), com o intuito de isolar o filme, permitindo, assim, que apenas a superfície do EDDB ficasse exposta.

3.2.2. Eletrodo de referência

O sistema de referência utilizado foi o eletrodo de Ag/AgCl/Cl⁻. A montagem se fez com fio de prata recoberto com cloreto de prata por eletrólise (anodização), utilizando-se solução saturada de cloreto de potássio. Após a eletrólise, o fio de prata anodizado foi mantido em tudo de vidro com solução de KCl 3,0 mol L⁻¹.

3.2.3. Eletrodo auxiliar

Utilizou-se como eletrodo auxiliar, um fio de platina espiralado embutido em vidro temperado e fixado com resina epóxi para evitar infiltrações.

3.2.4. Célula eletroquímica

As medidas voltamétricas foram realizadas em uma célula de vidro de compartimento único, como pode ser visto na Figura 8. A célula tem capacidade de 25 mL e é equipada com uma tampa em Teflon®, contendo orifícios para a desoxigenação da amostra com nitrogênio, entrada para injeção de amostra e posicionamento dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar.

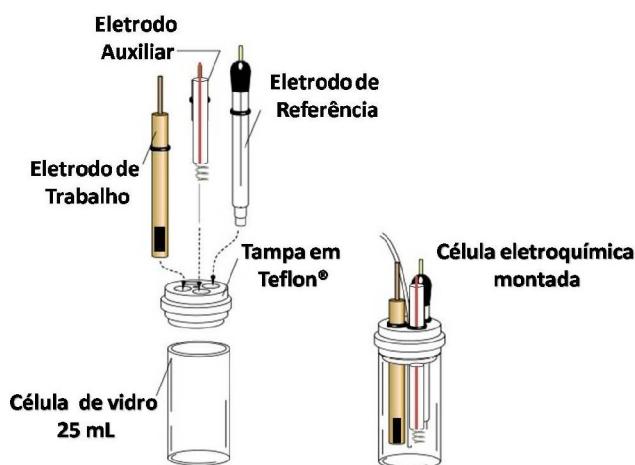


Figura 8. Representação esquemática da célula eletroquímica montada constituída por três eletrodos: auxiliar, de referência e de trabalho.

3.3. Reagentes e soluções utilizadas

Todas as soluções de trabalho utilizadas foram preparadas em água purificada Milli-Q. A Tabela 1 apresenta os reagentes utilizados neste trabalho com as suas respectivas procedências e purezas.

Tabela 1. Procedência e pureza dos reagentes utilizados.

Reagente	Fórmula química	Procedência	Pureza
Ácido acético	CH ₃ COOH	VETEC®	99,7%
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	VETEC®	85%
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	VETEC®	99,5%
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	VETEC®	99,8%
Hidróxido de sódio	NaOH	VETEC®	97%
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	VETEC®	95%
Cloreto de Potássio	KCl	VETEC®	99%
Ferrocianeto de potássio	K ₂ [Fe(CN) ₆]	VETEC®	98,5%
Gás nitrogênio	N ₂	White Martins	99,98%

3.3.1. Solução tampão Britton-Robbinson

O tampão Britton-Robbinson (BR) foi preparado pela mistura de volumes adequados de soluções estoques dos ácidos bórico, acético e fosfórico todos com concentração de 0,04 mol L⁻¹ [20]. O ajuste de pH foi realizado com solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹.

3.3.2. Solução estoque do padrão de cloridrato de imipramina

Cloridrato de imipramina, de procedência USP (*United States Pharmacopeia*), foi utilizado na preparação da solução estoque na concentração de 1,04 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em meio aquoso, sendo estocada, em seguida, sob refrigeração a cerca de 4 °C.

3.3.3. Solução de ferrocianeto de potássio

Preparou-se uma solução de ferrocianeto de potássio $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ a partir da dissolução de K₄Fe(CN)₆ em 100 mL de água purificada, contendo KCl 0,10 mol L⁻¹ como eletrólito de suporte. A solução obtida foi utilizada para o registro dos voltamogramas cíclicos necessários à determinação voltamétrica da área efetiva do EDDB.

3.3.4. Solução do comprimido da Formulação A (cloridrato de imipramina)

Foram pesadas cinco amostras comerciais de comprimidos da Formulação A contendo 25 mg do analito por comprimido e foi calculada a massa média do comprimido, obtendo-se o valor de $0,0864 \pm 0,0071$ g, com intervalo de confiança de 95%. Em seguida, este conteúdo foi triturado em almofariz com pistilo de porcelana até obtenção de pó fino e homogêneo. A solução estoque foi preparada por meio da dissolução em água, em quantidade apropriada do medicamento para se obter uma solução de concentração $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

3.3.5. Solução das cápsulas da Formulação B (Pamoato de imipramina)

Foram pesadas cinco amostras comerciais de cápsulas da Formulação B, contendo cada uma 75 mg do analito e calculada a massa média do conteúdo das cápsulas, obtendo-se o valor de $0,1835 \pm 0,0081$ g, com intervalo de confiança de 95%. Em seguida, este conteúdo foi triturado em almofariz com pistilo de porcelana até obtenção de pó fino e homogêneo. A solução estoque foi preparada por meio da dissolução em etanol, em quantidade apropriada do medicamento para se obter uma solução de concentração $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

3.4. Metodologia de trabalho

3.4.1. Condicionamento da superfície eletródica do EDDB

Para a realização dos experimentos, o EDDB foi submetido a um pré-tratamento de condicionamento e limpeza, antes das medidas. Esse pré-tratamento consistiu de duas etapas: (a) o EDDB foi polarizado anodicamente em meio de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ em potencial de

+3,0 V, durante 15 s, para evolução de oxigênio; (b) o EDDB foi polarizado catodicamente em solução renovada de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ a um potencial de -3,0 V, durante 30 s [21,22]. Uma mudança química na superfície do EDDB após o tratamento, consistente com a sua hidrogenação, é proposta como a razão de sua reatividade [21].

3.4.2. Estimativa da área eletroativa do EDDB

A estimativa da área eletroativa do EDDB foi realizada utilizando-se uma solução contendo K₄[Fe(CN)₆] 1,10 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em meio aquoso de KCl 0,10 mol L⁻¹. Para isso, foram adicionados 12 mL de solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ à célula eletroquímica e, em seguida, borbulhou-se N₂ por cinco minutos. Logo em seguida, após a retirada de eventuais bolhas formadas sobre a superfície do EDDB, registrou-se o voltamograma cíclico referente ao “branco” das medidas.

Após o registro do “branco”, repetiu-se o procedimento anterior em outra célula eletroquímica contendo ferrocianeto de potássio 1,10 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em meio aquoso de KCl 0,1 mol L⁻¹. Em seguida, registrou-se os voltamogramas cíclicos na faixa de intervalo de velocidades de varredura (*v*) compreendida entre 0,01 V s⁻¹ e 0,10 V s⁻¹, utilizando-se os seguintes parâmetros operacionais de potencial: E_{inicial} = E_{final} = -0,10 V e E_{inversão} = 0,55 V. Antes de cada medida, a solução era submetida à agitação magnética por 10 segundos.

3.4.3. Desenvolvimento da metodologia eletroanalítica

Inicialmente, foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica (VC) e voltametria de onda quadrada (VOQ) para estudos preliminares, a fim de caracterizar o comportamento eletroquímico da imipramina sobre EDDB.

Pelos voltamogramas cíclicos, verificou-se o grau de reversibilidade das reações, assim como a natureza do transporte da espécie eletroativa para a superfície do eletrodo. Para tanto, foram realizados estudos variando número de ciclos e velocidade de varredura.

Em seguida, realizou-se estudos para a otimização dos parâmetros que possam influenciar na resposta voltamétrica. Para isto, foi realizado um estudo da influência do pH do meio e dos parâmetros da VOQ, como frequência de aplicação de pulsos de potencial (*f*), amplitude de aplicação de pulsos de potencial (*a*) e incremento de varredura de potencial

(ΔE_s), buscando, desta forma, obter o melhor perfil voltamétrico (seletividade) e maior sinal analítico (sensibilidade).

Estabelecidas as melhores condições para a determinação da imipramina, a curva analítica foi construída por meio de adições sucessivas da solução padrão, onde foi possível observar a faixa de linearidade da corrente de pico (I_p) com a concentração de imipramina, o coeficiente de correlação (r), o desvio padrão relativo do branco (S_b), a inclinação da curva analítica (b) e os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).

3.4.4. Aplicação da metodologia desenvolvida

Em seguida, aplicou-se a metodologia desenvolvida na recuperação em eletrólito e em formulações comerciais, obtendo-se os percentuais de recuperação. A precisão das metodologias desenvolvidas foi avaliada por meio da repetibilidade e da reproduzibilidade e estimada por meio do desvio padrão relativo, enquanto a exatidão foi avaliada pelos percentuais de recuperação obtidas para eletrólito puro e em formulações farmacêuticas comerciais.

3.4.5. Validação por comparação com método padrão da farmacopéia

A espectrofotometria UV-Vis foi utilizada para validar a metodologia proposta, por se tratar de uma técnica analítica padrão para quantificação de cloridrato de imipramina, segundo a Farmacopéia Britânica [23].

Para tanto, se construiu curvas analíticas para o cloridrato de imipramina utilizando-se medidas espectrofotométricas na região do ultravioleta ($\lambda = 291$ nm), nas mesmas condições propostas para a metodologia eletroanalítica.

Posteriormente, foram feitas medidas em triplicata para teste de recuperação do padrão no eletrólito e em solução amostra da formulação comercial de cloridrato de imipramina. Assim como na VOQ, se realizou 10 leituras espectrofotométricas para a amostra contendo apenas o tampão BR (“branco”) para a determinação dos limites de detecção e de quantificação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estimativa da área eletroativa do EDDB

Como o EDDB poderia ter uma vida útil limitada, devido, entre outros fatores, à ação da solução eletrolítica que ataca a resina isolante do eletrodo, provocando assim problemas como infiltração da solução e, consequentemente, a necessidade de montar novamente o eletrodo, tomou-se a precaução de estimar a área eletroativa do EDDB antes das medidas. Para isso, calculou-se esta área via medidas eletroquímicas por meio do processo redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, utilizando a técnica de voltametria cíclica.

Na Figura 9 estão apresentados os voltamogramas cílicos obtidos para $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \ 1,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso de $\text{KCl} \ 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB utilizando-se diferentes velocidades de varredura ($0,01 \text{ V s}^{-1}$ a $0,10 \text{ V s}^{-1}$).

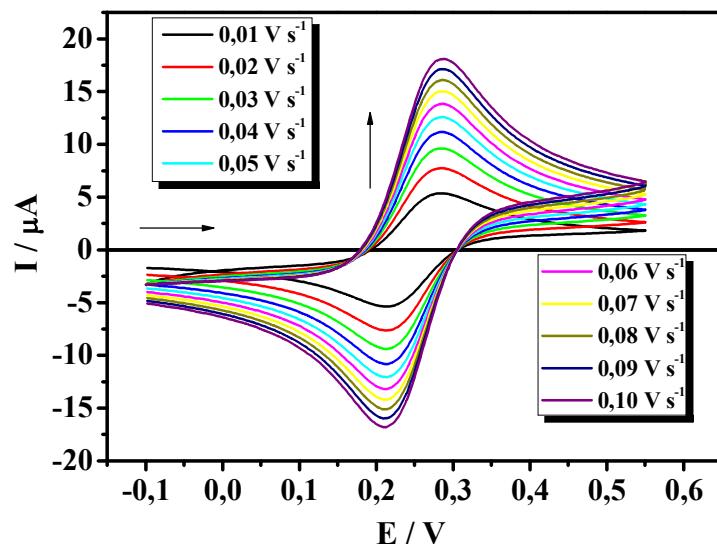


Figura 9. Voltamogramas cílicos obtidos utilizando-se diferentes velocidades de varredura ($0,01 \text{ V s}^{-1}$ a $0,10 \text{ V s}^{-1}$), registrados em $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \ 1,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso de $\text{KCl} \ 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB. Condições experimentais: $E_{\text{inicial}} = -0,10 \text{ V}$, $E_{\text{inversão}} = 0,55 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,10 \text{ V}$.

A partir dos voltamogramas cílicos obtidos, tomou-se os valores correspondentes às correntes de pico anódico (I_{pa}) grafando-os com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) e obtendo-se uma relação linear entre essas duas variáveis. Na Figura 10 é

apresentada a correlação linear entre as correntes de pico anódico (I_{pa}) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), obtidas a partir dos valores extraídos da Figura 9.

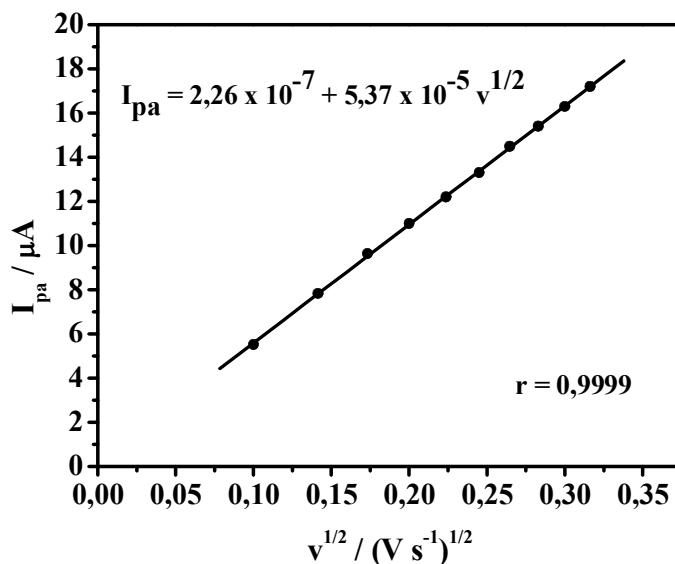


Figura 10. Variação das correntes de pico anódico (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) obtidas a partir dos valores extraídos da Figura 3.

De acordo com a teoria desenvolvida para a voltametria cíclica, a relação linear obtida entre as correntes de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura, caracteriza um processo controlado por difusão da espécie eletroativa até a superfície do eletrodo de trabalho [24]. Para este tipo de processo, a equação de Randles-Ševcik (equação 1) prediz que a relação linear entre I_p e $v^{1/2}$ é dada por:

$$I_{pa} = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} D_0^{1/2} A C v^{1/2} \quad (\text{equação 1})$$

onde n é o número de elétrons transferidos; v é a velocidade de varredura ($V s^{-1}$); D_0 é o coeficiente de difusão da espécie ($cm^2 s^{-1}$); A é a área do eletrodo (cm^2) e C é a concentração da espécie química ($mol cm^{-3}$).

Dessa forma, tomando-se o coeficiente angular do gráfico de I_p versus $v^{1/2}$, pode-se calcular a área ativa do eletrodo, utilizando-se o sistema reversível $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ que, de acordo com a literatura [25], envolve o número de elétrons, n , igual a 1 e o coeficiente de difusão da espécie eletroativa D_0 é igual a $6,50 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Assim sendo, pela Figura 6 obteve-se o valor do coeficiente angular como sendo igual a $5,37 \times 10^{-5} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$, de onde foi estimada a área eletroativa do EDDB como sendo $0,71 \text{ cm}^2$.

4.2. Comportamento da imipramina por voltametria cíclica utilizando EDDB

No desenvolvimento da metodologia para a determinação de imipramina fez-se necessário, em uma primeira etapa, avaliar o seu comportamento eletroquímico sobre EDDB, a fim de se observar a presença de processos de redução e/ou oxidação da imipramina. Dessa forma, inicialmente, utilizou-se a técnica de voltametria cíclica, por ser a mais utilizada tanto nos estudos de eletroatividade de compostos quanto para diagnóstico de mecanismos de reações eletroquímicas [26]. Os estudos iniciais foram realizados por meio de varreduras de potenciais nos sentidos positivo e negativo, por meio de sucessivos ciclos e diferentes velocidades de varredura.

A Figura 11 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para o 1º e 10º ciclo, no intervalo de potencial de -0,4 V a 1,2 V, utilizando-se velocidade de varredura (v) $0,10 \text{ V s}^{-1}$, em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,4. A escolha do tampão BR como meio para os estudos iniciais se deve ao fato deste meio já ter sido reportado na literatura em outros estudos eletroanalíticos da imipramina [17].

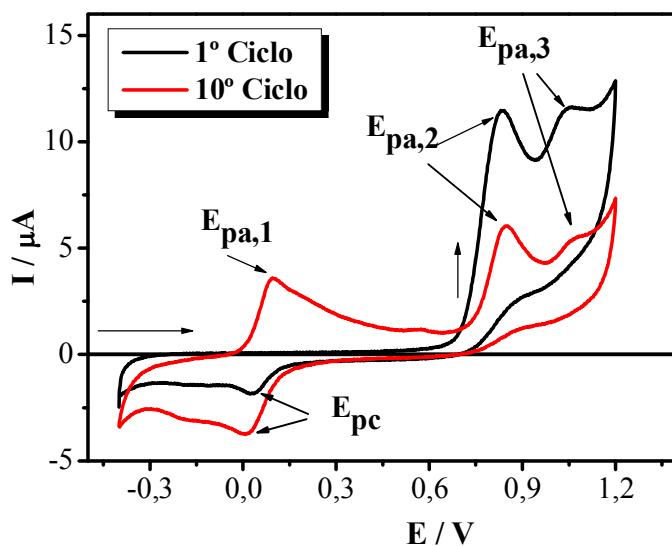


Figura 11. Voltamogramas cíclicos para uma solução de imipramina $1,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4). Condições experimentais: $E_{\text{inicial}} = -0,40 \text{ V}$, $E_{\text{inversão}} = 1,20 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,40 \text{ V}$, $v = 0,10 \text{ V s}^{-1}$.

Os resultados experimentais obtidos no primeiro ciclo mostraram na região de potenciais entre 0,60 V e 1,2 V, a presença de dois processos anódicos, $E_{pa,2}$ e $E_{pa,3}$, em 0,86 V e 1,00 V, respectivamente. Enquanto na varredura reversa de potencial, observa-se um processo de redução (E_{pc}) em -0,03 V, o qual apresenta processo correspondente no sentido inverso ($E_{pa,1}$), sentido da oxidação, nos ciclos seguintes, em potencial próximo de 0,21 V. É observado ainda que o processo $E_{pa,1}$ aumenta em intensidade com o número de ciclos realizados, enquanto que ocorre decaimento de corrente no processo $E_{pa,2}$.

O processo em $E_{pa,2}$ é atribuído à oxidação irreversível da imipramina [14] enquanto que em E_{pc} estaria associado à redução do dímero que é formado numa etapa química posterior à etapa de oxidação eletroquímica da imipramina [14, 19], o qual é oxidado nas varreduras subsequentes, originando o processo $E_{pa,1}$. Já o processo em $E_{pa,3}$ pode estar relacionado a uma adsorção forte do reagente [27] ou ainda, numa outra possibilidade, conforme citado por BISHOP [19], atribuída à oxidação de moléculas de imipramina que tenham sido regeneradas à sua forma não oxidada devido o acoplamento de uma etapa química envolvendo o dímero formado e moléculas de imipramina já oxidadas eletroquimicamente.

Além desses processos, verifica-se a presença de ombros próximos aos processos de oxidação e redução do dímero, em potenciais em torno de -0,19 V e 0,57 V, que aumentam em intensidade com o número de ciclos realizados. Esses processos menos intensos podem estar relacionados com a formação de um filme eletroativo a partir da adsorção de moléculas do dímero próximas à superfície do eletrodo. A formação de filme dessa natureza sobre a superfície de eletrodos é reportada em trabalhos com experimentos de eletrólise prolongada de imipramina em meio aquoso [19].

4.3. Estudo de variação da velocidade de varredura em voltametria cíclica

Os experimentos de variação da velocidade de varredura foram realizados no intervalo de 0,02 a 0,10 V s⁻¹ para avaliar o grau de reversibilidade da reação e a natureza do transporte de material eletroativo para a superfície do eletrodo. Na Figura 12 são apresentados os voltamogramas cíclicos de uma solução de imipramina 1,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 7,4), em diferentes velocidades de varredura.

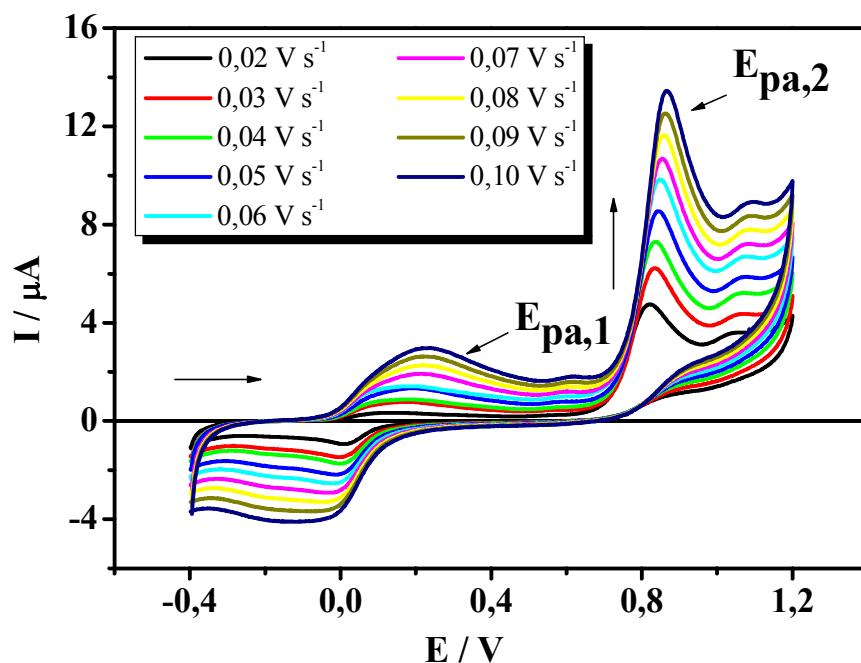


Figura 12. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se diferentes velocidades de varredura ($0,02$ a $0,10 \text{ V s}^{-1}$) para imipramina $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), registrados no 2º ciclo de varredura. Condições experimentais: $E_{\text{inicial}} = -0,40 \text{ V}$, $E_{\text{inversão}} = 1,20 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,40 \text{ V}$.

No intervalo de velocidade estudado, verificou-se que a oxidação da imipramina apresenta características de processo irreversível, o qual pode ser constatado pela ausência de pico na varredura reversa de potencial e pelo deslocamento dos potenciais de pico com o aumento da velocidade de varredura, como observado na Figura 12.

Além da irreversibilidade da reação, a relação existente entre I_{pa} versus $v^{1/2}$ também indica a natureza do transporte de massa que governa o processo redox. Na Figura 13 é apresentada a correlação linear obtida entre I_{p} versus $v^{1/2}$, tanto para a oxidação do dímero ($E_{\text{pa},1}$) quanto para a oxidação da imipramina ($E_{\text{pa},2}$), apontando indícios que a etapa determinante da velocidade é controlada pela difusão das espécies à superfície do eletrodo.

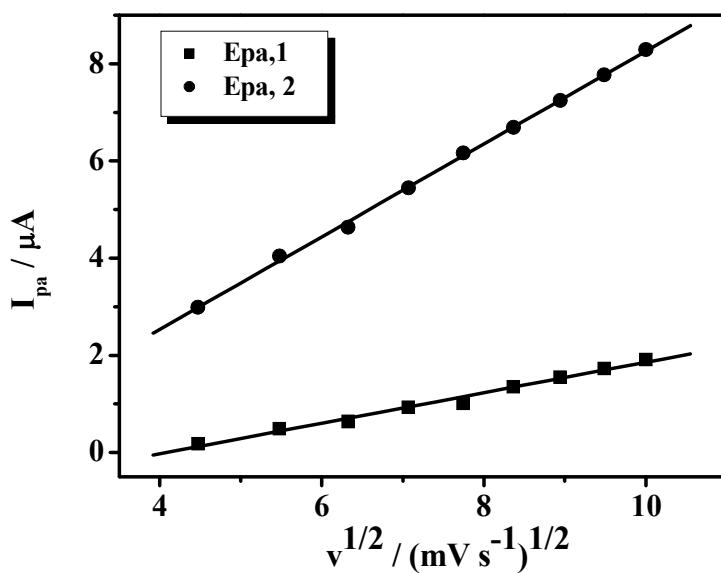


Figura 13. Variação das correntes de pico anódico (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) para a oxidação do dímero ($E_{pa,1}$) e para a oxidação da imipramina ($E_{pa,2}$), obtidas a partir dos valores extraídos da Figura 12.

4.4. Comportamento eletroquímico por voltametria de onda quadrada

Nas respostas obtidas com a voltametria de onda quadrada (VOQ), a corrente medida é uma resultante obtida pela diferença entre as correntes de varredura no sentido direto e no sentido reverso de aplicação dos pulsos de potencial. A separação e demonstração destas correntes podem ser utilizadas para se observar a presença de picos em ambos os sentidos e, assim, realizar uma avaliação prévia do tipo de reação redox que ocorre no sistema.

Para os testes iniciais utilizando VOQ é usual a utilização dos parâmetros $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ como condições experimentais da técnica, por serem estas as condições que fornecem melhores perfis voltamétricos baseados em simulações teóricas [28].

A Figura 14 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos com os testes de eletroatividade da imipramina $8,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), sobre EDDB, mostrando as componentes de corrente resultante, direta e reversa registradas no 2º ciclo.

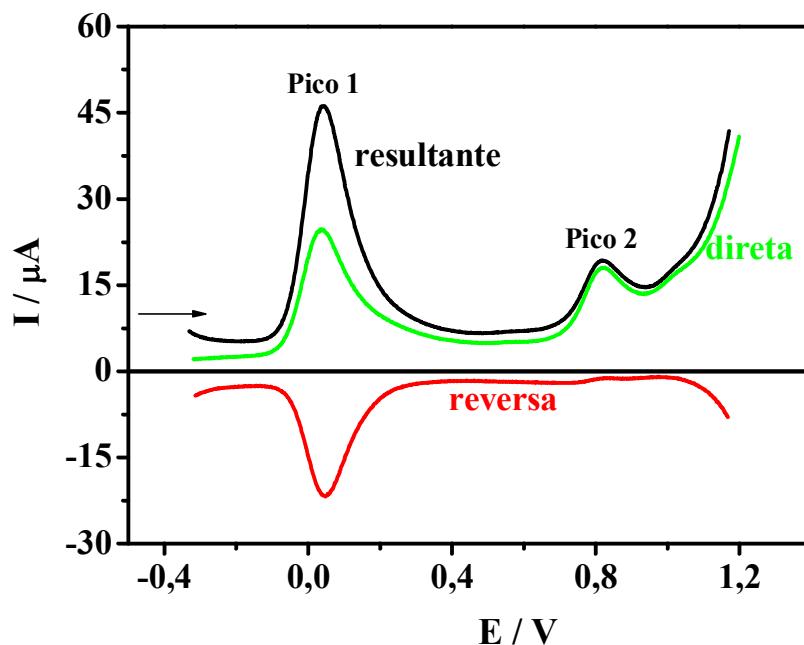


Figura 14. Voltamogramas de onda quadrada para solução de imipramina $8,26 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 7,4), mostrando as componentes de corrente resultante, direta e reversa registradas no 2º ciclo. Condições experimentais: $f = 100\text{ s}^{-1}$, $a = 50\text{ mV}$, $\Delta E_s = 2\text{ mV}$.

Conforme se pode observar na Figura 14, os voltamogramas de onda quadrada mostraram dois picos de oxidação bem definidos, com pico 1 em 0,04 V e pico 2 em 0,82 V referentes à oxidação do dímero e da imipramina, respectivamente. A ausência de componente de corrente reversa para a oxidação da imipramina confirma a irreversibilidade deste processo, enquanto para o dímero a presença das componentes de corrente direta e reversa indicam a reversibilidade do processo, assim como observado nos resultados de voltametria cíclica.

Baseado nos perfis obtidos pela VOQ para o desenvolvimento da metodologia analítica, utilizou-se a corrente resultante do par redox do dímero como sinal analítico, ao invés do pico resultante da oxidação da imipramina, pelos seguintes fatores: (1) há aumento no sinal analítico do dímero quando se soma os módulos das correntes direta e reversa, após a aplicação dos pulsos de potenciais; (2) maior sensibilidade analítica é alcançada pelo sinal do dímero, uma vez que é mais acentuado e (3) há ganho em termos de seletividade analítica pelo baixo potencial onde ocorre a reação já que, comparado ao pico de oxidação da imipramina, previne a ocorrência de interferentes de outros compostos eletroativos, possivelmente presentes na matriz a ser analisada. Dessa maneira, para obter o

sinal referente à oxidação do dímero pela VOQ adotou-se a programação de registros dos sinais obtidos no 2º ciclo.

4.5. Estudo da concentração hidrogeniônica do meio

Como primeira etapa no desenvolvimento de qualquer metodologia analítica, está a obtenção dos melhores parâmetros experimentais. Para isso, se faz necessário um estudo cuidadoso do meio onde se dará os processos responsáveis pelas medidas analíticas.

Nesse mesmo sentido, o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica inicia-se por ensaios empregando diversos eletrólitos de suporte, já que estes podem promover uma melhora significativa na sensibilidade e no perfil dos voltamogramas obtidos. Entre os eletrólitos de suporte comumente utilizados estão ácido sulfúrico, ácido perclórico, sulfato de sódio, bem como meios tamponantes fosfato e BR.

Para os estudos eletroanalíticos da imipramina, já se encontra apresentado na literatura o emprego do tampão BR como eletrólito de suporte que promove resposta de corrente e potencial bem definidos [17]. Assim, optou-se em se utilizar este meio no desenvolvimento da metodologia. Além do mais, o tampão BR é conhecido como tampão universal [20], que, portanto, permite utilização em diversos valores de pH (faixa de 2 a 12).

Uma vez escolhido o eletrólito de suporte é necessário realizar, como etapa seguinte, estudos da influência da concentração hidrogeniônica do meio nas correntes e potenciais de pico. Estas informações também servem para se avaliar detalhes acerca do mecanismo de oxidação/redução eletroquímica, relacionados à protonação dos reagentes e ou produtos [29].

Para o estudo da influência do pH do meio, verificou-se a influência deste no intervalo de 2 a 12, utilizando-se solução tampão BR 0,04 mol L⁻¹, com o objetivo de verificar em que valor se registra o melhor perfil voltamétrico para fins analíticos. A Figura 15 apresenta os voltamogramas obtidos com o estudo de imipramina 1,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ sobre EDDB, com f = 100 s⁻¹, a = 50 mV e ΔE_s = 2 mV, obtidos para diferentes valores de pH.

Na Figura 15 não está registrado o voltamograma correspondente ao pH 12 por não ter sido verificado processos com corrente considerável. Com relação aos demais valores de pH estudados, observa-se que os potenciais e as intensidades das correntes de

pico mostraram-se dependentes do pH do meio. Pode-se verificar que os potenciais de pico para o dímero, deslocaram-se para valores menos positivos com o aumento do pH, indicando que a transferência eletrônica é dependente do pH do meio.

A Figura 16 apresenta as correntes de pico anódico (I_{pa}) obtidas com a variação do pH do meio para o pico de oxidação da imipramina e para o pico de oxidação do dímero em imipramina $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ sobre EDDB. Analisando a relação entre I_p e pH, constatou-se que é obtida maior resposta de corrente de pico (sensibilidade) em pH 7,0, tanto para a oxidação da imipramina como para o dímero. Bem como nesse pH se regista considerável seletividade para a oxidação do dímero, devido ao fato do potencial de pico estar próximo de zero. Portanto, baseado nesse estudo, o pH que permite melhor resposta analítica é o pH 7,0.

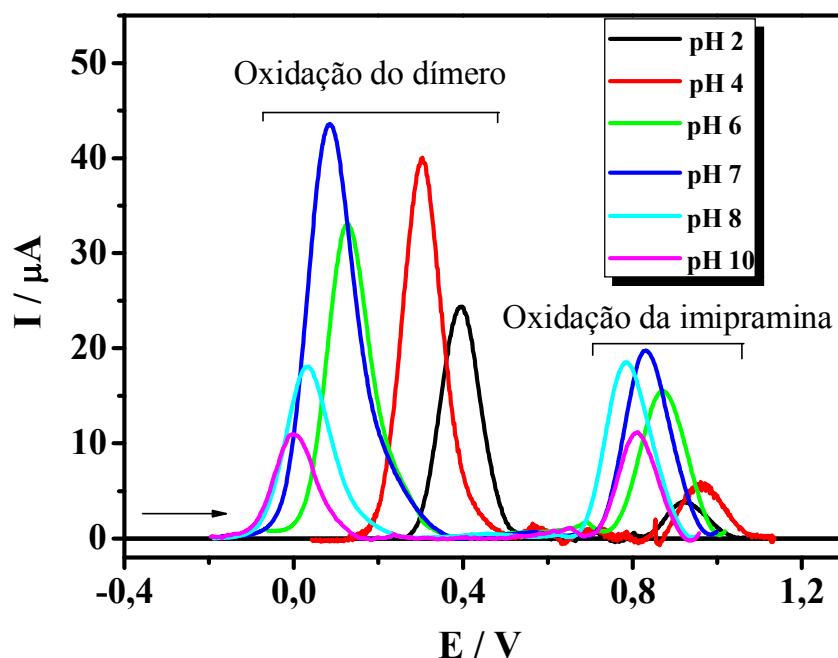


Figura 15. Voltamogramas de onda quadrada para imipramina $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em tampão BR $0,04$ mol L⁻¹, sobre EDDB, com $f = 100$ s⁻¹, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV, obtidos para diferentes valores de pH.

Com o intuito de se desenvolver a metodologia sob condições próximas daquele encontrado no sangue fisiológico, para posterior aplicação do método nesse meio biológico, se decidiu verificar a viabilidade analítica no pH 7,4. Para tanto, registrou-se os voltamogramas obtidos em tampão BR $0,04$ mol L⁻¹ em ambos os valores de pH, sob as mesmas condições. Na Figura 17 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada da

imipramina $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, para os pHs 7,0 e 7,4, sobre EDDB.

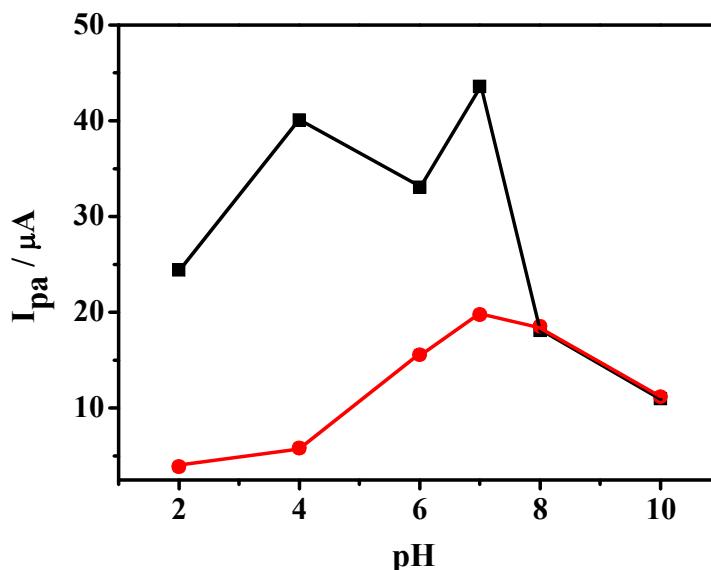


Figura 16. Variação da corrente de pico anódico (I_{pa}) em função do pH do meio (●) para o pico de oxidação da imipramina e (■) para o pico de oxidação do dímero, obtidas a partir dos valores extraídos da Figura 15.

Analizando a Figura 17 obtida pelos estudos experimentais, verificou-se que não há mudanças significativas no perfil voltamétrico quando se utiliza pH 7,4. Informação esta, que pode ser ratificada comparando os valores de potencial de pico (E_p) e corrente de pico (I_p), retirados da Figura 11 e resumidos na Tabela 2, para os dois meios.

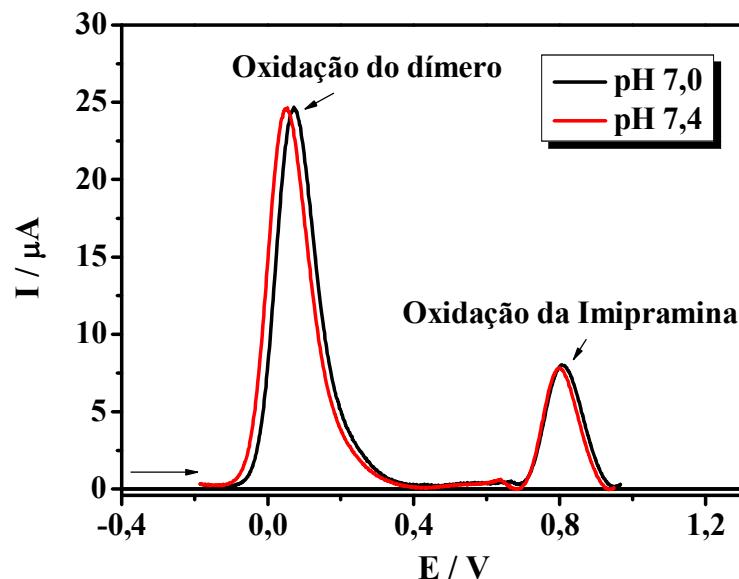


Figura 17. Voltamogramas de onda quadrada para imipramina $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH 7,0 e 7,4, sobre EDDB e condições aplicadas de $f = 100$ s⁻¹, $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV.

Tabela 2. Valores de I_{pa} e E_p para o pico de oxidação do dímero e o pico da oxidação de imipramina, retirados dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 11.

pH	Pico da oxidação do dímero		Pico da oxidação da imipramina	
	$I_{pa} / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_{pa} / \mu\text{A}$	E_p / V
7,0	24,7	0,07	8,03	0,80
7,4	24,6	0,05	7,85	0,80

Com a análise da Tabela 2, percebe-se que não há variação considerável em termos de valores de corrente de pico. Portanto, não há perda de sensibilidade, bem como, também, verifica-se a tendência, anteriormente observada, do deslocamento do E_p para valores menos positivos e mais próximos de zero com o aumento do pH. Consequentemente, há ganho em seletividade.

Baseado nas observações citadas anteriormente, optou-se pelo pH 7,4 como a concentração hidrogeniônica adequada para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica.

4.6. Otimização dos parâmetros da VOQ

Com as melhores condições experimentais determinadas, parte-se para a otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada. Uma vez que a frequência de aplicação de pulsos de potencial (f), amplitude de pulso de potencial (a) e incremento de varredura de potencial (ΔE_s) são parâmetros da VOQ que influenciam diretamente a resposta voltamétrica. Ou seja, aplicando-se variações destes três parâmetros é possível obter voltamogramas com perfis mais definidos e com sinais de corrente mais acentuados.

A fim de se obter a otimização dessas variáveis, adota-se como estratégia manter constante duas delas, enquanto se faz o estudo da influência da variação da terceira, repetindo-se o processo, em seguida, para as outras variáveis até se obter as melhores condições, separadamente, de cada um desses parâmetros da técnica de VOQ. Adota-se como condições iniciais, por razões já citadas anteriormente, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

4.6.1. Efeito da frequência de aplicação de pulsos de potencial (f)

A otimização da frequência é de fundamental importância, pois, para a maioria dos processos eletródicos, a corrente de pico é diretamente proporcional ao seu valor. Assim, com a maximização do valor de f , aumenta-se, consequentemente, a sensibilidade da técnica experimental e, ainda, fornece informações sobre o processo mecanístico do sistema [30].

A Figura 18 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para a imipramina em função da variação dos pulsos de frequência. Observa-se que à medida que se aumenta a frequência de aplicação de pulsos de potenciais, ocorre também um aumento na intensidade da corrente de pico e um deslocamento dos potenciais de pico para valores mais positivos.

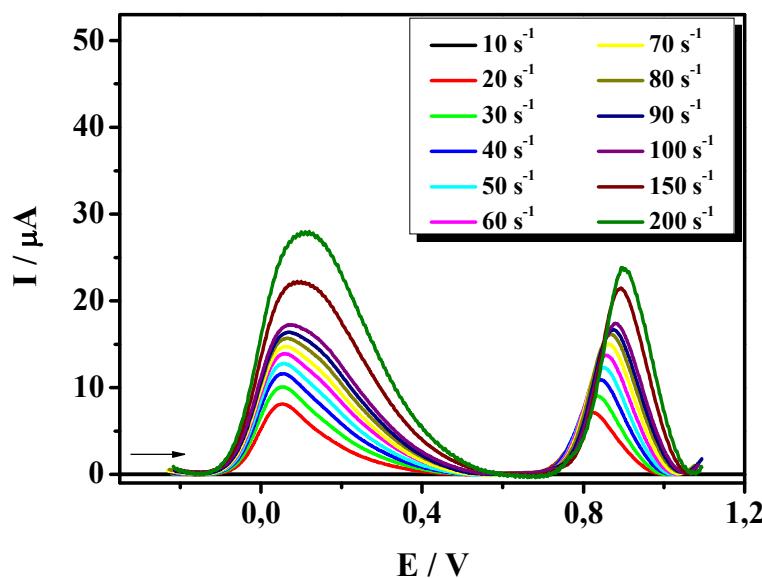


Figura 18. Voltamogramas de onda quadrada para imipramina $1,10 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em EDDB em diferentes frequências de aplicação de pulsos em meio de tampão BR $0,04$ mol L⁻¹. $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV.

As medidas eletroquímicas da corrente de pico fornecem informações importantes quando relacionados com a frequência de aplicação de pulsos de potencial. Para sistemas reversíveis, I_{pa} varia linearmente com a raiz quadrada da frequência ($f^{1/2}$); por outro lado, varia linearmente com a frequência para sistemas irreversíveis [30].

A fim de se avaliar o comportamento da corrente de pico de oxidação do dímero em função da variação da frequência, grafou-se os gráficos de I_{pa} versus f e I_{pa} versus $f^{1/2}$, com gráficos obtidos se encontrando na Figura 19. Verifica-se uma dependência linear de

I_{pa} com $f^{1/2}$ e a não linearidade de I_{pa} com f , para a oxidação do dímero, confirmando que o processo tem características de um sistema reversível [28].

Observa-se, ainda, que para valores de frequências acima de 100 s^{-1} , a relação perde a linearidade. Isto ocorre, porque, na prática, a relação da corrente de pico e a frequência é dada por: $I_{pa} = kf^{1/2}$, onde k é uma constante que depende da concentração do reagente, da área do eletrodo, do coeficiente de difusão da espécie redox, do coeficiente de transferência de eletrônica, da constante cinética, da amplitude e do incremento de potenciais [29]. De modo que, em condições limites, processos reversíveis podem se tornar quase-reversíveis com o aumento da frequência de pulsos de potencial aplicado [28] e, consequentemente, se verifica a perda da linearidade de I_{pa} com $f^{1/2}$.

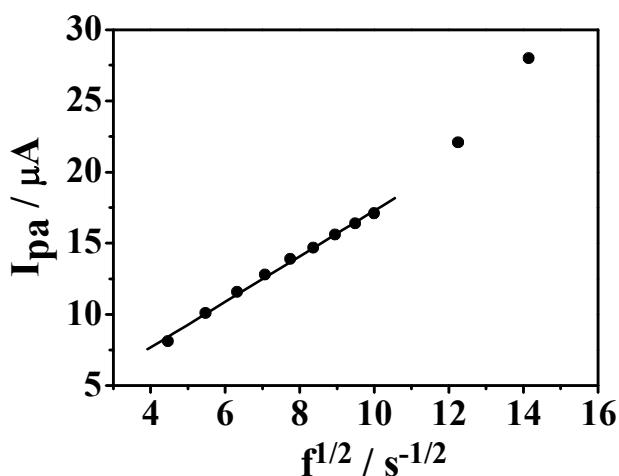
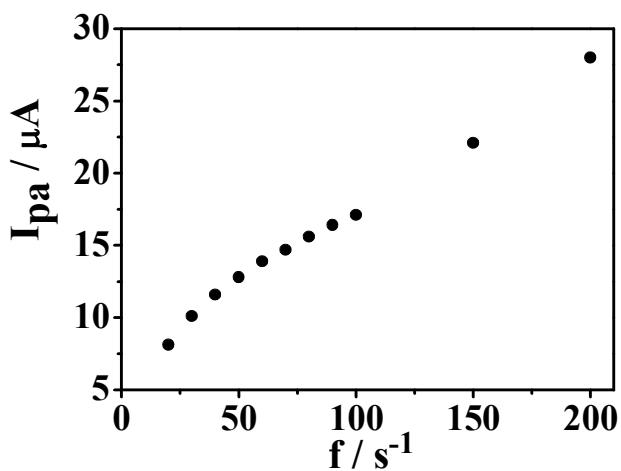


Figura 19. Relação entre as correntes de pico (I_{pa}) e a frequência de aplicação dos pulsos de potencial para a imipramina sobre EDDB para o pico de oxidação do dímero em (A) I_{pa} versus f e em (B) I_{pa} versus $f^{1/2}$, obtidas a partir dos valores extraídos da Figura 18.

Todos estes parâmetros podem influenciar na resposta de corrente e, consequentemente, na sensibilidade das análises voltamétricas. Desta forma, a frequência de 100 s^{-1} foi a escolhida como otimizada, pois foi a que apresentou a melhor relação de sinal e perfil, estando dentro da faixa de linearidade.

4.6.2. Efeito da amplitude de pulso de potencial (a)

A amplitude dos pulsos de potencial é outro parâmetro importante a ser otimizado, já que o aumento da amplitude pode provocar aumento da corrente de pico e, assim, ganho na sensibilidade [28]. Experimentos foram realizados variando a amplitude no intervalo de 10 mV a 80 mV.

Na Figura 20 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada de uma solução de imipramina $1,10 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) sobre EDDB, obtidos para diferentes valores de amplitude. Com a variação da amplitude dos pulsos, observou-se um aumento linear na intensidade da corrente de pico da oxidação do dímero em toda a faixa de amplitude estudada, como está registrado na Figura 21.

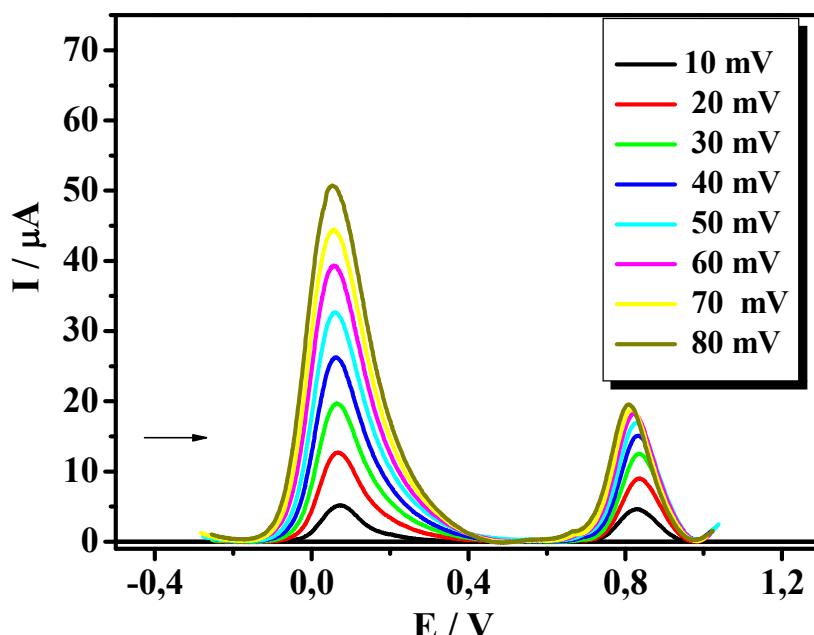


Figura 20. Voltamogramas de onda quadrada para imipramina $1,10 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em diferentes amplitudes de pulso em meio de tampão BR $0,04\text{ mol L}^{-1}$. $f = 100\text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 2\text{ mV}$.

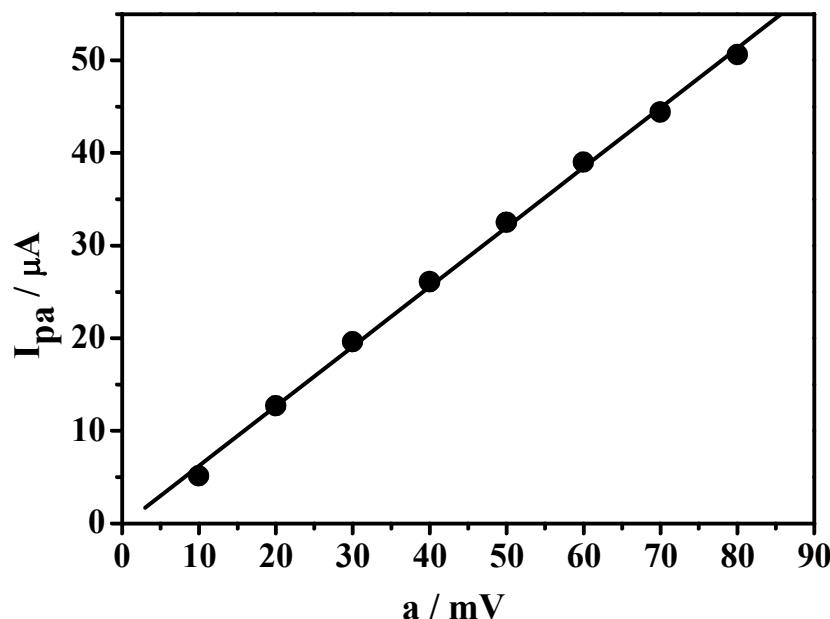


Figura 21. Dependência da corrente de pico de oxidação do dímero (I_{pa}) com a variação de amplitude de pulso de potencial (a) para a imipramina, obtidas a partir dos valores retirados da Figura 20.

Apesar da variação de amplitude ter provocado um aumento da corrente de pico, é verificado também um aumento na largura de potencial de meia altura ($\Delta E_{p/2}$) em amplitudes menores e maiores que 50 mV, conforme se observa na Tabela 3. Dessa forma, optou-se por trabalhar com uma amplitude de 50 mV.

Tabela 3. Relação entre amplitude de pulsos de potenciais e os respectivos valores obtidos da largura de potencial de meia altura ($\Delta E_{p/2}$), para a imipramina sobre EDDB, com $f = 100 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

a / mV	10	20	30	40	50	60	70	80
$\Delta E_{p/2}$ / mV	70,4	73,3	80,3	84,2	69,4	78,3	84,3	103,1

Em relação aos potenciais de pico, não são verificados deslocamentos significativos com a variação da amplitude dos pulsos, o que reforça ainda mais a característica de um processo reversível para a oxidação do dímero. Já para a oxidação da imipramina, conforme se observa pela Figura 20, são verificados deslocamentos sensíveis de potencial de pico, característica de processos irreversíveis [28].

4.6.3. Efeito do incremento de varredura de potencial (ΔE_s)

Como a velocidade efetiva de varredura de potenciais na VOQ é dada pelo produto de f por ΔE_s , a aplicação de valores maiores de incremento possibilita tempos experimentais mais curtos, além do fato de que o parâmetro incremento de potencial também aumenta o sinal e sensibilidade analítica da técnica. Porém, valores mais elevados para ΔE_s podem provocar um alargamento do pico, diminuindo, deste modo, a resolução de análise [24]. Na Figura 22 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada para uma solução $1,10 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de imipramina em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 7,4), ao variar o incremento de varredura de 1 a 10 mV.

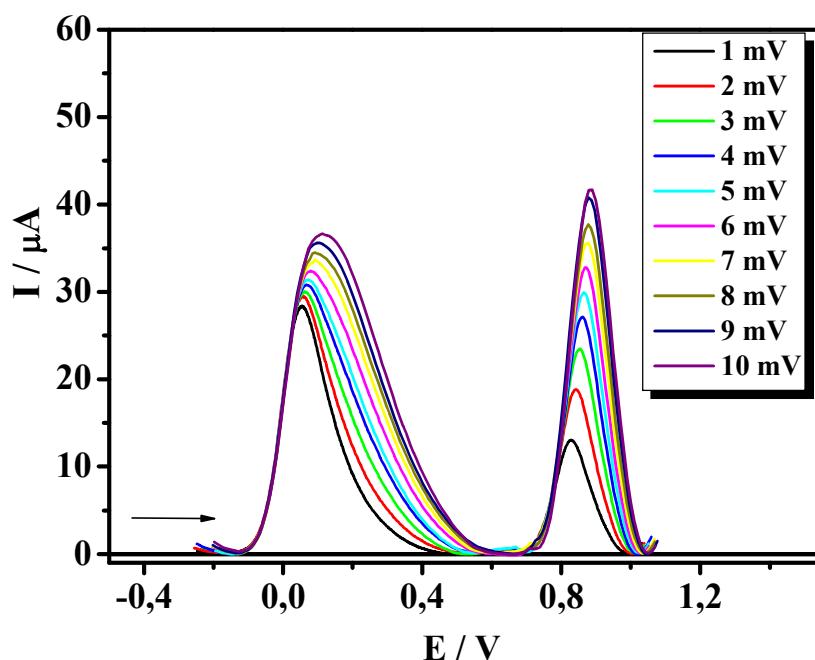


Figura 22. Voltamogramas de onda quadrada para imipramina $1,10 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ sobre EDDB em diferentes incrementos de varredura de potencial em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹. $f = 100$ s⁻¹, $a = 50$ mV.

Observa-se que há um relação linear entre a resposta de corrente e o incremento dentro do intervalo de 1 a 6 mV, conforme registrado na Figura 23. Por outro lado, com o aumento do incremento de varredura, ocorre deslocamento do potencial de pico para região mais positiva e para incrementos maiores que 2 mV o perfil dos voltamogramas não ficam bem definidos. Deste modo, optou-se por trabalhar com incremento de 2 mV, como condição otimizada.

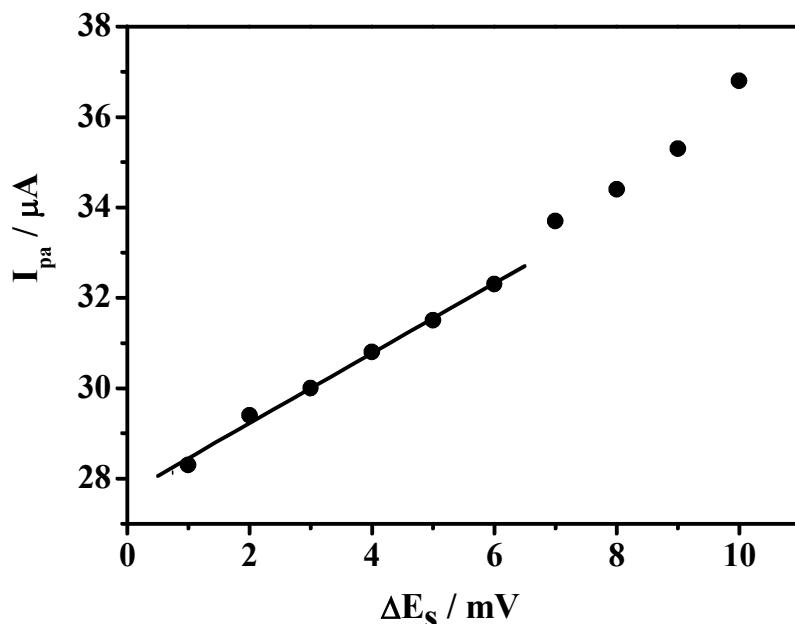


Figura 23. Relação entre as correntes de pico da oxidação do dímero (I_{pa}) e o incremento de varredura de potencial (ΔE_s) para a imipramina sobre EDDB, a partir de dados retirados da Figura 22.

Desta forma, foram estabelecidas como as melhores condições de determinação do pico de oxidação do dímero da imipramina: tampão B.R 0,04 mol L⁻¹ pH 7,4, frequência de aplicação de pulsos de potencial de 100 s⁻¹, amplitude de pulso de potencial 50 mV e incremento de varredura de potencial de 2 mV.

4.7. Construção da curva analítica e determinação da faixa de linearidade, dos limites de detecção e de quantificação, repetibilidade e reproduzibilidade

Após estabelecidas as melhores condições experimentais para a determinação da imipramina, foram construídas curvas analíticas nas condições otimizadas. E, posteriormente, foram determinados os parâmetros analíticos de validação: faixa de linearidade, limites de detecção e de quantificação, repetibilidade e reproduzibilidade para a metodologia desenvolvida.

As curvas analíticas foram obtidas em triplicata ($n = 3$) utilizando-se adição sucessiva de padrão. Para isso, em uma célula contendo 12 mL de tampão BR, foram adicionadas alíquotas da solução estoque de $1,04 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ do padrão analítico de imipramina, sendo agitada a solução resultante para homogeneização e, em seguida, feita a medida voltamétrica.

A sequência de adições foi repetida a partir da obtenção do primeiro pico de oxidação que indicaria o menor valor adicionado que se diferenciava do branco, correspondendo ao primeiro ponto da curva analítica. A Figura 24A apresenta os voltamogramas de onda quadrada para as diferentes concentrações de imipramina obtidos sobre EDDB, dentro da faixa de linearidade encontrada. Enquanto na Figura 24B é apresentado o aumento proporcional dos valores médios ($n = 3$) das correntes de pico com a concentração de imipramina, com suas respectivas barras de desvio padrão, na faixa de linearidade obtida.

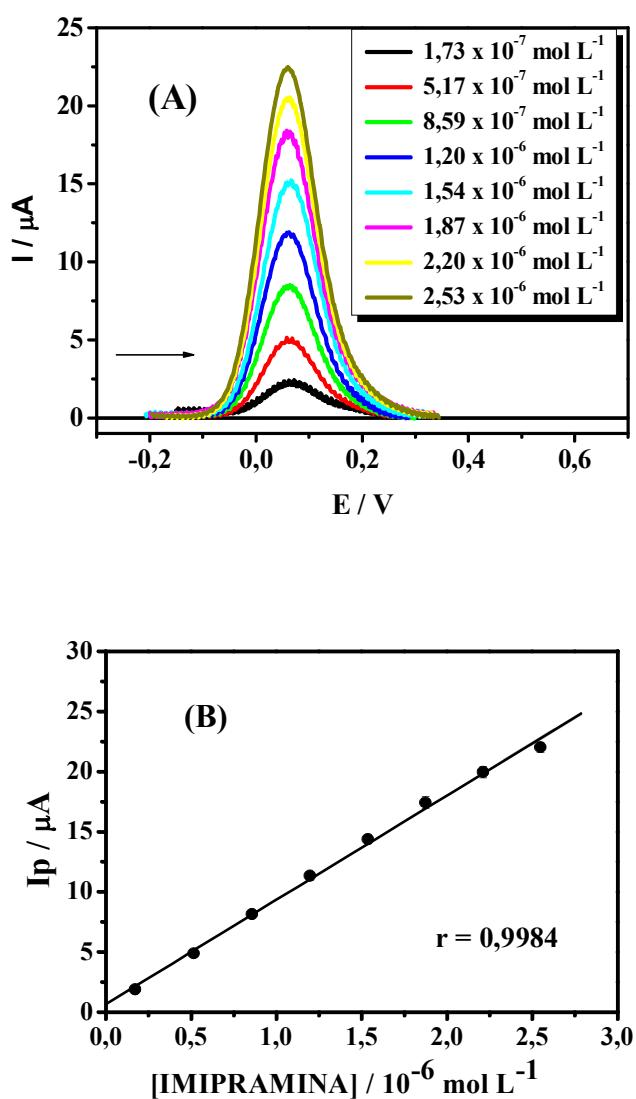


Figura 24. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de imipramina em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) sobre EDDB; $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) Curva analítica obtida a partir dos valores médios ($n = 3$) das correntes de pico com a concentração de imipramina, com suas respectivas barras de desvio, na faixa de linearidade encontrada.

A faixa de linearidade obtida entre as correntes de pico e a concentração de imipramina foi de $1,73 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $2,53 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, correspondendo à faixa de concentrações de imipramina na qual a metodologia pode ser aplicada. Para se ter uma estimativa do quanto os pontos experimentais de I_p com a concentração de imipramina se ajustam a uma linha reta, obtidos na curva analítica, calculou-se o coeficiente de correlação (r) pela equação 2 [31]:

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]} \quad (\text{equação 2})$$

onde x_i e y_i representam os valores de concentração de imipramina e corrente de pico, respectivamente, enquanto \bar{x} e \bar{y} são os valores médios. Ao efetuar o cálculo, observou-se $r = 0,9984$, o que assegura boa linearidade e concordância com o estabelecido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) [32], órgão responsável pela normatização de validação de métodos analíticos no Brasil, que recomenda o valor do coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99.

Uma vez verificada que existe correlação linear entre I_p e concentração de imipramina na curva analítica, utilizou-se o método dos mínimos quadrados [31] para se encontrar a equação da reta adequada. O cálculo do coeficiente angular (b) foi realizado pela equação 3:

$$b = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{equação 3})$$

Já o coeficiente linear (a), que representa o intercepto com o eixo das ordenadas, foi obtido pela substituição na própria equação da reta ($a = y - bx$). Desta forma, obteve-se a equação da reta para a curva analítica com os respectivos intervalos de confiança de 95% para os valores dos coeficientes linear e angular, representada pela equação 4:

$$I_p = 6,76 \times 10^{-7} \pm 5,98 \times 10^{-8} + 8,68 \pm 0,64 [\text{IMIPRAMINA}] \quad (\text{equação 4})$$

onde [IMIPRAMINA] representa a concentração da imipramina.

Também foi determinado o limite de detecção (LD) que, em termos gerais, é o menor valor detectado em confiabilidade de precisão aceitável, em função do limite do sistema, ou seja, do ruído [33]. Ou seja, é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Para o seu cálculo, foram seguidos os critérios definidos pela IUPAC [34], onde o LD é a menor concentração de um analito que dará um sinal igual a três vezes o nível de ruído da linha de base, sendo obtido pela equação 5:

$$LD = \frac{3S_b}{b} \quad (\text{equação 5})$$

onde S_b é o desvio padrão da média de medidas do branco (neste caso, utilizou-se a média de dez brancos) e b é a inclinação da curva analítica. Nestas condições, a confiabilidade de LD é de 95 %.

As medidas das soluções do branco servem para se avaliar a resposta da metodologia frente a impurezas ou espécies interferentes e a corrente capacitiva do sistema. Além disto, as análises das medidas do branco servem para se determinar os efeitos de alguma mudança que possa ocorrer durante o desenvolvimento de uma metodologia.

Além do limite de detecção, foi também avaliado o limite de quantificação (LQ), que é a menor concentração do analito que pode ser determinado com um nível aceitável de incerteza sob as condições experimentais do método [35]. O LQ indica o desempenho ou a sensibilidade do instrumento utilizado para análise, neste caso um potenciómetro. O valor de LQ foi calculado considerando que o limite do equipamento ainda não foi atingido, atingindo uma confiabilidade de 99% [33]. Considerando-se a metodologia proposta o valor de LQ é dado pela relação:

$$LQ = \frac{10S_b}{b} \quad (\text{equação 6})$$

Assim, os valores obtidos para LD e LQ foram $4,35 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ ($13,8 \mu\text{g L}^{-1}$) e $1,45 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ ($46,1 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente.

Além da faixa de linearidade, limites de detecção e de quantificação, outro parâmetro analítico de validação importante é a precisão da metodologia. Segundo a IUPAC [36], a precisão expressa o grau de concordância de resultados de testes independentes obtidos sob condições estabelecidas, sendo expressa pela estimativa do percentual do desvio padrão relativo (%RSD) e avaliada pela repetibilidade e a reprodutibilidade.

A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas sob as mesmas condições de medida, tais como mesmo procedimento experimental, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições e em repetições em curto espaço de tempo. Por sua vez, a reprodutibilidade avalia o grau de concordância entre os resultados das medições efetuadas sob condições variadas de medida [37].

A repetibilidade da metodologia foi avaliada por meio da realização de dez medidas sucessivas [33] de uma solução de imipramina $8,59 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, correspondente ao terceiro ponto da curva analítica, sob as condições experimentais otimizadas e realizadas no mesmo dia. Na mesma perspectiva, a reprodutibilidade foi realizada tomando cinco medidas em dias diferentes e utilizando-se de soluções diferentes [33].

O cálculo do RSD% foi realizado tomando-se a equação 7, sendo DP o desvio padrão das medidas e Ip os valores das médias obtidas das correntes de pico [33].

$$\text{RSD\%} = \frac{\text{DP}}{\text{Ip}} \times 100 \quad (\text{equação 7})$$

Os valores de RSD% obtidos para repetibilidade e reprodutibilidade foram 2,27% e 2,07%, respectivamente. Estes valores indicam boa exatidão para a metodologia desenvolvida, uma vez que, para a análise de analitos em concentrações da ordem de 10^{-7} mol L⁻¹, a faixa aceitável para RSD% é de até 15% [38].

Na Tabela 4, estão resumidos os resultados obtidos da metodologia desenvolvida para a faixa de linearidade, a equação da reta da curva analítica, o valor do coeficiente de correlação da curva analítica (r), o desvio padrão da média aritmética de dez brancos (S_b), os valores calculados do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), bem como os valores de desvio padrão relativo (RSD%) obtidos para repetibilidade e reproduzibilidade.

Tabela 4. Figuras de mérito obtidas para a metodologia eletroanalítica desenvolvida para a determinação de imipramina em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 7,4), $f = 100\text{ s}^{-1}$, $a = 50\text{ mV}$, $\Delta E_s = 2\text{ mV}$.

Parâmetros	Resultados obtidos
Faixa de linearidade	$1,73 \times 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$ a $2,53 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$
Equação da reta	$I_p = 6,76 \times 10^{-7} \pm 5,98 \times 10^{-7} + 8,68 \pm 0,64$ [IMIPRAMINA]
r	0,9984
S_b (A)	$1,28 \times 10^{-7}$
LD (mol L ⁻¹)	$4,35 \times 10^{-8}$ ($13,8\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$)
LQ (mol L ⁻¹)	$1,45 \times 10^{-7}$ ($46,1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$)
RSD (Repetibilidade)	2,27% ($n = 10$)
RSD (Reproduzibilidade)	2,07% ($n = 5$)

4.8. Testes de recuperação em eletrólito puro

Após avaliação da faixa de linearidade, LD, LQ e precisão, executou-se testes de recuperação do analito em eletrólito puro de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ e pH 7,4, a fim de se estimar a exatidão da metodologia, por meio do método de adição de padrão.

No método da adição de padrão, quantidades conhecidas do analito são adicionadas a uma amostra desconhecida e do aumento de sinal analítico se deduz o quanto do constituinte está presente na amostra original [39].

No caso de amostras determinadas em eletrólito de suporte puro, o cálculo de recuperação é realizado a fim de se observar quanto do padrão adicionado pode ser

realmente detectado, mostrando desta maneira a viabilidade da utilização da metodologia para amostras reais.

A taxa de recuperação foi avaliada utilizando-se o método gráfico, onde o eixo x (eixo das concentrações) forneceu a concentração de padrão adicionado ao eletrólito e a extrapolação neste eixo mostrou a relação percentual entre as quantidades recuperadas e adicionadas, de acordo com a relação [33]:

$$\text{Recuperação\%} = \frac{[\text{recuperada}]}{[\text{adicionada}]} \cdot 100 \quad (\text{equação 8})$$

A Figura 25A apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos nas recuperações de imipramina em eletrólito de suporte (tampão BR 0,04 mol L⁻¹ e pH 7,4) obtidas em triplicata ($n = 3$), enquanto na Figura 25B é mostrada a curva de recuperação construída a partir das médias de correntes obtidas resultantes, com suas respectivas barras de desvio padrão.

A exatidão foi estimada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de imipramina adicionada à amostra. Outro ponto que foi ponderado nos cálculos foi o nível de tendência (BIAS), que fornece um índice de inexatidão devido a erros sistemáticos nas medidas realizadas [40]. Este índice pode ser calculado a partir da relação apresentada na equação 9:

$$\text{BIAS\%} = \frac{x - x_0}{x_0} \cdot 100 \quad (\text{equação 9})$$

sendo x o valor médio detectado para a concentração de imipramina e x_0 o valor adicionado.

Os resultados determinados neste estudo de recuperação em eletrólito puro se encontram resumidos na Tabela 5, apresentando percentagem de recuperação elevada que é indício de que a metodologia possui boa exatidão.

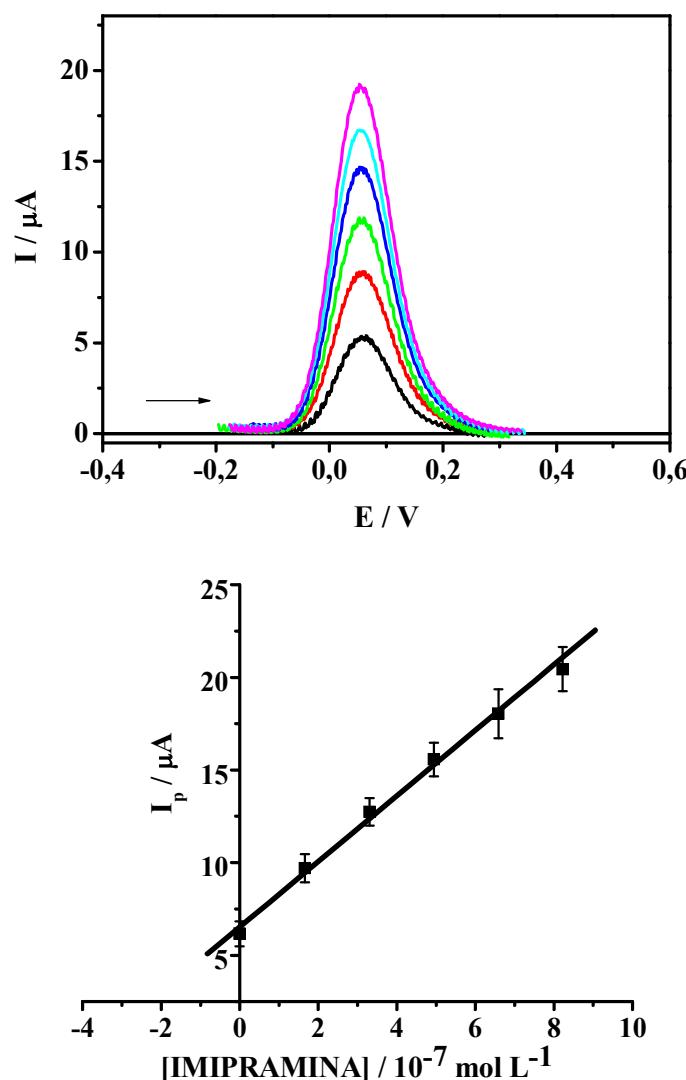


Figura 25. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidas variando-se a concentração de imipramina adicionada em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) sobre EDDB; $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) Curva de recuperação em eletrólito puro para a imipramina obtida a partir dos valores médios de corrente de pico ($n = 3$), com suas respectivas barras de desvio padrão.

Tabela 5. Resultados obtidos para as curvas de recuperação para a imipramina em eletrólito de suporte (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) sobre EDDB.

Quantidade Adicionada (mol L^{-1})	Quantidades Detectadas (mol L^{-1})	Quantidade Média Detectada (mol L^{-1})	Recuperação% Média	RSD%	BIAS%
$4,15 \times 10^{-7}$	$3,65 \times 10^{-7}$	$3,85 \times 10^{-7}$	92,9	4,8	-7,2
	$3,91 \times 10^{-7}$				
	$4,01 \times 10^{-7}$				

4.9. Teste de recuperação em formulações farmacêuticas

Tendo-se executado estudos de recuperação em eletrólito puro, realizou-se em seguida os mesmos estudos em formulações farmacêuticas comerciais que contêm a imipramina como princípio ativo, a fim de verificar o desempenho da metodologia desenvolvida em matrizes mais complexas.

Para a escolha das formulações farmacêuticas comerciais que seriam empregadas no estudo, utilizou-se como critério as que são mais comercializadas. Neste sentido, realizou-se uma consulta às drogarias da cidade de Fortaleza e constatou-se que haviam duas formulações comerciais mais vendidas, contendo a imipramina como princípio ativo. Portanto, estas formulações comerciais que serão designadas por Formulação A e B, foram as escolhidas para os testes.

As duas formulações farmacêuticas acima citadas apresentam as seguintes diferenças químicas:

- (a) o contra-íon presente: na Formulação A, a imipramina se apresenta na forma de cloridrato de imipramina (mesmo composto usado como padrão durante o desenvolvimento da metodologia), enquanto que na Formulação B contém o pamoato de imipramina cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 26;
- (b) composição química (excipientes), conforme é apresentado na Tabela 6.

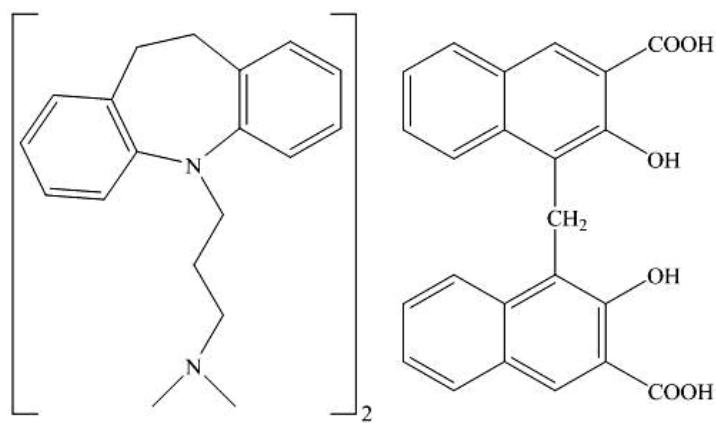


Figura 26. Fórmula estrutural química do pamoato de imipramina.

Assim sendo, a presença de outro contra-íon e a composição diferenciada quanto a excipientes nos dois medicamentos são condições favoráveis que permitem comparar, nos testes de recuperação para as duas formulações, o efeito de matriz sobre a resposta analítica. Os testes de recuperação foram executados, sendo realizadas seis adições, de

forma que a primeira corresponde à formulação comercial e as restantes ao padrão analítico.

Tabela 6. Relação de excipientes presentes na composição química das formulações comerciais empregadas nos estudos.

Formulação Comercial	Composição Química(excipientes)
Formulação A (Cloridrato de imipramina)	Óxido de ferro vermelho
	Dióxido de titânio
	Estearato de magnésio
	Amido de milho
	Sacarose
	Celulose microcristalina
	Talco
Formulação B (Pamoato de imipramina)	Estearato de magnésio
	Celulose microcristalina
	Talco
	Amido de milho

Na Figura 27 estão apresentadas as curvas de recuperação com as respectivas barras de desvio padrão da média das medidas em triplicata, obtidas pela adição dos medicamentos e adições do padrão analítico.

Na Tabela 7 são apresentados os valores médios obtidos das curvas de recuperação para a imipramina, utilizando-se as Formulações A e B em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 7,4) sobre EDDB.

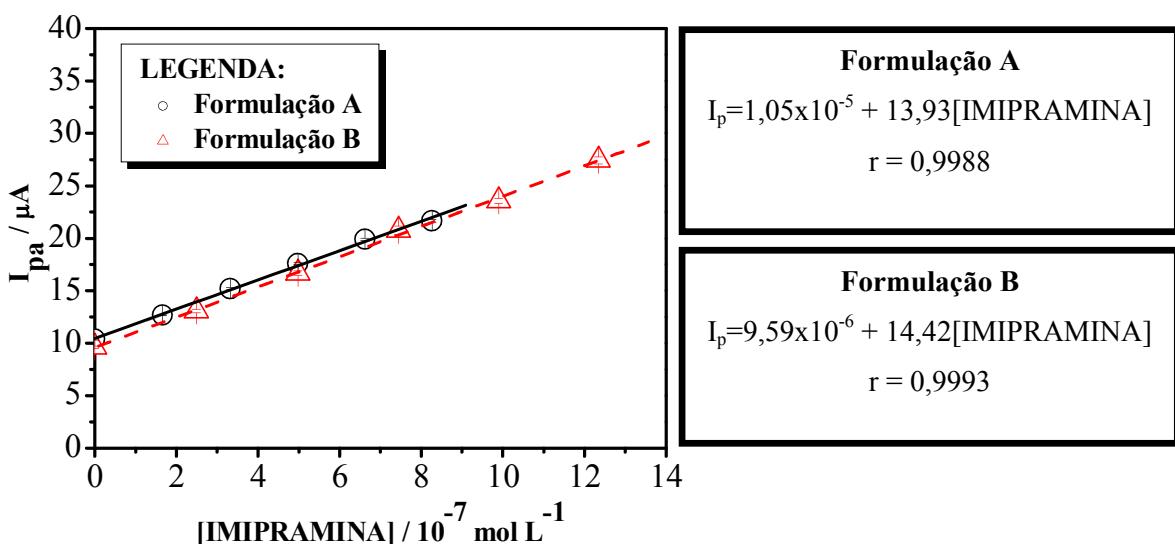


Figura 27. Curvas de recuperação obtidas a partir dos valores médios de corrente de pico para imipramina nas Formulações A e B em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH 7,4, sobre EDDB, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

O valor de 95,5% para a recuperação empregando a Formulação A se mostrou com RSD% dentro da faixa aceitável [33]. Com relação a Formulação B não se observou recuperação com valores tão bons quanto para a Formulação A, talvez por dificuldades em sua solubilização durante a preparação da amostra. Ainda assim, pode-se dizer que a metodologia aplicada é eficiente também na determinação de imipramina nesse medicamento, pois o valor de recuperação está dentro dos padrões aceitáveis para metodologias analíticas (70% a 120% para RSD% abaixo de 5%) [33]. Além disso, apresentou-se bastante preciso com valor de RSD% consideravelmente baixo em virtude da faixa de concentração de sua determinação.

Tabela 7. Resultados obtidos para as curvas de recuperação para a imipramina utilizando-se as Formulações A e B em eletrólito de suporte (tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH 7,4) sobre EDDB.

Quantidade presente na formulação	Formulação A	Formulação B
Adicionada	7,86 x 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	7,86 x 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹
Detectada	7,51 x 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	6,65 x 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹
Recuperação%	95,5	84,6
RSD%	2,94	1,75
BIAS%	-4,4	-15,4

Comparou-se os coeficientes angulares das curvas de recuperação para os dois grupos de amostras. De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que as curvas de recuperação apresentaram-se inclinações semelhantes (coeficientes angulares bem próximos), mesmo possuindo matrizes diferentes. Isto indica que o efeito de matriz se apresentou minimizado, apresentando indícios, desta forma, para a boa seletividade da metodologia aplicada [41].

4.10. Validação por comparação com método padrão da farmacopéia

Para fins de validação da metodologia desenvolvida, realizaram-se estudos comparativos com espectroscopia de absorção no UV-Vis, metodologia padrão para determinação de cloridrato de imipramina recomendada pela Farmacopéia Britânica [23].

Inicialmente, visando obter o espectro de absorção no UV-Vis correspondente ao cloridrato de imipramina (padrão), realizou-se varreduras de comprimento de onda na faixa de 800 a 250 nm e monitoramento da absorbância. Observou-se que o comprimento de onda correspondente ao máximo de absorbância foi obtido em 291 nm, comprimento este selecionado para os estudos.

Em seguida, construiu-se a curva analítica para o cloridrato de imipramina a partir das medidas de seis soluções de concentrações conhecidas da amostra padrão no intervalo de $5,00 \times 10^{-5}$ a $2,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Realizou-se as medidas em triplicata e a curva analítica foi traçada a partir dos valores médios dos pontos e seus respectivos desvios padrões. A Figura 28 apresenta os espectros de absorção no UV-Vis e a curva analítica obtida.

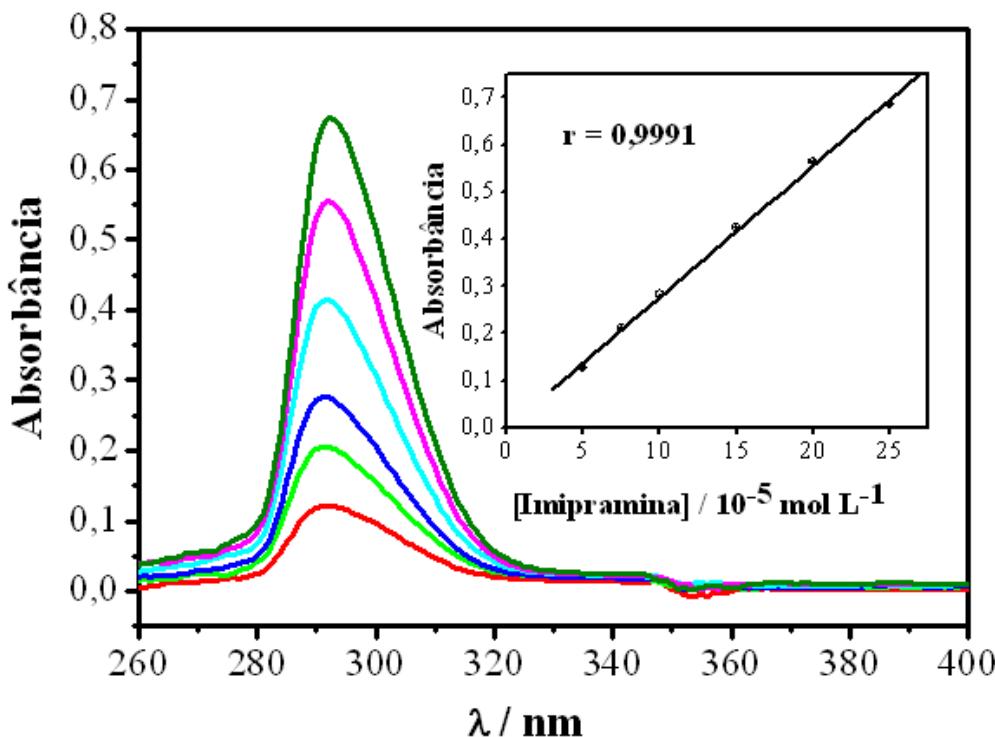


Figura 28. Espectros de absorção no UV-Vis para o padrão de imipramina em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 7,4) no intervalo de concentração: $5,00 \times 10^{-5}$ a $2,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Inserção: Curva analítica para imipramina obtida a partir dos espectros de UV-Vis.

A partir da curva analítica obtida e baseando-se na Lei de Beer, no intervalo de concentração utilizado, aplicou-se o mesmo procedimento utilizado na metodologia eletroanalítica desenvolvida para obter a equação da reta, o coeficiente de correlação (r), os

limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), a repetibilidade e a reproducibilidade, para o método padrão. Os resultados estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8. Figuras de mérito obtidas para a imipramina com a metodologia padrão da farmacopéia utilizando espectroscopia de absorção no UV-Vis.

Parâmetros	Resultados obtidos
Equação da reta	Abs = $-0,0016 \pm 0,0035 + 2789,75 \pm 11,76$ [IMIPRAMINA]
r	0,9991
S_b	0,00136
LD (mol L⁻¹)	$1,46 \times 10^{-6}$ (462,67 µg L ⁻¹)
LQ (mol L⁻¹)	$4,81 \times 10^{-6}$ (1543,3 µg L ⁻¹)
RSD (Repetibilidade)	0,54% (n = 10)
RSD (Reprodutibilidade)	0,33% (n = 5)

Os limites de detecção e de quantificação obtidos pelo método do padrão apresentaram-se bem maiores, da ordem de 100 e 10 vezes, respectivamente, que os obtidos pela metodologia eletroanalítica, mostrando que a metodologia eletroanalítica desenvolvida pode ser perfeitamente utilizada para determinações do fármaco em concentrações mais baixas que as obtidas pela técnica de espectrometria de absorção no UV-Vis.

Posteriormente, realizaram-se testes de recuperação com o padrão em eletrólito e com as Formulações A e B. No entanto, não foi possível realizar os testes com êxito para a Formulação B já que se observou interferências na banda de absorção correspondente à imipramina o que levou a valores muito altos e discrepantes nos percentuais de recuperação. Isto se deve provavelmente a influência do pamoato (contra-íon presente na Formulação B).

Além disso, as farmacopéias apresentam método padrão apenas para formulações contendo cloridrato de imipramina não sendo, portanto, encontrado referências para formulações contendo o pamoato de imipramina. Os resultados obtidos nas Formulações A e B e do padrão em eletrólito são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados obtidos para as curvas de recuperação em UV-Vis para a imipramina em eletrólito e utilizando-se as Formulações A (cloridrato de imipramina) e B (pamoato de imipramina).

Quantidade presente na formulação	Eletrólito	Formulação A	Formulação B
Adicionada	$9,11 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	$9,11 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	$9,11 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹
Detectada	$9,70 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	$1,02 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	$1,31 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹
Recuperação%	106,6%	111,9%	143,4%
RSD%	0,21%	3,27%	0,09%
BIAS%	6,48%	11,96%	43,71%

Com a finalidade de avaliar se a metodologia eletroanalítica desenvolvida é mais precisa que a metodologia padrão recomendada pela farmacopéia para a formulação comercial contendo cloridrato de imipramina, realizou-se o teste F mono-caudal. Para tanto, efetuou-se os cálculos por meio da equação 10 [31]:

$$F_{\text{calc}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{equação 10})$$

onde s_1^2 e s_2^2 representam a variância para as duas metodologias e F_{calc} é o valor calculado utilizado como parâmetro comparativo para se avaliar a precisão entre duas metodologias baseado em valores tabelados que dependem do tamanho de ambas amostras (n) e do nível de significância.

Posteriormente, a fim de se avaliar a relação entre a exatidão na aplicação da metodologia eletroanalítica desenvolvida com a metodologia padrão recomendada pela farmacopéia, realizou-se o teste t-pareado. Para isso, efetuaram-se os cálculos por meio da equação 11 [31]:

$$t_{\text{calc}} = \frac{d\sqrt{n}}{s_d} \quad (\text{equação 11})$$

onde d é a diferença das médias obtidas por cada metodologia, s_d é o desvio padrão da diferença entre as médias, n é o número de medidas realizadas e t_{calc} representa o valor calculado para fins comparativos com os valores tabelados em $n-1$ graus de liberdade. Os

resultados obtidos para a média das triplicatas e com limite de confiança de 95% para os dois testes estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 10. Valores encontrados no teste F e t-pareado comparando os resultados de recuperação obtidos entre a metodologia eletroanalítica desenvolvida e a padrão recomendada pela Farmacopéia Britânica.

	Valor Calculado	Valor Tabelado
Teste F	81,84	19,00
Teste t-pareado	1,80	4,30

Pelo teste F mono-caudal realizado, considera-se como hipótese nula que as variâncias das metodologias são iguais e que, portanto, apresentam a mesma precisão. No entanto, o valor calculado de F excede o valor crítico tabelado implicando que a hipótese nula é falsa. Logo, a variância do método padrão é significantemente maior que a do método desenvolvido, de modo que a metodologia eletroanalítica desenvolvida apresentou-se como mais precisa.

Já para o teste t-pareado, adota-se como hipótese nula que não há diferença considerável entre as médias de concentrações obtidas pelos dois métodos e, portanto, apresentam a mesma exatidão. Realizando-se os cálculos obteve-se um t_{calc} menor que o valor tabelado implicando que a hipótese nula é verdadeira. Dessa forma, conclui-se que a metodologia desenvolvida se apresentou com exatidão semelhante à metodologia padrão adotada pela farmacopéia.

5. CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a viabilidade do emprego do eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação de imipramina em formulações comerciais utilizando a voltametria de onda quadrada.

Nos estudos para a otimização dos parâmetros experimentais obteve-se as melhores condições em solução Britton-Robbinson (BR) 0,04 mol L⁻¹ e pH 7,4. Os parâmetros da VOQ que propiciaram a melhor resposta eletroquímica e perfil voltamétrico foram: frequência de aplicação de pulsos de potencial (*f*) de 100 s⁻¹, amplitude de pulso de potencial (*a*) de 50 mV e incremento de varredura de potencial (ΔE_s) igual a 2 mV.

Sob condições otimizadas, obteve-se a curva analítica com faixa linear de concentração entre $1,73 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $2,53 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (*r* = 0,9984) com limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) iguais a $4,35 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $1,45 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente. A precisão da metodologia, avaliada por meio de medidas de repetibilidade e de reproduzibilidade, apresentou percentuais de desvio padrão relativo (RSD%) 2,27% e de 2,07%, respectivamente.

Pelas curvas de recuperação aplicadas em duas formulações farmacêuticas comerciais obtiveram-se valores de taxa de recuperação de 95,5% e 84,6%, apresentando-se dentro da faixa aceitável para metodologias analíticas. Também se observou indício de boa seletividade por meio da semelhança entre as inclinações das curvas de recuperação.

Ensaios realizados por UV-Vis, técnica recomendada pela Farmacopéia Britânica para determinação de cloridrato de imipramina, apresentou LD e LQ de $1,46 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $4,81 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, nesta ordem. Valores estes cerca de 100 e 10 vezes maiores que os obtidos, respectivamente, pela metodologia eletroanalítica proposta.

Pelos testes de recuperação com as formulações comerciais realizados com UV-Vis, a Formulação B contendo pamoato de imipramina apresentou interferente possivelmente causado pela presença do contra-íon pamoato. Em contrapartida, os testes com a Formulação A contendo cloridrato de imipramina apresentaram resultados satisfatórios, com percentual de recuperação médio de 111,9% e RSD% de 3,27%. Por meio de teste F mono-caudal e teste t-pareado realizou-se a comparação entre a precisão e a exatidão para a recuperação obtida com a mesma formulação comercial, utilizando a metodologia eletroanalítica desenvolvida. Os testes indicaram maior precisão para a metodologia desenvolvida e exatidão semelhante com a metodologia padrão recomendada pela farmacopéia.

Diante dos resultados obtidos, a metodologia eletroanalítica desenvolvida utilizando EDDB e VOQ se apresentou promissora para a determinação de imipramina em formulações farmacêuticas comerciais, satisfazendo os objetivos desse trabalho. Além disso a metodologia proposta também apresenta vantagens como baixo custo e curto tempo de análise.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CANTÚ, M. D., HILLEBRAND, S., QUEIROZ, M.E.C. *Journal of Chromatography B*. 2004, Vol. 799, pp. 127 - 132.
- [2] SUSSMAN, N. e STAHL, S. *The American Journal of Medicine*. 1996, Vol. 101, pp. 26S - 36S.
- [3] GARERI, P., FALCONI, U. e FAZIO DE, P. *Progress in Neurobiology*. 2000, Vol. 61, pp. 353 - 396.
- [4] BRUNTON, L. L., LAZO, J. S., PARKER, K. L.. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007.
- [5] <http://revistagalileu.globo.com/Galileu/0,6993,ECT917102-1940-7,00.html>, **acesso em 02 de dezembro de 2009**.
- [6] FOYE, W. O., LEMKE, T. L., WILLIAMS, D. A. *Principles of Medicinal Chemistry*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 4, ed., 1995.
- [7] YOO, S. D., HOLLADAY, J.W., FINCHER., T.K. *Journal of Chromatography B*. 1995, Vol. 668, pp. 338 - 342.
- [8] CHEN, A.G., WING., Y.K., CHIU, H. *Journal of Chromatography B*. 1997, Vol. 693, pp. 153-158.
- [9] REECE, P.A., ZACEST, R. e BARROW, C.G. *Journal of Chromatography*. 1979, Vol. 163, pp. 310-314.
- [10] BAILEY, D.N. e JATLOW, P.I. *Clinical Chemistry*. 1976, Vol. 22, pp. 1697-1701.
- [11] MASON, P.A., ROWAN, K.M., MOFFAT, A.C. *Analyst*. 1984, Vol. 109, pp. 1213-1215.

- [12] BIRLOY, I., BENGI, U. e KUÇUKYAVUZ, Z. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1996, Vol. 15, pp. 371-381.
- [13] FERANCOVÁ, A., KORGOVÁ, E., KUTNER, W. *Analytical Chimica Acta*. 2001, Vol. 447, pp. 47-54.
- [14] IVANDINI, T.A., SARADA, B.V., TERASHIMA, C. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2002, Vol. 521, pp. 117-126.
- [15] FRANK, S.N., BARD, A.J. e LEDWITH, A. *Journal of Electrochemistry Society*. 1975, Vol. 122, pp. 898-904.
- [16] GHOROGHCHIAN, J., MENGHANI, M. e SALAHUDDIN, K. *Microchemical Journal*. 1992, Vol. 45, pp. 62-67.
- [17] TOLEDO, R.A., SANTOS, M.C., SILVA, A.B.F. *Analytical Letters*. 2006, Vol. 39, pp. 507-520.
- [18] NOROUZI, P., GANJALI, M.R., AKBARY-ADERGANY B. *Acta Chimica Slovenica*. 2006, Vol. 53, pp. 499-505.
- [19] BISHOP, E., HUSSEIN, W. *Analyst*. 1984, Vol. 109, pp. 73-80.
- [20] BRITTON, H. T. K.; ROBINSON, R. A., *Journal Chemistry Society*, 1931, pp.1456.
- [21] SUFFREDINI, H. B., PEDROSA, V.A., CODOGNOTO, L., MACHADO, S.A.S., ROCHA-FILHO, R., AVACA, L.A. *Electrochimica Acta*. 2004, Vol.49, pp 4021-4026.
- [22] SALAZAR-BANDA, G.R., ANDRADE, L.S., NASCENTE, P.A.P., PIZANI, P.S., ROCHA-FILHO, R.C., AVACA, L.A. *Electrochimica Acta*. 2006, Vol. 51, pp. 4612-4619.
- [23] *British Pharmacopoeia*, HMSO: London, 2005.
- [24] GOSSER, D.K.J. *Cyclic Voltammetry – Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*. New York: Wyley, 1994.

- [25] NEUDECK, A., MARKEN, F. e COMPTON, R.G. *Electroanalysis*. 1999, Vol. 11, pp. 1149 - 1154.
- [26] BRETT, A.M.O. e BRETT, C.M.A. *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*. Coimbra: Almedina, 1996.
- [27] WOPSCHALL, R.H. e SHAIN, I. *Analytical Chemistry*. 1967, Vol. 39, pp. 1514–1527.
- [28] LOVRIC, M., KOMORSKY-LOVRIC, S., MIRCESKI, V. *Square-Wave Voltammetry – Theory and Application*. Republic Macedonia: Springer, 2007.
- [29] SOUZA, D. Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica visando a aplicação de ultramicroeletrodos na análise de pesticidas. *Tese (Doutorado)*. Universidade de São Paulo, USP, 2004.
- [30] SOUZA, D., MACHADO, S.A.S. e AVACA, L.A. *Química Nova*. 2003, Vol. 26, pp. 81-89.
- [31] MILLER, J.N., MILLER, J.C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Madrid: Prentice Hall, 4. Ed., 2000.
- [32] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, RE nº 899, de 29/05/2003.
- [33] LEITE, F. *Validação em Análise Química*. Campinas: Editora Átomo. 3^a Ed. 1998.
- [34] CURRIE, A.L. *Pure And Applied Chemistry*. 1995, Vol. 67, pp. 1699-1723.
- [35] PRICHARD, E., BARWICK, V. *Quality Assurance in Analytical Chemistry - ANTS*. British: Wiley. 2007.
- [36] THOMPSON, M., ELLISON, S.L.R., WOOD, R. *Pure And Applied Chemistry*. 2002, Vol. 74, pp. 835-855.

- [37] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). *Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*. DOQ-CGCRC-008, junho/2007.
- [38] Asociación Española de Farmacéuticos de La Industria (AEFI). *Validación de Métodos Analíticos*. 2001.
- [39] HARRIS, D. C.; *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC. 5. Ed. 2001.
- [40] WESTGARD, J. O. *Basic Method Validation*. Westgard Quality Corporation, 1999.
- [41] HARVEY, D. *Modern Analytical Chemistry*. New York: McGraw-Hill. 1. Ed. 2000.