

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INORGÂNICA

**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE NITROFURANTOÍNA
(NFT) EM FÁRMACO E EM FLUIDO BIOLÓGICO UTILIZANDO
ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Rafael Ribeiro Portela

**Dissertação de Mestrado submetida à
Comissão julgadora do Curso de Pós-
Graduação em Química Inorgânica da
Universidade Federal do Ceará, como um
dos requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Química Inorgânica**

Orientador: Prof. Pedro de Lima Neto

Fortaleza/Ceará

2008

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários á obtenção do grau de mestre em química inorgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se á disposição dos interessados.

Rafael Ribeiro Portela

Dissertação aprovada em:

Dr. Pedro de Lima Neto
Orientador-UFC

Dr. Murilo Sergio da Silva Julião
(UVA)

Dr. Adriana Nunes Correia
(UFC)

Dedico este trabalho a minha Mãe...

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e pela força espiritual que me conduz.

A minha mãe, Ana Maria, meu grande exemplo de vida e força, o que me faz nunca desistir de lutar.

A toda minha família, pela presença e apoio as minhas escolhas,

A UFC, pela possibilidade de realização deste curso.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido.

Ao professor Pedro de Lima Neto, pela orientação neste trabalho e por todos os ensinamentos passados ao longo desses anos em que trabalhamos juntos.

Aos professores Murilo Sergio da Silva Julião, Adriana Nunes Correia, Elisane Longhinotti e Luiz Constantino pela ajuda e contribuição para que este trabalho fosse concluído.

Ao grupo de eletroquímica, pela grande amizade, cumplicidade e parceria de todos, sempre dando incentivo e apoio nas horas mais difíceis de toda minha jornada acadêmica.

E a todas as pessoas que, de alguma forma contribuíram para minha caminhada tornando possível a conclusão de mais essa etapa de minha vida.

Sumário

1) INTRODUÇÃO.....	1
1.1) Aspectos gerais	1
1.2) Aspectos teóricos	4
1.2.1) Voltametria	4
1.2.2) Voltametria de Onda Quadrada	5
1.3) Estado da Arte.....	9
1.3.1) Nitrofurantóina.....	9
1.3.2) Eletrodo de diamante	13
2) OBJETIVO GERAL	18
3) METODOLOGIA EXPERIMENTAL	19
3.1) Preparo das soluções	19
3.2) Instrumentação.....	20
3.3) Caracterização morfológica dos filmes de diamante	21
3.4) Preparação dos eletrodos de diamante dopado com boro	21
3.5) Condicionamento da superfície eletródica	22
3.6) Medidas eletroquímicas.....	23
3.6.1) Estimativa da área ativa do EDDB usando voltametria cíclica	23
3.6.2) Procedimento para verificação do comportamento voltamétrico da NFT em EDDB a diferentes valores de pHs.....	24
3.6.3) Procedimento para a otimização dos parâmetros operacionais da voltametria de onda quadrada (VOQ)	24
3.6.4) Procedimento para a construção da curva analítica para a NFT	25
3.6.5) Procedimento para a construção da curva de recuperação da NFT em eletrólito de suporte.....	25
3.7) Procedimento para a validação do método proposto a partir da espectrofotometria UV-Vis	26
3.8) Procedimento para aplicação da metodologia proposta em fluido biológico.....	26

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1) Caracterização física dos filmes de diamante.....	27
4.1.1) Medida da resistividade elétrica dos filmes.....	27
4.1.2) Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	28
4.1.3) Espectroscopia de espalhamento Raman.....	29
4.2) Cálculo da área eletroativa dos eletrodos.....	30
4.3) Estudo do comportamento eletroquímico da NFT em EDDB para diferentes pHs.....	32
4.4) Estudo dos parâmetros operacionais da voltametria de onda quadrada (VOQ).....	36
4.4.1) Influência da frequência de pulso.....	36
4.4.2) Influência da amplitude de pulso.....	39
4.4.3) Influência do incremento de varredura.....	41
4.5) Obtenção da curva analítica para a NFT.....	43
4.6) Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	47
4.7) Curva de recuperação da NFT em eletrólito de suporte.....	49
4.8) Comparação da técnica por medidas de UV-Vis.....	52
4.9) Aplicação da metodologia proposta em fluido biológico.....	54
5) CONCLUSÕES.....	57
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química da nitrofurantoína.	3
Figura 2: Forma de aplicação do potencial de onda quadrada.	6
Figura 3: Esquema representativo para processo reversível e irreversível.	7
Figura 4: Desenho esquemática da célula eletroquímica utilizada para as medidas de voltametria cíclica e onda quadrada.	20
Figura 5: Desenho esquemático do eletrodo construído com o filme de diamante dopado com boro.	22
Figura 6: Valores de densidade de portadores de carga (aceitadores –boro) em filmes de diamante em função da adição de boro no crescimento de diamante dopado.	27
A Figura 6 apresenta a resistividade dos filmes de diamante em função do teor de boro.	27
Figura 7. Imagens MEV dos filmes de diamante crescidos sobre o silício com nível de dopagem: a) 5000 ppm de B/C. b) 10000 ppm de B/C. c) 20000 ppm de B/C.	28
Figura 8. Espectros Raman para filmes de diamante crescidos sobre silício. a) 5000 ppm de boro. b) 10000 ppm. c) 20000 ppm de boro.	29
Figura 9: Voltamogramas cíclicos registrados em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl em EDDDB. Condições experimentais: $E_{\text{inicial}} = -0,7 \text{ V}$; $E_{\lambda 1} = +1,0 \text{ V}$. $E_{\text{final}} = -0,7 \text{ V}$. Faixa de velocidade de varredura: $0,050 \text{ V} \leq v \leq 0,70 \text{ Vs}^{-1}$	30
Figura 10: Variação de I_{pa} como função de $v^{1/2}$ plotada a partir dos dados obtidos na figura 7.	32
Figura 11: Voltametria cíclica característica de NFT $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,4 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo com 5000 ppm de boro.	33
Figura 12: Voltametria cíclica característica de NFT $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,4 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo com 10000 ppm de boro.	34
Figura 13: Voltametria cíclica característica de NFT $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,4 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo com 20000 ppm de boro.	35
Figura 14: a) Voltamogramas de onda quadrada para as frequências de 10 a 100 mV. b) Influência do aumento da frequência na resposta de corrente voltamétrica para os eletrodos com 10000 e 20000 ppm de boro.	38

Figura 15: a) Voltamogramas de onda quadrada para as amplitudes de 10 a 80 mV. b) Influência do aumento da amplitude na resposta de corrente voltamétrica para os eletrodos com 10000 e 20000 ppm de boro.....	40
Figura 16: a) Voltamogramas de onda quadrada para os incrementos de varredura de 1 a 7 mV. b) Influência do aumento da amplitude na resposta de corrente voltamétrica para os eletrodos com 10000 e 20000 ppm de boro.	42
Figura 17: Voltamogramas de onda quadrada para adições sucessivas de NFT em tampão BR pH 4,0 no intervalo de concentrações: 4,97 a 56,6 x 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ . Inserção: Curva analítica traçada a partir dos voltamogramas de onda quadrada para a NFT em eletrodo de diamante dopado com 10000ppm de boro.	44
Figura 18: Voltamogramas de onda quadrada para adições sucessivas de NFT em tampão BR pH 4,0 no intervalo de concentrações: 4,97 a 56,6 x 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ . Inserção: Curva analítica traçada a partir dos voltamogramas de onda quadrada para a NFT em eletrodo de diamante dopado com 20000ppm de boro.	45
Figura 19: Superposição das curvas analíticas referentes aos eletrodos com 10000ppm e 20000ppm de boro.	46
Figura 20: a) Voltamogramas de onda quadrada para adições sucessivas da solução da amostra comercial de NFT em tampão BR pH 4,0. b) Curva de recuperação traçada a partir dos voltamogramas de onda quadrada para a NFT em eletrodo de diamante dopado com 10000 ppm de boro.....	50
Figura 21: a) Voltamogramas de onda quadrada para adições sucessivas da solução da amostra comercial de NFT em tampão BR pH 4,0. b) Curva de recuperação traçada a partir dos voltamogramas de onda quadrada para a NFT em eletrodo de diamante dopado com 20000 ppm de boro.....	51
Figura 22: Espectros de UV-Vis para a NFT em tampão BR pH 4,0 no intervalo de concentração: 10 ⁻⁶ a 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ . Inserção: Curva de calibração para nitrofurantoina obtida a partir dos espectros de UV-Vis.....	53
Figura 23: Voltamogramas de onda quadrada referentes à amostra de urina dopada com NFT. Inserção: Curva de recuperação em urina humana obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada.....	55

Lista de Tabelas

Tabela 1: Resultados referentes à curva analítica da nitrofurantoina em eletrodo de diamante dopado com 10000ppm e 20000 ppm de boro.	48
Tabela 2: Valores de recuperação em eletrólito utilizando os eletrodos com 10000 ppm e 20000 ppm de boro.....	52
Tabela 3: Valores referentes à curva de calibração obtida pela técnica de UV-Vis.....	54

Resumo

Este trabalho apresenta o estudo da quantificação de nitrofurantoina (NFT) utilizando os filmes de diamante dopados com boro como material eletrodico. Estudos preliminares utilizando voltametria cíclica (VC) mostraram que o mecanismo de redução da nitrofurantoina (NFT) envolve adsorção e é influenciado pelo pH, o nível de dopagem de boro no eletrodo de diamante também influencia na redução da NFT. Eletrodos de diamante com 5000, 10000 e 20000 ppm de dopagem de boro foram utilizados no estudo e os pHs: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 foram investigados para se obter a melhor condição experimental. Os resultados experimentais obtidos em tampão Britton-Robinson utilizando voltametria de onda quadrada mostraram apenas um processo totalmente irreversível para a NFT em aproximadamente $-0,35\text{ V vs. Ag/AgCl/Cl}^- 3,0\text{ mol L}^{-1}$, o pico mostrou-se dependente do pH do meio e dos parâmetros voltamétricos. As melhores respostas voltamétricas foram obtidas em tampão Britton-Robinson pH 4 nas seguintes condições experimentais: frequência de 80 e 100 Hz, amplitude 40 e 60 mV; degrau de potencial de 4 mV, para os filmes com 10000 e 20000 ppm respectivamente. A partir dessas condições, foram obtidas curvas analíticas na faixa de concentração de $4,97 \times 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$ a $56,6 \times 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$ e calculados os limites de detecção e quantificação para a NFT que foi de $2,69 \times 10^{-8}\text{ mol L}^{-1}$ e $8,96 \times 10^{-8}\text{ mol L}^{-1}$ para o eletrodo com 20000 ppm de dopagem de boro. A aplicabilidade da metodologia foi avaliada em formulação farmacêutica e em urina humana. As porcentagens médias de recuperação de NFT foram iguais a: $95,52 \pm 2,78$ e $96,78 \pm 1,88$ para os filmes com 10000 e 20000 ppm, respectivamente. EDDB apresentaram bons resultados para quantificação de NFT por redução eletroquímica.

Abstract

This work presents the electroanalytical study for the quantification of nitrofurantoin (NFT) using the boron doped diamond (BDD) films as electrodic material. Preliminary studies using cyclic voltammetry (CV) showed that the electrochemical reduction mechanism of the nitrofurantoin (NFT) involves adsorption and was influenced by pH and by the level of boron doping in the diamond film. BDD electrodes with 5000, 10000 and 20000 ppm of boron doping were used and the pH: 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 were investigated to obtain the best experimental conditions. The experimental results obtained in Britton-Robinson buffer using square wave voltammetry showed only a totally irreversible process for the NFT in approximately -0.35 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ 3.0 mol L⁻¹. The peak presents dependence with the pH and voltammetric parameters. The best voltammetric responses were obtained in Britton-Robinson buffer at pH 4 with the following experimental conditions; frequency of 80 and 100 Hz, increment of 40 and 60 mV; potential step of 4 mV. In these conditions, the curves were obtained in the range of analytical concentration between 4.97×10^{-7} mol L⁻¹ to 56.6×10^{-7} mol L⁻¹ and calculated detection and quantification limits for the NFT which were of 8.96×10^{-8} mol L⁻¹ and 2.69×10^{-8} mol L⁻¹, respectively, for the electrodes with 20000 ppm of boron doping. The applicability of the methodology was evaluated in pharmaceutical formulation and human urine. The average percentages of recovery of NFT were: $95,52 \pm 2,75$ and $96,78 \pm 1,88$ for films with 10000 and 20000 ppm, respectively. EDDB showed good results for quantification of NFT by electrochemical reduction. The electrode with 20000 ppm of boron doping presents the best electroanalytical answer, showing the minor detection and quantification limited.

1) Introdução

1.1) Aspectos gerais

As técnicas eletroquímicas estão se difundindo cada vez mais como ferramenta de trabalho em diversas áreas de estudo, sendo uma delas a biológica. Sua aplicação se dá tanto no âmbito do desenvolvimento de metodologias de análise, como no estudo de mecanismos de ação de drogas farmacêuticas^{1,2}.

Por se basear nas reações que ocorrem na interface eletrodo-solução, as técnicas eletroquímicas podem apresentar limitações quando se trabalha com eletrodos sólidos, devido ao envenenamento da superfície eletródica causada pela adsorção de compostos constituintes das soluções de análise ou de produtos das reações redox na superfície do eletrodo no momento da análise, resultando, assim, em perda de sensibilidade e reprodutibilidade da medida eletroquímica³⁻⁶. Renovar a superfície do eletrodo por polimento não é difícil, mas a mudança na área ativa do eletrodo é inevitável e, vindo por esse aspecto, parece ser impossível substituir o eletrodo gotejante de mercúrio (EGM).

De um modo geral, os eletrodos sólidos como: eletrodo de carbono vítreo, pasta de carbono, grafite pirolítico, ouro e platina, apresentam problemas de adsorção, limitando a região de potencial de trabalho e aumentando os níveis de corrente residual.

O eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) surge como uma alternativa aos materiais eletródicos utilizados em várias áreas de pesquisa. Suas características como: i) boa condutividade elétrica, ii) alta resistência térmica e química, iii) larga janela de potencial, iv) baixa corrente de fundo, v) boa resposta em meios aquosos e não

aquosos e vi) características de superfície hidrofóbica devido a terminações de hidrogênio na superfície, tornam-no um material ideal para estudos eletroquímicos⁶.

A hidrofobicidade, uma das características observadas, tem uma particular importância no desempenho eletroquímico do EDDB, por fornecer subsídio para esclarecer a cinética de transferência de elétrons entre um composto e a superfície do eletrodo, numa reação redox. A fraca adsorção da espécie, a ser analisada, à superfície do eletrodo pode favorecer para que a cinética de transferência eletrônica, entre o eletrodo e a espécie seja mais lenta, enquanto que compostos com uma maior interação têm uma cinética mais favorecida⁷.

Outras características inerentes à síntese dos filmes de diamante dopado com boro também são determinantes para sua resposta eletroquímica, entre elas, o tipo de carbono, sp^2 ou sp^3 , que compõe a microestrutura do filme e o nível de dopagem de cristais de boro em sua estrutura⁷⁻⁸.

Estudos eletroanalíticos mostram que o EDDB possui boa interação com nitro-radical aniônico, possibilitando, assim, sua detecção e quantificação, bem como o estudo de seu mecanismo redox⁹.

Tendo em vista as características físicas e químicas do EDDB e sua boa interação com compostos orgânicos promovida pelas terminações carbono hidrogênio do eletrodo, surge o interesse de se desenvolver um estudo eletroanalítico de nitrocompostos com propriedades farmacológicas, no intuito de criar uma metodologia de quantificação e elucidação do mecanismo de ação de fármacos.

A nitrofurantoína {1-(nitro-2-furfurilideno-amino-idantoína)}, cuja estrutura está mostrada na Figura 1, é um fármaco pertencente à classe dos nitrocompostos, sintetizado a partir do nitrofurano e muito utilizado no tratamento de doenças do trato

urinário. Dependendo de sua concentração no local da inflamação, este fármaco pode atuar como um bacteriostático ou bactericida¹⁰.

A nitrofurantoína é eficiente contra as bactérias em concentrações de 1 a 32 $\mu\text{g/mL}$; entretanto, o fármaco é parcialmente metabolizado, principalmente no fígado. Uma pequena fração do fármaco é reduzida formando aminonitrofurantoína e em 24h de 30 a 40% do medicamento é excretado de forma intacta e 1% na forma de aminonitrofurantoína¹⁰.

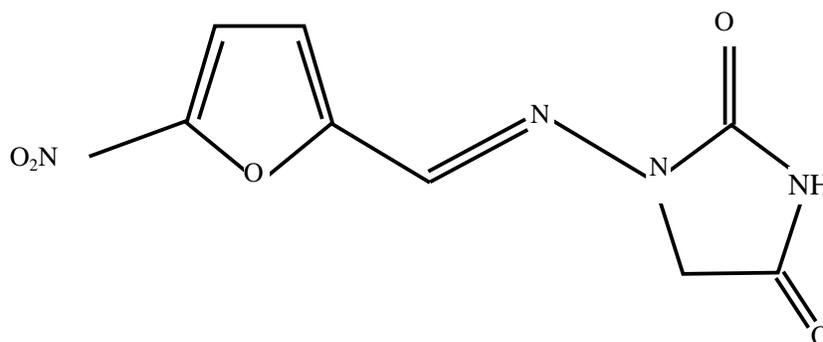


Figura1: Estrutura química da nitrofurantoína.

Adicionalmente estudos terapêuticos de fármacos têm exigido métodos de análise cada vez mais sensíveis para detecção e quantificação destes. A literatura retrata várias metodologias de determinação de fármacos por técnicas mais complexas e caras como: espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência¹¹⁻¹⁵ e análise por injeção em fluxo¹⁶⁻¹⁷.

Estes métodos se mostram pouco práticos, visto que exigem etapas de pré-tratamento e extração da amostra, que aumentam o custo do processo e demandam uma grande quantidade de tempo.

Em contra partida, as técnicas eletroanalíticas têm se mostrado com alto potencial para análise de compostos orgânicos levando em consideração a rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade, baixos limites de detecção e de quantificação e custo relativamente baixo em comparação com técnicas mais tradicionais.

1.2) Aspectos teóricos

1.2.1) Voltametria

As técnicas voltamétricas vêm ganhando, cada vez mais, importância para o cenário analítico nas mais diversas áreas da ciência: ambiental, médica, física e química.

A voltametria clássica apresenta inúmeras vantagens como, rapidez nas medidas, dispensar etapas de pré – tratamento, baixo custo relativo, além de ser uma técnica limpa, já que o principal reagente envolvido é o elétron. Com o grande desenvolvimento da tecnologia eletrônica foi possível desenvolver as técnicas de pulso, que possibilitaram uma grande diminuição dos limites de detecção e quantificação tornando as técnicas eletroanalíticas comparáveis às técnicas cromatográficas e espectrofotométricas¹⁸.

Dentre as técnicas eletroquímicas existentes, a voltametria de onda quadrada (VOQ) se mostra como a que apresenta o melhor desempenho eletroanalítico para determinação e quantificação de compostos.

1.2.2) Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma técnica de pulso onde a variação de potencial, em forma de escada de amplitude a (amplitude do pulso), largura ΔE_s (incremento de varredura) e duração de $2t$ (período) é o que caracteriza a técnica e proporciona seu melhor desempenho em relação às outras técnicas voltamétricas.

O alto desempenho da técnica está relacionado à forma de aplicação do potencial e aquisição da resposta de corrente. O potencial é aplicado em forma de ondas simétricas sobre uma rampa de potencial e a resposta de corrente é dada pela diferença das correntes diretas e reversa, esta forma de aplicação de potencial e leitura de corrente proporciona a técnica uma excelente sensibilidade baixa interferência de correntes capacitivas.

O sinal de corrente, em forma de onda simétrica, é dado pela resultante dos pulsos direto e reverso e após derivação é obtido um sinal de corrente resultante que possui características de alta sensibilidade e ausência de interferência de corrente capacitiva. Estas características tornam a VOQ a técnica voltamétrica mais sensível e rápida¹⁸.

Outra vantagem da VOQ em relação às demais técnicas voltamétricas são os modelos matemáticos desenvolvidos por Osteryoung e Lovric¹⁹, como critérios de diagnósticos para os processos redoxes das espécies eletroativas, que possibilitam o estudo de sistemas reversíveis, quase-reversíveis e irreversíveis, principalmente quando se estuda compostos orgânicos onde a adsorção de produtos e/ou reagentes e a

irreversibilidade do processo proporcionam um grau de complexidade maior ao sistema estudado^{18,20}.

Influência da reversibilidade do sistema

Quando o sistema é reversível (Figura 3a) e não sofre adsorção da espécie eletroativa na superfície do eletrodo a resposta de corrente é bem mais intensa que para sistemas onde ocorre adsorção, podendo chegar a ser até 5 vezes maior. Isso ocorre pelo fato que a corrente resultante vem da contribuição da corrente direta e reversa.

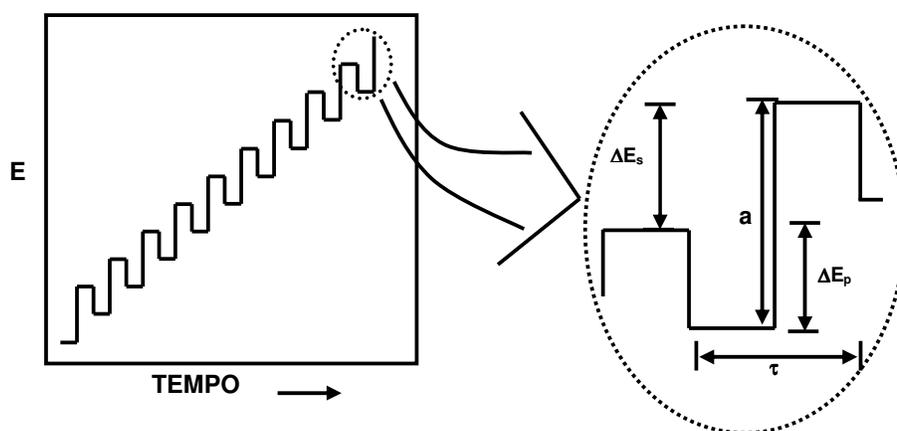


Figura 2: Forma de aplicação do potencial de onda quadrada.

$$I_t = I_d - I_r \quad (1)$$

Onde:

I_t : corrente total;

I_d : corrente direta;

I_r : corrente reversa.

Quando o sistema é irreversível a contribuição da corrente reversa é praticamente irrelevante e o sinal de corrente total não difere muito do sinal de corrente direto, como é mostrado na Figura 3b.

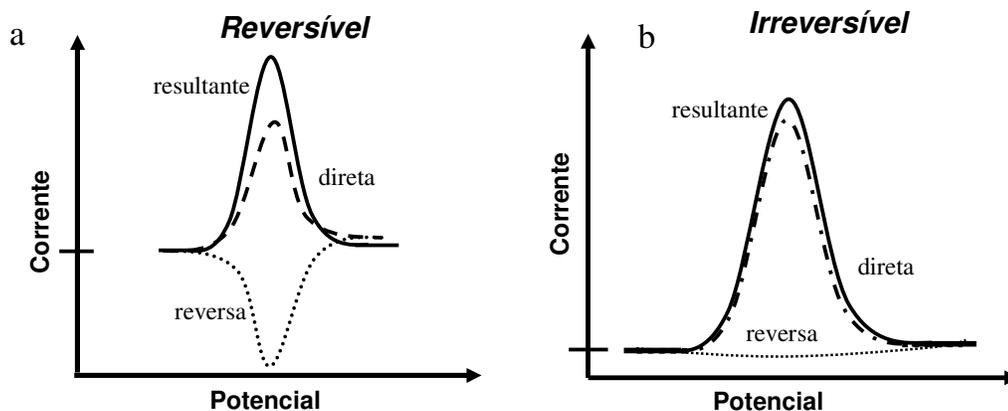


Figura 3: Esquema representativo para processo reversível e irreversível.

Influência dos parâmetros operacionais

Os parâmetros operacionais da voltametria de onda quadrada; frequência, amplitude, incremento de varredura, são de fundamental importância para o desempenho da técnica, influenciando diretamente na resposta de corrente total que se obtêm experimentalmente.

Para sistemas reversíveis a corrente de pico é diretamente proporcional a raiz quadrada da frequência de aplicação do pulso.

$$I_p = K_r f^{1/2} \quad (2)$$

Onde:

I_p = corrente de pico;

k_r = constante cinética;

$f^{1/2}$ = raiz quadrada da frequência.

Já para sistemas irreversíveis a corrente tem uma relação linear com a frequência aplicada.

$$I_p = K_r f \quad (3)$$

O aumento da frequência contribui para o aumento da sensibilidade da técnica, porém vale ressaltar que para valores muito altos, a frequência pode interferir na reversibilidade da reação, e assim, a relação passa ser exponencial, o que não é interessante para utilização analítica.

Um valor ideal de amplitude melhora a sensibilidade da técnica, sendo assim, deve ser investigado antes de qualquer metodologia, já que valores altos podem diminuir a sensibilidade da técnica por promover o alargamento do voltamograma.

Por último, o incremento de varredura também proporciona uma sensível melhora a VOQ devendo ser determinado seu valor ideal para cada sistema estudado, um valor alto acarreta em alargamento do voltamograma, e assim, perda de sensibilidade.

1.3) Estado da Arte

1.3.1) Nitrofurantoína

Com o avanço das pesquisas por compostos com propriedades farmacológicas mais eficazes é inevitável a necessidade de técnicas de análise mais sensíveis, seletivas, rápidas e de baixo custo. Diversas técnicas já permitem a detecção e quantificação de fármacos, quais sejam, os métodos ópticos (espectrofotometria), cromatográficos (cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC) e, mais recentemente os métodos eletroanalíticos (voltametria de pulso diferencial, voltametria de onde quadrada).

MOTTIER e colaboradores¹¹ estudaram, por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria, a determinação e quantificação de quatro nitrofuranos, sendo eles a furazolidona, a nitrofurantoína, a furaltadona e a nitrofurazona, em amostras de carne. O procedimento usava um catalisador ácido como veículo para liberação de proteína, seguido pela conversão *in situ* na amina derivada (2-nitrobenzaldeído, NBA), extração líquido – líquido numa fase polimérica sólida, monitoramento por ionização positiva de eletrospray (ESI) de três processos de transição em cada espécie em seguida a análise de LC-MS/MS. Os limites de detecção obtidos foram entre 0,11-0,21 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e o limite de quantificação entre 0,19-0,36 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. A validação do método em carne de frango foi feita segundo os critérios de análise de drogas veterinárias residuais em comida da União Européia (UE).

DÍAZ e colaboradores¹² também estudaram a determinação de três nitrofuranos; nitrofurantoína, furaltadona e furazolidona, mas em amostras de leite, utilizando HPLC

detecção coulométrica. As curvas hidrodinâmicas dos três compostos foram obtidas em eletrodo de grafite poroso a um potencial de -600 mV e foram estudadas outras variáveis, como a influência da velocidade de fluxo e a composição da fase móvel. A composição da fase móvel considerada ideal foi uma solução aquosa de acetonitrila 0,1 M, perclorato de sódio (28:72) com 0,5% de ácido acético glacial. A fase móvel foi desaerada por um fluxo de nitrogênio.

FINZI e colaboradores¹³ estudaram a detecção de nitrofuranos em carne de aves por HPLC já que o uso dos mesmos foi proibido pela União Européia. A metodologia utilizando LC-MS-MS permitiu determinar, simultaneamente, o metabólito de quatro nitrofuranos, nitrofurantoina, nitrofurazona, furazolidona e furaltadona. Um limite de quantificação de 0,5 ng g⁻¹ foi obtido.

LEITNER e colaboradores¹⁴ estudaram, utilizando o método de LC-MS-MS, a detecção de quatro nitrofuranos, furazolidona, furaltadona, nitrofurazona e a nitrofurantoína em tecido de músculo animal. Os autores concentraram e purificaram a amostra pelo método de extração em fase sólida (SPE) por poliestireno absorvente, combinado com um fluxo hidrolisado de proteínas metabolizadas das drogas. Limites de detecção de 0,5–5 ng g⁻¹ e limites de quantificação de 2,5–10 ng g⁻¹ são relatados no artigo.

MUTH e colaboradores¹⁵ estudaram a quantificação da nitrofurantoína em plasma e urina humana pela técnica de HPLC. O método envolveu a extração líquido-líquido da droga em fluxo de acetato de etila por evaporação e reconstituição em fase

móvel. Para a urina foi feito o simples processo de diluição em água pura. O limite de quantificação em plasma foi de $0,010 \mu\text{g ml}^{-1}$; em urina a nitrofurantoína pode ser quantificada abaixo de $0,380 \mu\text{g ml}^{-1}$. Os autores obtiveram regiões lineares, por curva de calibração, no intervalo de $2,48 - 0,0100 \mu\text{g/ml}$ em plasma e em urina no intervalo de $187 \mu\text{g ml}^{-1} - 0,380 \mu\text{g ml}^{-1}$). A validação do método foi feita de acordo com o protocolo do Good Laboratory Practice.

GHAWJI e FOGG¹⁶ estudaram a determinação de nitrofurantoína por redução em eletrodo de carbono vítreo, inicialmente mostraram que a reação de produção de oxigênio dificulta o pré tratamento de uma superfície de carbono vítreo recém polida quando o eletrodo é pré-tratado em solução $0,1 \text{ M}$ de ácido sulfúrico a $-2,7 \text{ V}$ por 1 min , porém uma baixa corrente de fundo é obtida, apenas $1 \mu\text{A}$, quando este foi tratado a um potencial de $-1,05 \text{ V}$ em um sistema de injeção em fluxo, após este pré tratamento o sinal de corrente obtido, quando injetado 100 cL de eletrólito não desoxigenado, foi de $0,02 \mu\text{A}$ em $-0,7 \text{ V}$. Este sinal de fundo limitou a determinação da nitrofurantoina a concentrações maiores que $2 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Em continuação ao trabalho anterior, FOGG e GHAWJI¹⁷ determinaram duas drogas: a nitrofurantoina e a acetazolamida. A nitrofurantoina foi determinada em concentrações de amostra entre $1-50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em um pH de solução tampão de $7,5$ e potencial de redução $-0,7 \text{ V}$. A acetazolamida foi determinada em concentrações de amostra entre $10 - 70 \mu\text{g mL}^{-1}$ em meio de ácido clorídrico $0,1$ e o potencial de redução $-0,85 \text{ V}$. O método mostrou-se ser simples e apresentou um coeficiente de variação de $1,9$ e $2,3 \%$ para $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de amostra de nitrofurantoína e acetazolamina em tablete.

MASON e SANDMANN²¹ obtiveram a redução da nitrofurantoína, em meio de urina, utilizando um eletrodo rotatório de platina. A determinação da droga na urina de pacientes clínicos foi avaliada e comparada a um método colorimétrico comumente usado. O método eletroquímico foi mais rápido e mais eficiente com precisão comparável ao método colorimétrico.

Por último, uma das técnicas eletroanalíticas mais usadas é a técnica de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ). HAMMAM²² estudou a determinação da nitrofurantoina em fluido biológico usando a VOQ com dissolução catódica adsortiva. Meio de tampão Britton-Robinson (pH 2-11) foi usado para investigar a redução do composto, que apresentou apenas um pico bem definido em eletrodo de gota pendente. Os meios biológicos usados foram o soro humano e a urina humana, com os parâmetros experimentais favoráveis à análise sendo: potencial de acumulação de -0,4 V (Ag/AgCl/KCl_{sat}), tempo de acumulação de 40 segundos, frequência de 120 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de varredura de 10 mV, obtidos em tampão Britton-Robinson pH 10. Obteve-se uma porcentagem média de recuperação de $100,68 \pm 0,17$ (n = 5) e um limite de detecção de $1,32 \times 10^{-10}$ M. A aplicabilidade da análise do fármaco em formulação farmacêutica, soro humano e urina humana foi estudada e as porcentagens médias de recuperação foram iguais a: $101,49 \pm 0,65$, $103,94 \pm 0,73$ e $101,98 \pm 0,52$ (n = 5), respectivamente. Limites de detecção iguais a $2,86 \times 10^{-10}$ e $5,77 \times 10^{-10}$ M de nitrofurantoína foram alcançados em soro e urina humana, respectivamente.

1.3.2 Eletrodo de diamante

Com o avanço nas técnicas eletroanalíticas, que permitiram limites de detecção e quantificação bem mais baixos, a pesquisa por materiais eletródicos mais eficientes passou a ser um dos principais temas no cenário eletroquímico, visto a sua importância para melhorar ainda mais o desempenho das técnicas desenvolvidas.

Dentre as mais recentes descobertas de matérias com aplicabilidade eletroanalítica, o eletrodo de diamante dopado com boro surgiu como uma excelente alternativa aos eletrodos convencionais.

Muitos estudos existem a respeito do seu desenvolvimento, caracterização e aplicação em estudos eletroquímicos.

Uma revisão foi publicada por SPITSYN e colaboradores²³, juntamente com um estado da arte e algumas propriedades do diamante produzido pelo método de deposição química a vapor (CVD). Novos métodos híbridos de síntese de diamante CVD permitiram um ganho de 1,2 a 6 vezes na taxa de crescimentos dos filmes de diamante em relação ao método CVD comum. Resultados mostraram a síntese de diamante dopado, utilizando o fósforo e o boro como elementos dopantes no curso do processo CVD, a incorporação desses elementos torna o filme de diamante condutor, o que possibilita sua utilização como material eletródico.

Em comparação com o processo de crescimento por alta pressão, o método CVD oferece um amplo leque de possibilidades da utilização do diamante na ciência e tecnologia. Com o desenvolvimento de novos métodos de crescimento as propriedades do diamante não foram apenas reproduzidas, mas puderam ser melhoradas.

SILVA e colaboradores²⁴ estudaram o crescimento de um filme de diamante dopado com boro pelo método CVD utilizando um substrato de silício como suporte para o crescimento do filme. Na preparação do filme foi utilizada uma mistura gasosa de 0,5 vol. % de metano, 1 vol. % de metanol e hidrogênio a uma pressão de 50 Torr. Óxido de boro dissolvido no metanol foi utilizado como elemento dopante durante o crescimento do filme de diamante. As técnicas de Espectroscopia Raman e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram utilizadas para caracterizar o filme depositado. Por Raman foi possível mostrar o aparecimento de uma banda referente ao boro, que aumentava com aumento de teor de boro, esse aumento de boro modificou a microestrutura dos filmes depositados, reduzindo o tamanho de grão, como pode ser visto por MEV.

SANTANA e colaboradores²⁵ investigaram a reação de evolução de oxigênio sobre a superfície do eletrodo de diamante. Eletrodos de diamante contendo carbono sp^2 em sua estrutura, quando submetidos a uma polarização anódica, é oxidado a CO. Essa modificação da estrutura do filme altera as propriedades do diamante aumentando o sobrepotencial para as reações de desprendimento de oxigênio e hidrogênio e conseqüentemente, um aumento da janela de potencial de trabalho.

SUFFREDINI e colaboradores²⁶ estudaram o efeito do pré-tratamento catódico na resposta eletroquímica do eletrodo de diamante dopado com boro. Voltamogramas cíclicos para sistemas bem conhecidos, como, $K_4Fe(CN)_6$ e ferroceno, mostraram uma sensível melhora na resposta de corrente quando feitos após um pré-tratamento catódico comparativamente com o pré-tratamento anódico. Estudos de impedância eletroquímica

mostraram que, quando feito um pré-tratamento catódico, a resistência associada a altas frequências diminui de 300 para aproximadamente $4 \Omega \text{ cm}^2$.

SALAZAR e colaboradores²⁷ caracterizaram a resposta eletroquímica do eletrodo de diamante dopado com boro imediatamente após um pré tratamento catódico e com o tempo de exposição a condições atmosféricas determinadas. Após esse pré-tratamento catódico, o EDDB apresentou uma mudança no comportamento eletroquímico, onde a resposta voltamétrica ao sistema ferrocianeto foi bem mais definida e reversível. Por espectroscopia Raman, foi possível mostrar que nenhuma mudança estrutural é acrescentada ao eletrodo, nem qualquer mudança na relação sp^2/sp^3 , mostrando a importância das terminações de hidrogênio para a resposta eletroquímica. As mudanças no comportamento eletroquímico do eletrodo refletem a progressiva diminuição na velocidade de transferência de elétrons devido à perda das terminações de hidrogênio por oxidação superficial pelo oxigênio do ar.

WANGFUENGGANAGUL e colaboradores²⁸ estudaram a aplicação do filme de diamante dopado com boro na detecção de paracetamol. Os estudos foram feitos em tampão fosfato pH 8 e as técnicas utilizadas no trabalho foram: voltametria cíclica e voltametria hidrodinâmica e injeção em fluxo com detecção amperométrica. Por voltametria cíclica os autores estudaram o comportamento da reação do paracetamol na superfície do eletrodo, bem como sua relação com a concentração do analito. O perfil voltamétrico do paracetamol em DDB foi comparado com seu perfil em eletrodo de carbono vítreo. Os dois materiais apresentaram voltamogramas semelhantes com picos bem resolvidos, contudo o sinal de corrente residual para o EDDB apresentou-se bem

menor que para o carbono vítreo. Os estudos por voltametria hidrodinâmica mostraram uma linearidade para a faixa de concentração de paracetamol entre 0,1 e 8 mM e um limite de detecção de 10 μ M. Nas análises de injeção em fluxo utilizando o EDDB foi obtida linearidade entre 0,5 e 50 μ M de concentração do analito e limite de detecção de 10 nM. Os resultados obtidos concordaram com valores de referência.

PARK e colaboradores²⁹ fizeram um estudo comparativo da determinação de catecolamina em microeletrodos de diamante e eletrodo de fibra de carbono. As medidas foram feitas antes e depois da exposição dos eletrodos a atmosfera do laboratório e ao tecido biológico. A sensibilidade ao sistema redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ também foi utilizada para avaliar a resposta eletroquímica dos eletrodos. O eletrodo de diamante apresentou uma corrente de fundo baixa, estável e independente do pH em uma ampla região de potencial, além de boa sensibilidade e reprodutibilidade para o composto estudado. Em contrapartida, o eletrodo de fibra de carbono apresentou corrente de fundo dependente do pH, devido à presença de grupos funcionais COO na superfície do eletrodo. De acordo com os resultados obtidos os autores mostraram que o eletrodo de diamante apresentou sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade eletroquímica para estudo em meio biológico complexo.

DA-SILVA JULIÃO e colaboradores⁹ estudaram a interação entre o radical RNO^\cdot e aceptores elétricos em meio aquoso utilizando eletrodo de diamante altamente dopado com boro (EDADB). O estudo foi feito com Nitrofurazona (NFZ) em meio aquoso na presença e ausência de glutathiona, L-cisteína e O_2 . Em presença de tiol a NFZ é diretamente reduzida a RNO – Tiol em um processo envolvendo dois elétrons e dois

prótons. O processo é catalítico e pode ser usado para determinar nitrofurantoína no intervalo de concentração de $9,9 \times 10^{-7}$ a $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em pH 8, com sensibilidade de $2,2 \times 10^6$ $\mu\text{A mol}^{-1} \text{cm}^{-2}$ e limite de determinação de nitrofurazona de $3,4 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A caracterização do processo de redução global da NFZ foi possível devido a características superficiais do EDADB que permitiram a estabilização do radical RNO_2^- .

2) Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é o de estabelecer um protocolo para a quantificação eletroanalítica da nitrofurantoína usando a voltametria de onda quadrada e o eletrodo de diamante dopado com boro. Objetiva-se ainda estudar o efeito da dopagem de boro e do pH na resposta eletroquímica deste composto. Finalmente, pretende-se comparar a metodologia desenvolvida com uma técnica padrão recomendada pela farmacopéia brasileira.

3) Metodologia Experimental

3.1) Preparo das soluções

As soluções estoques de tampão Britton-Robinson (BR) nos pHs 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 foram preparadas a partir da neutralização de uma solução constituída de H_3PO_4 , H_3CCOOH e H_3BO_3 (todos na concentração de $0,4 \text{ mol L}^{-1}$) com volume apropriado de solução de $\text{NaOH } 2 \text{ mol L}^{-1}$, de acordo com Britton & Roobinson³⁰. O pH final de cada solução foi medido utilizando-se um pHmetro Micronal[®], modelo B474, e eletrodo de vidro combinado Micronal[®].

A solução estoque de nitrofurantoína (NFT) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada por diluição direta de quantidade apropriada do reagente {1-(nitro-2-furfurilideno-amino-idantoína)} por meio de agitação em banho de ultra-som. A solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de NFT foi obtida a partir da diluição de 10 mL da solução de NFT $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ até um volume final de 100 mL de solução tampão BR do pH desejado para as medidas eletroquímicas. As soluções de NFT foram estocadas em frasco âmbar, para evitar degradação fotoquímica e armazenada em geladeira.

As amostras comerciais contendo 100 mg de NFT, Macrofantina[®] - Schering Plough, e outros ingredientes inativos (talco, lactose e amido) por cápsula foram adquiridas em drogarias da cidade de Fortaleza. Foram pesadas 10 cápsulas do medicamento e calculada a massa média de NFT por cápsula, o conteúdo foi homogeneizado e utilizado como estoque de acordo com as normas da Farmacopéia Brasileira. As soluções de amostra foram preparadas por meio da dissolução, em metanol, da quantidade apropriada do medicamento, nas mesmas concentrações da solução padrão.

Uma solução de ferrocianeto de potássio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte foi preparada e utilizada para o registro dos voltamogramas cíclicos necessários para a estimativa da área ativa do EDDB.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada obtida de um sistema Barnstead Nanopure[®]. Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções são de grau analítico.

3.2) Instrumentação

As mediadas voltamétricas foram registradas num potenciostato/galvanostato AUTOLAB, modelo PGSTAT 30, Eco-Chemie[®], acoplado a uma célula eletroquímica contendo sistema de três eletrodos: trabalho, referência e auxiliar, como apresentado na Figura 4. A aquisição e tratamento dos resultados foram efetuados com o auxílio do Software GPES versão 4.9.7.

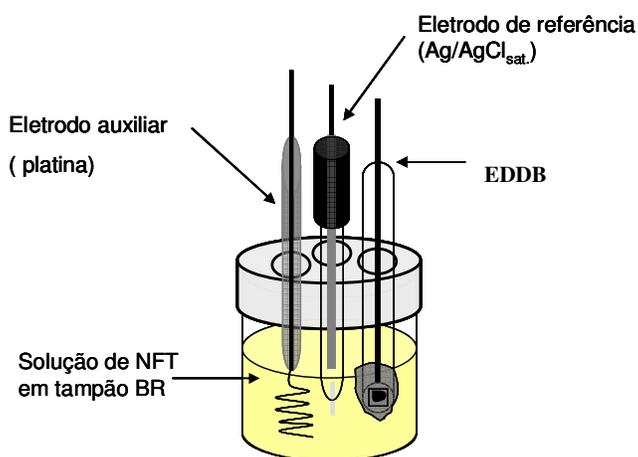


Figura 4: Desenho esquemática da célula eletroquímica utilizada para as medidas de voltametria cíclica e onda quadrada.

Para a diluição das amostras comerciais de NFT e/ou diluições sucessivas da solução padrão de NFT na célula eletroquímica foi utilizado um pipetador automático (Kacil) com volume variável de 100 a 1000 μL .

As medidas espectrofotométricas na região do UV-Visível foram realizadas num espectrofotômetro de feixe duplo, da marca Howlett-Packard modelo 8453 Diode Array, utilizando-se uma célula de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

Os espectros de espalhamento Raman foram obtidos usando um equipamento MicroRaman Sistema 2000 da Renishaw, no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) em São José dos Campos – SP.

3.3) Caracterização morfológica dos filmes de diamante

Os filmes de diamante dopado com boro foram produzidos no LAS do INPE.

A caracterização dos filmes de diamante dopados com boro foi feita por:

- Medida da resistividade elétrica dos filmes;
- Microscopia eletrônica de varredura;
- Espectroscopia de espalhamento Raman.

3.4) Preparação dos eletrodos de diamante dopado com boro

O EDDB foi montado em nosso laboratório a partir de filmes de diamante produzidos no INPE. Os eletrodos foram preparados a partir de filmes de diamante dopado com boro, crescidos sobre substrato de silício por deposição química em fase de

vapor (CVD) num reator de filamento quente^{31,32}. Os níveis de dopagem alcançados foram: $\pm 10^{19}$, $\pm 10^{20}$ e $\pm 10^{21}$ at. cm^{-3} (razão carbono / boro de 5000, 10000 e 20000 ppm, respectivamente). O eletrodo foi embutido em substrato de Teflon[®] de forma que apenas a face superior do filme ficasse exposta (Figura 5). O contato elétrico foi feito por uma haste de cobre ou latão, que fica em contato com a face inferior da base de silício e aderida por meio de cola condutora de prata. Em seguida, o eletrodo é coberto por uma cola especial de silicone inerte, com o intuito de isolar o filme, permitindo que apenas a superfície do EDDB fique exposta.

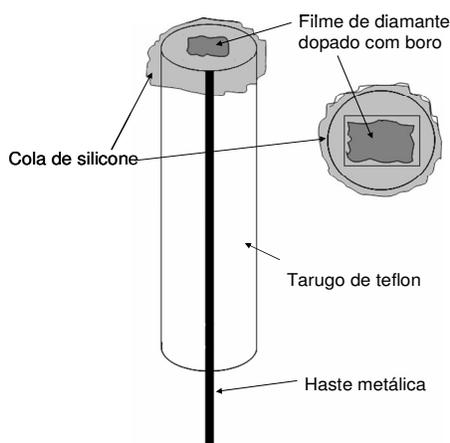


Figura 5: Desenho esquemático do eletrodo construído com o filme de diamante dopado com boro.

3.5) Condicionamento da superfície eletródica

As terminações de hidrogênio na superfície do eletrodo de diamante dopado com boro determinam muito de suas características, como hidrofobicidade e alta condutividade⁷, características importantes para sua aplicação em eletroquímica. Em contrapartida, terminações de oxigênio tornam a superfície hidrofílica e com baixa condutividade, o que dificulta a etapa de transferência de carga⁷.

Antes de cada experimento utilizando o EDDB, um procedimento de ativação da superfície eletródica foi feito com o intuito de limpar a superfície e melhorar o sinal eletroquímico do EDDB.

Em meio de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, o EDDB foi polarizado em aproximadamente 500 mA cm^{-2} anodicamente durante 3 minutos, em seguida lavado com água destilada e novamente polarizado em 500 mA cm^{-2} , agora catodicamente, durante 10 minutos.

Esse pré-tratamento elimina possíveis contaminações e regenera as ligações de hidrogênio na superfície eletródica, melhorando o desempenho do eletrodo de diamante para os estudos eletroquímicos.

3.6) Medidas eletroquímicas

3.6.1) Estimativa da área ativa do EDDB usando voltametria cíclica

Os EDDB previamente montados para as medidas voltamétricas apresentaram um tempo de vida útil limitado, possivelmente devido ao ataque da solução de trabalho, tampão BR, à borracha de silicone com efeito isolante, principalmente quando se utiliza pHs mais alcalinos. Devido a isto, no decorrer do trabalho, o eletrodo precisou ser reconstruído várias vezes e, levando em consideração que para cada eletrodo montado se tinha uma alteração na área ativa do mesmo, foi necessária a determinação da área efetiva do EDDB por medidas eletroquímicas.

Para tanto, 10 mL de solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados à célula eletroquímica e, em seguida, borbulhado N_2 por 5 minutos. Após este tempo foi registrado o voltamograma cíclico do branco. Após o registro do branco, em outra célula foram adicionados 10,0 mL de solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ferrocianeto de

potássio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte, borbulhado N_2 por 5 minutos e, em seguida, voltamogramas cíclicos foram registrados no intervalo $0,05 \leq v \leq 0,7 \text{ V s}^{-1}$. Antes de cada medida a solução era submetida à agitação magnética.

Nesta faixa de velocidade de varredura foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: $E_{\text{inicial}} = -0,75 \text{ V}$, $E_{\lambda 1} = +1,0 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,75 \text{ V}$.

3.6.2) Procedimento para verificação do comportamento voltamétrico da NFT em EDDB a diferentes valores de pHs

A partir da solução padrão de NFT $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, foram feitos testes preliminares de voltametria cíclica em pH 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 a fim de caracterizar o processo redox, bem como o pH mais adequado para o estudo da NFT sobre a superfície do EDDB. A voltametria cíclica foi utilizada por ser uma técnica rápida, capaz de fornecer inicialmente muitas informações a respeito da molécula estudada como: presença de adsorção, múltiplas reações de transferência de elétrons e reações químicas acopladas.

Os voltamogramas foram registrados na velocidade de $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Para os pHs de 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 foram utilizados os seguintes parâmetros experimentais: $E_{\text{inicial}} = 1,0 \text{ V}$, $E_{\lambda 1} = -0,8 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = 1,0 \text{ V}$.

3.6.3) Procedimento para a otimização dos parâmetros operacionais da voltametria de onda quadrada (VOQ)

Após prévia estabilização dos voltamogramas em 10 mL de solução do eletrólito suporte (tampão BR pH 4,0), 1000 μL da solução estoque $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NFT

foram adicionadas para registro dos voltamogramas de onda quadrada. Este procedimento foi utilizado para avaliar a influência dos parâmetros da VOQ: frequência (f), amplitude (a) e incremento de potencial (ΔE_s).

3.6.4) Procedimento para a construção da curva analítica para a NFT

As curvas analíticas foram obtidas a partir dos voltamogramas de onda quadrada registrados para 12 adições sucessivas de 50 μL da solução padrão de NFT $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ à célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão BR pH 4,0. As medidas eletroquímicas foram registradas em triplicata e os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir de 10 voltamogramas de onda quadrada registrados em eletrólito de suporte.

3.6.5) Procedimento para a construção da curva de recuperação da NFT em eletrólito de suporte

As curvas de recuperação foram obtidas a partir dos voltamogramas de onda quadrada registrados inicialmente para a mistura de 100 μL de solução de NFT $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a 10,0 mL de tampão BR pH 4,0 na célula eletroquímica e, em seguida, 5 adições sucessivas de 50 μL da solução padrão de NFT $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Foram construídas 3 curvas de recuperação para os eletrodos de diamante dopado com 10000 e 20000 ppm de boro.

3.7) Procedimento para a validação do método proposto a partir da espectrofotometria UV-Vis

A espectrofotometria UV-Vis foi utilizada para validar a metodologia proposta, por se tratar de uma técnica analítica padrão para quantificação de nitrocompostos.

Foi construída uma curva de calibração para a nitrofurantoína na faixa de concentração de 10^{-6} a 10^{-5} mol L⁻¹, utilizando-se curvas espectrofotométricas na região do visível ($\lambda = 368$ nm) nas mesmas condições propostas para a metodologia eletroanalítica. Posteriormente foram feitas medidas, em triplicata para solução de amostra comercial de NFT.

Assim como na VOQ, foram feitas 10 leituras espectrofotométricas para a amostra contendo apenas o tampão BR (branco) para determinação dos limites de detecção e de quantificação.

3.8) Procedimento para aplicação da metodologia proposta em fluido biológico

A metodologia proposta neste trabalho foi aplicada para a determinação de NFT em fluido biológico, utilizando-se para isto, urina humana como amostra. Uma alíquota de 1000 μ L de urina humana foi dopada com 100 μ L da solução padrão de NFT $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, homogeneizada em tubo de ensaio e protegido da luz. Desta solução amostra foi retirada uma alíquota de 100 μ L e adicionada à célula contendo 10 mL de tampão BR. Baseado nas respostas de I_p obtidas por meio da VOQ desta solução foi construída uma curva de recuperação para a NFT contida na amostra.

4) Resultados e Discussão

4.1) Caracterização física dos filmes de diamante

4.1.1) Medida da resistividade elétrica dos filmes

A dopagem de boro foi realizada por meio da adição de óxido de boro (B_2O_3) ao metanol (CH_3OH), quando o B_2O_3 é adicionado ao metanol, o trimetilborato ($(CH_3O)_3B$) é formado, sendo, provavelmente, a fonte de boro adicionada a fase gasosa de crescimento do filme de diamante.

Neste trabalho, foram utilizados três filmes de diamante com os seguintes níveis de dopagem: 5000 , 10000, 20000 ppm de B/C ²².

A Figura 6 apresenta a resistividade dos filmes de diamante em função do teor de boro.

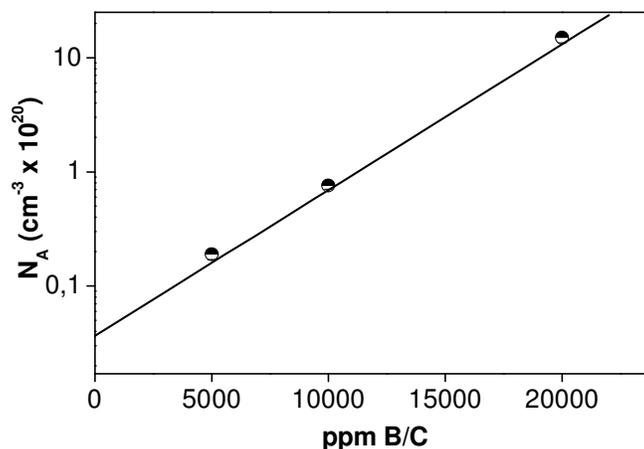


Figura 6: Valores de densidade de portadores de carga (aceitadores –boro) em filmes de diamante em função da adição de boro no crescimento de diamante dopado.

A resistividade destes filmes de diamante apresentou uma relação diretamente proporcional à razão boro/carbono, medida pelo método das quatro pontas e esteve entre $0,8 \times 10^{-2} \Omega \text{ cm}$ e $0,2 \times 10^{-2} \Omega \text{ cm}$.

4.1.2) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram feitas micrografias dos filmes de diamante com os níveis de dopagem de 5000, 10000 e 20000 ppm de B/C. A Figura 7 mostra as imagens de MEV dos filmes de diamante com diferentes níveis de dopagem.

Os filmes de diamante apresentaram uma pequena variação na morfologia superficial com o aumento do nível de dopagem. Observa-se um tamanho de grão de 2,7 μm para o filme com concentração de 5000 ppm de boro, 2,5 para o filme com 10000 ppm de boro e em torno de 1 μm para o filme com 20000 ppm de boro, mostrando que, com o aumento do teor de boro no filme, houve uma diminuição no tamanho dos grãos²³.

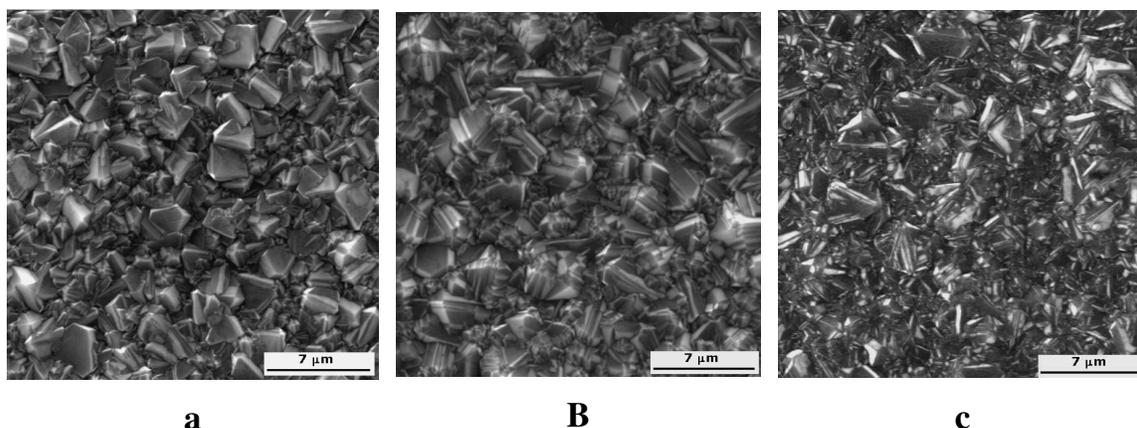


Figura 7. Imagens MEV dos filmes de diamante crescidos sobre o silício com nível de dopagem: a) 5000 ppm de B/C. b) 10000 ppm de B/C. c) 20000 ppm de B/C.

4.1.3) Espectroscopia de espalhamento Raman

A Figura 8 apresenta os espectros Raman dos filmes de diamante com os níveis de dopagem de 5000, 10000, 20000 ppm de boro. A energia de excitação do laser de Ar foi de 2,41 eV com comprimento de onda de 514 nm. A profundidade de penetração do laser é de 5 μm .

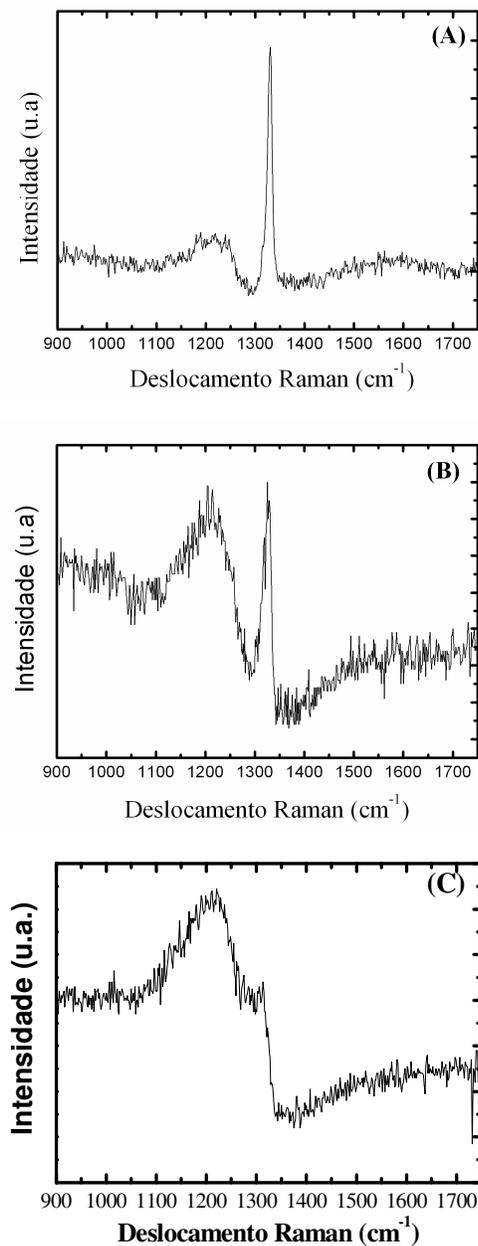


Figura 8. Espectros Raman para filmes de diamante crescidos sobre silício. a) 5000 ppm de boro. b) 10000 ppm. c) 20000 ppm de boro.

Os espectros mostraram um pico em torno de 1332 cm^{-1} , que é linha característica do diamante, indicando assim que o filme é constituído principalmente de cristais de diamante. Além disso, observa-se uma banda em torno de 1200 cm^{-1} , que aumenta em intensidade com o aumento do razão Boro/Carbono²³.

4.2) Cálculo da área eletroativa dos eletrodos

Devido às dificuldades de montagem do EDDB, houve a necessidade de se estimar a área efetiva para os eletrodos de diamante utilizados no trabalho. A área foi calculada a partir dos dados obtidos nos voltamogramas cíclicos registrados para o processo reversível $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, como apresentado na Figura 9.

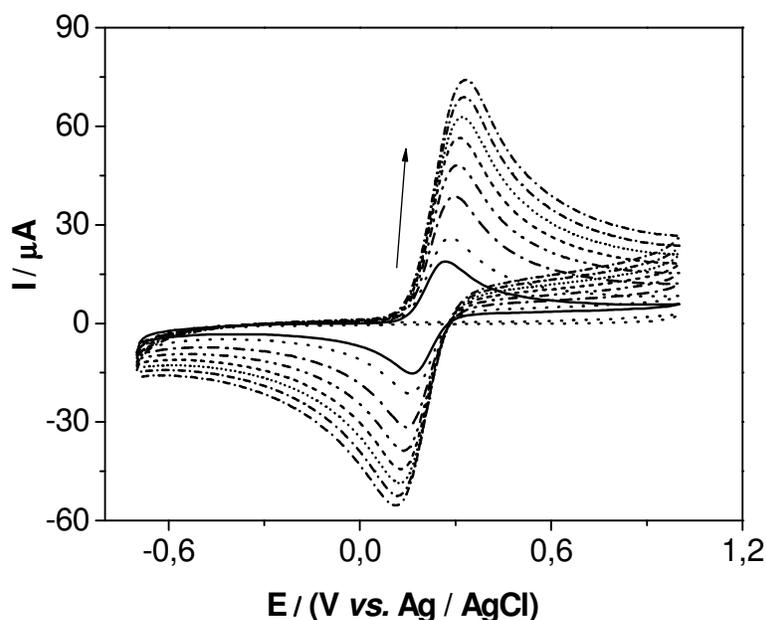


Figura 9: Voltamogramas cíclicos registrados em $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}\text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, contendo $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de KCl em EDDB. Condições experimentais: $E_{\text{inicial}} = -0,7\text{ V}$; $E_{\lambda 1} = +1,0\text{ V}$. $E_{\text{final}} = -0,7\text{ V}$. Faixa de velocidade de varredura: $0,050\text{ V} \leq v \leq 0,70\text{ V s}^{-1}$.

As correntes de pico catódicas e anódicas para o processo reversível $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ mostraram uma relação linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), de acordo com a Figura 9, o que caracteriza um processo controlado por difusão da espécie eletroativa até a superfície do EDDB.

A equação de Randles-Sevick, (equação 1) diz que a corrente de pico deverá ter um comportamento proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura³³.

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} D^{1/2} C A v^{1/2} \quad (1)$$

Onde:

I_p = corrente de pico (A);

n = número de elétrons envolvidos na reação;

D = Coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$);

C = Concentração da espécie eletroativa (mol cm^{-3});

A = área eletroativa do eletrodo (cm^2).

A Figura 10 mostra a curva obtida a partir das correntes de pico anódico dos voltamogramas cíclicos para o ferrocianeto de potássio. O número de elétrons, n , envolvidos no processo reversível $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ é igual a 1, o coeficiente de difusão da espécie eletroativa, D_0 , é $6,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e a concentração da espécie eletroativa igual a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A partir do valor de coeficiente angular da reta no gráfico da Figura 8, foi possível calcular a área dos EDDB, utilizando a equação de Randles-Seveik. A curva

apresentou excelente correlação dos pontos e o valor do coeficiente angular foi de $9,2 \times 10^{-5} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$.

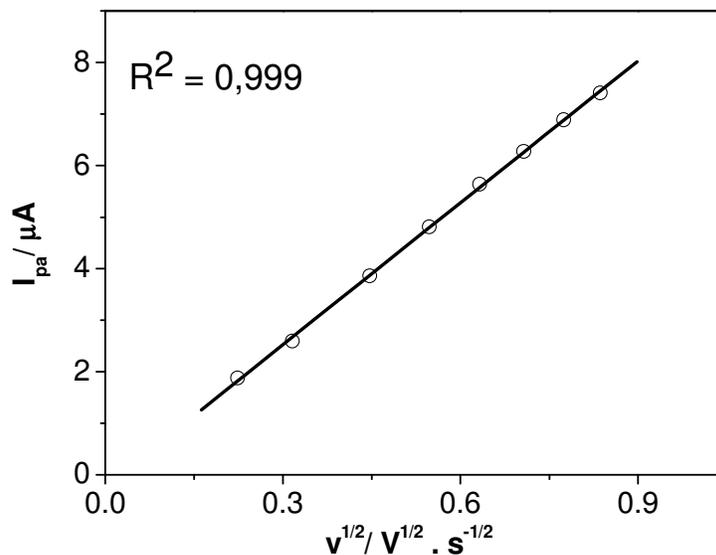


Figura 10: Variação de I_{pa} como função de $v^{1/2}$ plotada a partir dos dados obtidos na figura 7.

4.3) Estudo do comportamento eletroquímico da NFT em EDDB para diferentes pHs

A técnica de voltametria cíclica foi utilizada para fazer estudos preliminares de eletroatividade da molécula de NFT em EDDB com diferentes níveis de dopagem de boro e identificar o processo redox na superfície do eletrodo, além de investigar em qual pH se obtém a melhor resposta eletroquímica. A Figura 11 apresenta os voltamogramas cíclicos para a NFT na concentração de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para o eletrodo com 5000 ppm de boro em meio de tampão BR para os pHs 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0. A NFT apresentou um processo totalmente irreversível para todos os pHs estudados.

Para o EDDDB com menor nível de dopagem, foi possível notar que o processo de redução, apesar de apresentar uma elevada intensidade de corrente, não apresentou um pico definido para o processo investigado, devido à competição da reação de formação de hidrogênio, que ocorre em potencial próximo ao da redução da NFT. Em pH 2,0, a redução da NFT é deslocada para potenciais mais positivos, aproximadamente -0,31 V, que para os demais pHs estudados. Em pH 4,0 a reação ocorreu em -0,35 V, mas a intensidade de corrente foi superior à corrente de redução mostrada em pH 2,0, o que sugere que esse meio seja o mais adequado para os estudos de quantificação da NFT. Para os pHs 6,0 e 8,0 os voltamogramas apresentaram um maior desfavorecimento da reação estudada à medida que se tem um meio mais alcalino.

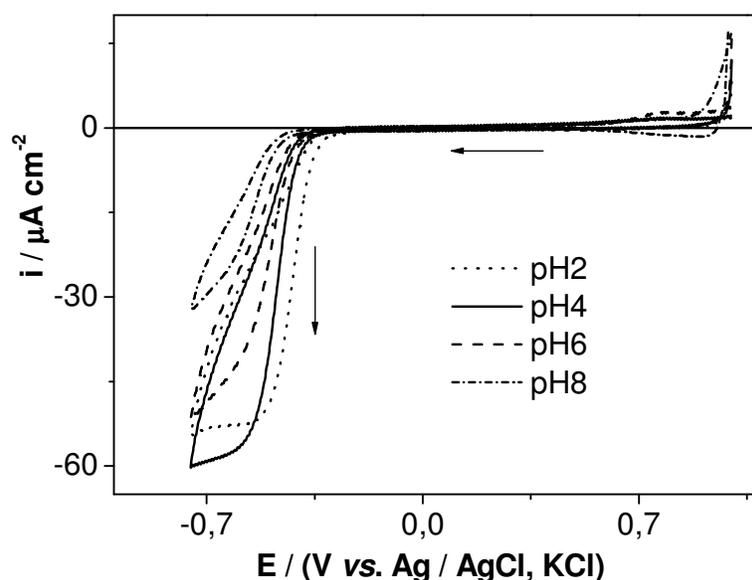


Figura 11: Voltametria cíclica característica de NFT $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,4 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo com 5000 ppm de boro.

A Figura 12 apresenta um estudo semelhante ao anterior, agora para o eletrodo com 10000 ppm de boro. Para a solução em pH 2,0 e 4,0 é possível notar um processo

bem definido na região catódica com máximo em -0,45 e -0,48 V, respectivamente, sendo que em pH 4,0 a intensidade de corrente do processo de redução se mostrou superior à do pH 2,0.

Em pHs mais alcalinos, o potencial de redução da NFT se deslocou para valores ligeiramente mais negativos, além de perder sensivelmente a resolução do processo. Estes resultados concordam como os obtidos para o eletrodo com 5000 ppm de boro.

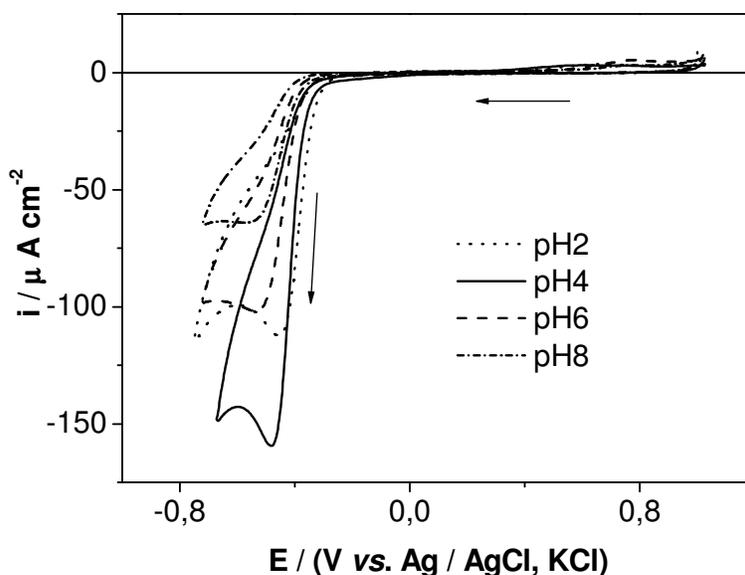


Figura 12: Voltametria cíclica característica de NFT 10^{-4} mol L $^{-1}$ em meio de tampão BR 0,4 mol L $^{-1}$. Eletrodo com 10000 ppm de boro.

Os estudos voltamétricos para o eletrodo com 20000 ppm de boro, apresentados na Figura 13, mostraram que o efeito do pH é semelhante: para o pH 2,0, o processo de redução ocorreu em potencial mais positivo, -0,25 V, enquanto que para o pH 4,0 o processo de redução ocorreu em -0,34 V. Entretanto, observando as intensidades de corrente de pico dos processos vê-se que em pH 4,0 são superiores aos obtidos em pH 2,0.

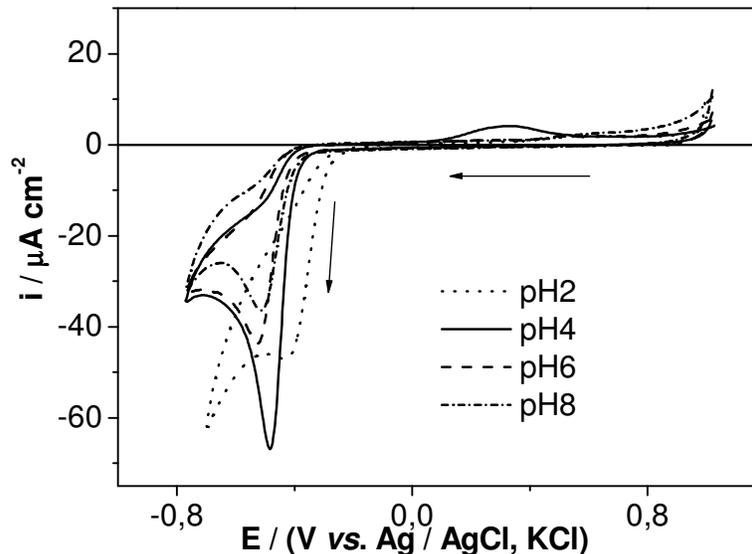


Figura 13: Voltametria cíclica característica de NFT 10^{-4} mol L $^{-1}$ em meio de tampão BR 0,4 mol L $^{-1}$. Eletrodo com 20000 ppm de boro.

Comparando-se os resultados apresentados nas Figuras 11, 12 e 13 foi possível observar que, para os voltamogramas obtidos para os eletrodos contendo 10000 e 20000 ppm de boro, o processo de redução ficou mais bem definido em pH 4,0, principalmente para o eletrodo com maior nível de dopagem. Para o eletrodo com 5000 ppm de boro, nenhuma condição de pH forneceu uma condição favorável para o estudo da NFT, já que não foi possível obter-se um processo bem definido, devido à competição com a reação de desprendimento de hidrogênio. Além disto, este resultado indica que o aumento da dopagem de boro aumenta o sobrepotencial para a reação de desprendimento de hidrogênio.

Outro resultado interessante observado para os eletrodos estudados foi a diminuição da corrente de pico do processo de redução à medida que se trabalhou em pH mais alcalino. Esse fenômeno ocorre pelo fato de que em pH mais alcalino há a tendência da formação do nitro radical R-NO $_2^{\bullet}$ pela desprotonação da molécula de

NFT, segundo a equação abaixo³⁴; logo, o sinal referente à redução da espécie NFT diminui.



A partir dos resultados apresentados foram selecionados os EDDB com 10000 e 20000 ppm de boro para os estudos da metodologia de quantificação da NFT.

4.4) Estudo dos parâmetros operacionais da voltametria de onda quadrada (VOQ)

4.4.1) Influência da frequência de pulso

Dependendo do valor dos parâmetros: frequência, amplitude e incremento de varredura para cada sistema estudado, a técnica de VOQ pode ter uma maior ou menor sensibilidade, daí a importância de fazer antes de tudo um estudo dos parâmetros operacionais que compõem a técnica.

Segundo O'Deal *et al*³⁵, para sistemas totalmente irreversíveis a intensidade de corrente varia linearmente com a frequência de pulso aplicada de acordo com a equação abaixo.

$$I_p = k f \quad (3)$$

I_p = corrente de pico

k = constante cinética da reação

f = frequência de pulso

A Figura 14a mostra os voltamogramas para o sistema estudado em função da frequência aplicada. É possível observar um deslocamento de potencial de pico nos voltamogramas com o aumento do valor de frequência aplicada, caracterizando um processo adsorptivo³⁵. Outra característica importante do perfil voltamétrico apresentado é o alargamento do voltamograma à medida que se tem maiores valores de frequência, o que pode provocar uma diminuição na resolução do pico, acarretando em perda de sensibilidade da técnica.

A Figura 14b mostra a dependência da corrente de pico do processo com a frequência aplicada, utilizando-se os eletrodos com 10000 e 20000 ppm de boro.

As correntes de pico catódico tiveram uma dependência linear até uma frequência de 80 Hz para o eletrodo com menor nível de dopagem. Para valores maiores de frequência a corrente de pico reduziu sensivelmente, tornando-se aproximadamente constante. Para o eletrodo com maior nível de dopagem as correntes de pico mantiveram uma dependência linear em toda a janela de frequência estudada.

Comparativamente, a curva obtida para o eletrodo de 20000 ppm de boro apresentou maior sensibilidade que o eletrodo com 10000 ppm de boro, além de apresentar uma maior relação linear entre a frequência e a corrente de pico, permitindo que se trabalhe com maior valor de frequência, aumentando a sensibilidade eletroquímica.

De acordo com os resultados obtidos os valores otimizados de frequência foram 80 e 100 Hz para os eletrodos com 10000 e 20000 ppm de boro, respectivamente, já que nestas frequências foram obtidas as maiores respostas de corrente.

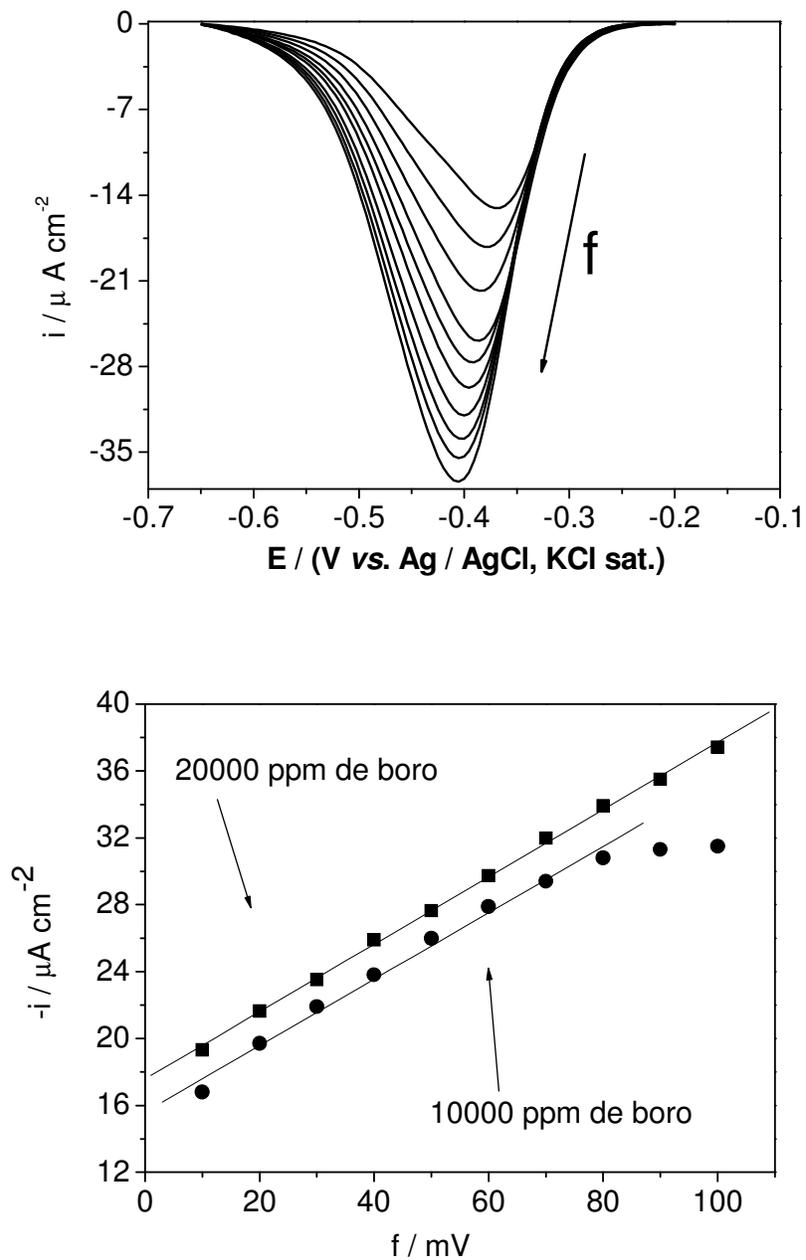


Figura 14: a) Voltamogramas de onda quadrada para as frequências de 10 a 100 mV. b) Influência do aumento da frequência na resposta de corrente voltamétrica para os eletrodos com 10000 e 20000 ppm de boro.

4.4.2) Influência da amplitude de pulso

A amplitude é outro parâmetro importante para uma boa resposta voltamétrica e, dependendo do valor de amplitude aplicado, o sinal de onda pode sofrer um alargamento do pico comprometendo a sensibilidade da medida.

A Figura 15a apresenta os voltamogramas para o sistema estudado em função da amplitude aplicada para o eletrodo com 20000 ppm de boro. Os voltamogramas mostram um deslocamento do pico voltamétrico para valores mais positivos, o que indica mais uma vez processo adsorptivo, além de um sensível alargamento do pico voltamétrico, que em valores maiores de amplitude acarretou em perda de sinal eletroquímico para os dois eletrodos estudados.

A Figura 15b apresenta a relação linear da corrente de pico com a amplitude aplicada. Para os eletrodos com 10000 ppm e 20000 ppm de dopagem obteve-se uma linearidade até 40 e 60 mV, respectivamente. Esses valores indicam a amplitude onde se obteve melhor resolução e intensidade para os picos voltamétricos, sendo assim os valores escolhidos como ideais.

Comparando-se os dois eletrodos estudados pode-se observar que o eletrodo com maior teor de boro na composição apresentou maiores valores de corrente para o respectivo valor de amplitude estudado, demonstrando ter maior sensibilidade eletroquímica.

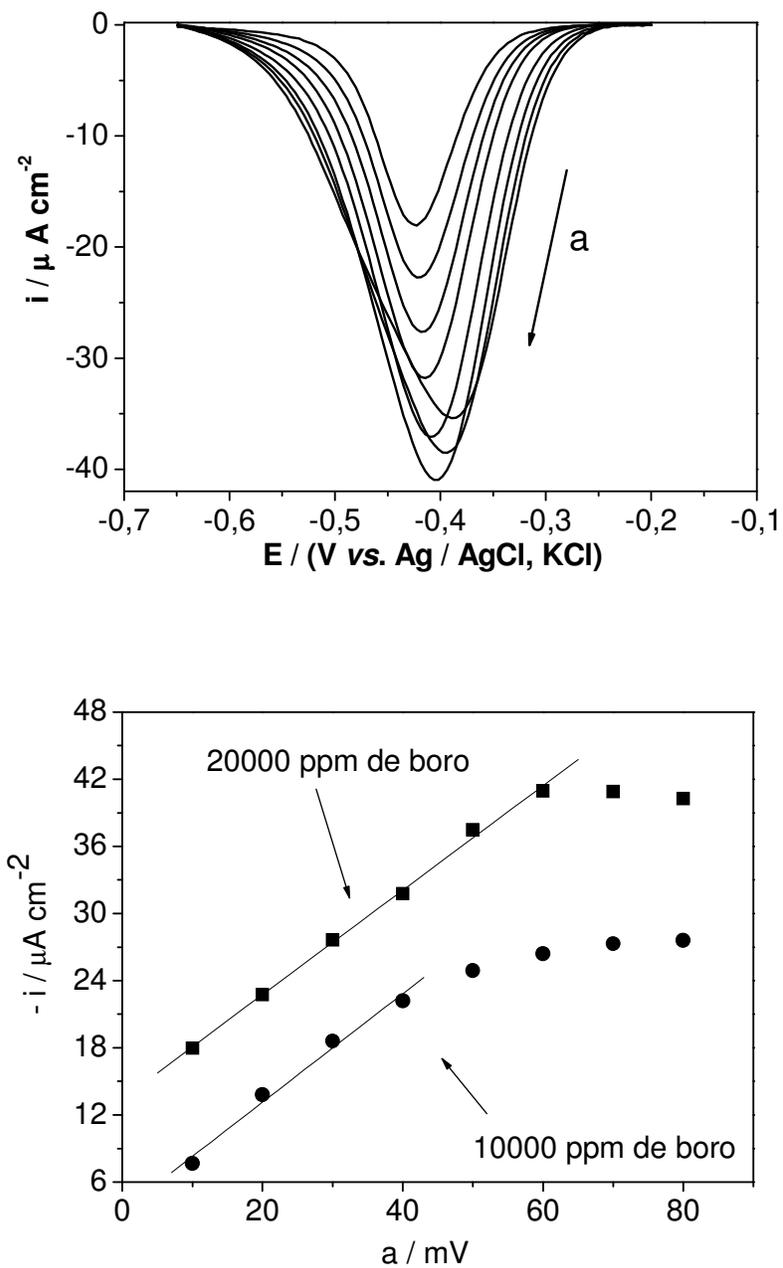


Figura 15: a) Voltamogramas de onda quadrada para as amplitudes de 10 a 80 mV. b) Influência do aumento da amplitude na resposta de corrente voltamétrica para os eletrodos com 10000 e 20000 ppm de boro.

4.4.3) Influência do incremento de varredura

O incremento de varredura é o último parâmetro que determina a eficiência da resposta analítica utilizando a voltametria de onda quadrada. A velocidade da voltametria de onda quadrada está relacionada diretamente à frequência e ao incremento de varredura.

Este por sua vez também influencia na definição do pico voltamétrico, ou seja, valores de varredura baixos podem resultar em diminuição da sensibilidade da técnica, mas em contrapartida altos valores de varredura podem proporcionar um alargamento do pico voltamétrico e conseqüentemente diminuição na resolução do pico.

A Figura 16a apresenta os voltamogramas para o sistema estudado em função do incremento de varredura (ΔE_s). Os voltamogramas mostraram picos bem resolvidos para o deslocamento do potencial de pico dos processos, caracterizando adsorção. Também é importante ressaltar o alargamento considerável do voltamograma com o aumento do valor de ΔE_s que, como já foi dito, acarreta em perda de sensibilidade da medida.

A Figura 16b mostra a relação linear com o ΔE_s par aos eletrodos de 10000 e 20000 ppm de boro. Os dois eletrodos estudados apresentaram uma linearidade até 4 mVs^{-1} ; sendo assim, este foi considerado o valor ótimo para o incremento de varredura. A curva ainda mostrou uma significativa diferença de sensibilidade quando comparamos os dois eletrodos estudados. A curva referente ao eletrodo com 20000 ppm de boro apresentou valores de correntes bem superiores aos obtidos para o eletrodo com 10000 ppm de boro, o que leva a concluir que o maior nível de dopagem favorece um aumento de sensibilidade.

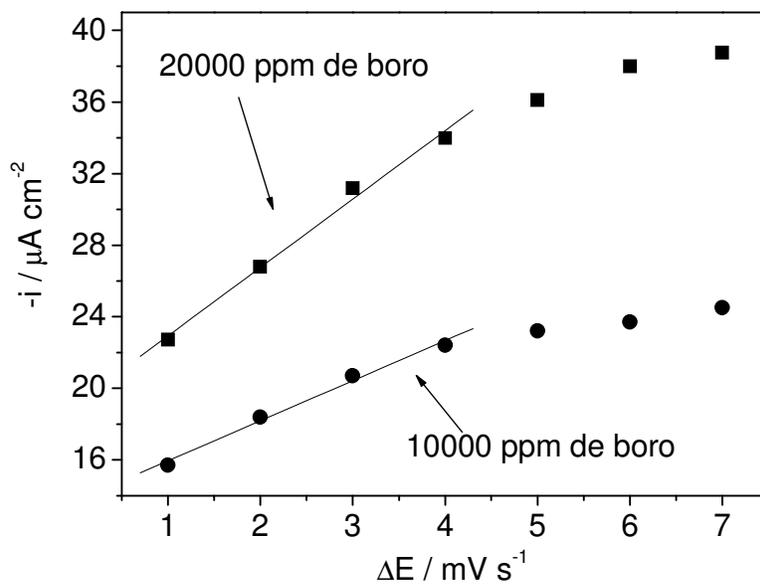
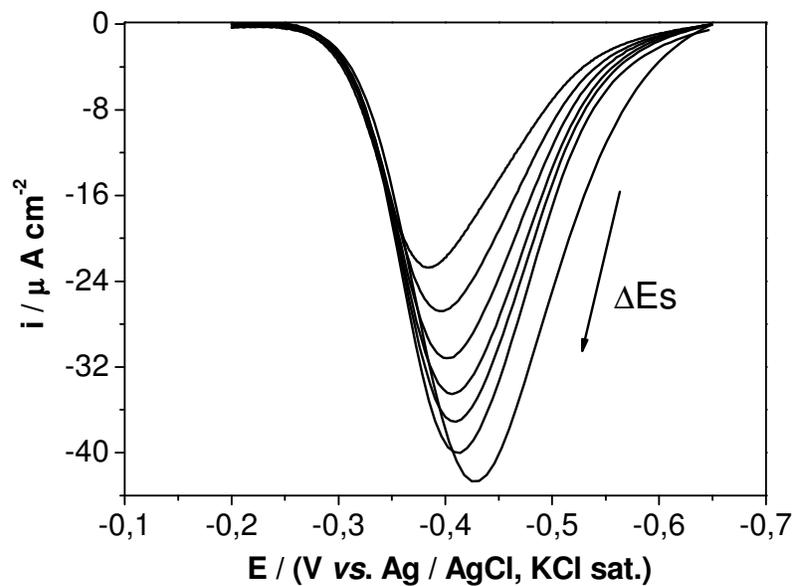


Figura 16: a) Voltamogramas de onda quadrada para os incrementos de varredura de 1 a 7 mV. b) Influência do aumento da amplitude na resposta de corrente voltamétrica para os eletrodos com 10000 e 20000 ppm de boro.

4.5) Obtenção da curva analítica para a NFT

A partir do estudo dos parâmetros operacionais foram obtidas as melhores condições operacionais para a voltametria de onda quadrada em cada superfície eletródica: frequência = 80 s^{-1} , amplitude = 40 mV, incremento de varredura = 4 mV para o eletrodo com menor nível de dopagem (10000 ppm) e frequência = 100 s^{-1} , amplitude = 60 mV e incremento de varredura 4 mV para o eletrodo com maior nível de dopagem. Utilizando esses parâmetros foram obtidas as curvas analíticas para determinar a porcentagem de recuperação da NFT em amostra farmacêutica com os eletrodos de 10000 e 20000 ppm de dopagem de boro. Para os dois eletrodos foi utilizada a mesma metodologia.

A Figura 17 apresenta os voltamogramas das medidas feitas para a curva de recuperação da NFT em eletrodo de diamante dopado com 10000 ppm de boro. Os voltamogramas apresentaram picos bem definidos mostrando a ótima sensibilidade do EDDB ao analito.

A partir das correntes de pico identificadas nos voltamogramas foi feito um tratamento estatístico e traçada a curva analítica média com desvio padrão para 3 determinações obtidas. A curva obtida apresentou boa linearidade com $R^2 = 0,998$ no intervalo: $4,97 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \leq [\text{NFT}] \leq 47,62 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ até a décima adição, perdendo a linearidade nos últimos dois pontos.

A Figura 18 apresenta os voltamogramas e respectiva curva de recuperação para a nitrofurantoína em eletrodo de diamante dopado com 20000 ppm de boro.

Os voltamogramas também apresentaram excelente resolução dos picos com valores de corrente superiores aos do eletrodo com 10000 ppm dopagem. A curva de

recuperação apresentou excelente correlação dos pontos, $R^2 = 0,9998$ e não mostrou desvio da linearidade na região estudada: $4,97 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \leq [\text{NFT}] \leq 56,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

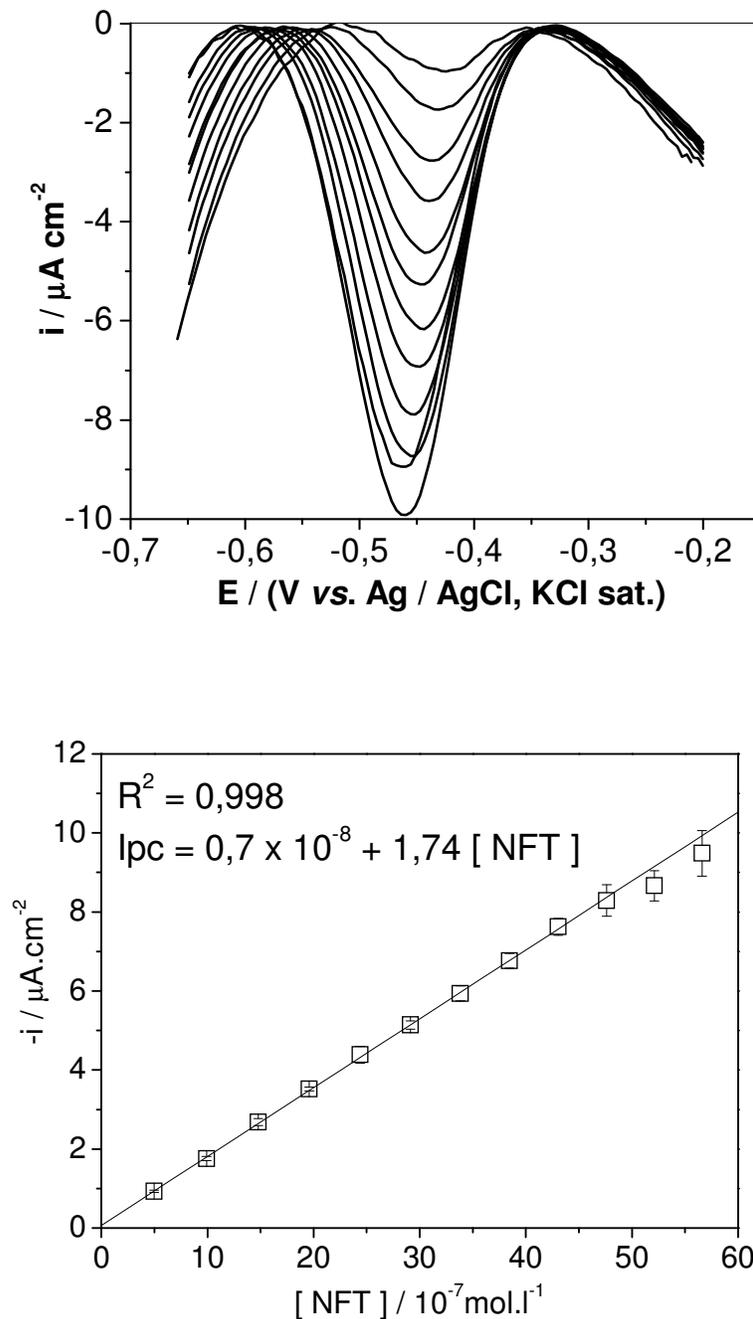


Figura 17: a) Voltamogramas de onda quadrada para adições sucessivas de NFT em tampão BR pH 4,0 no intervalo de concentrações: $4,97$ a $56,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. b) Curva analítica traçada a partir dos voltamogramas de onda quadrada para a NFT em eletrodo de diamante dopado com 10000ppm de boro.

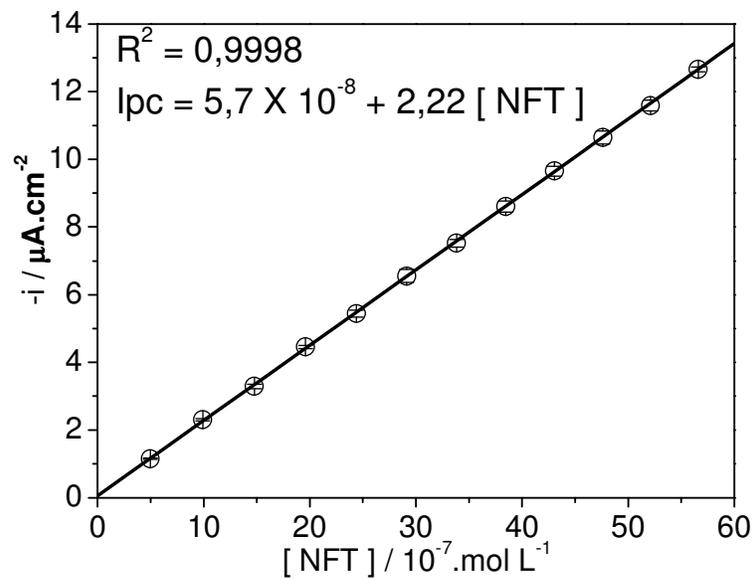
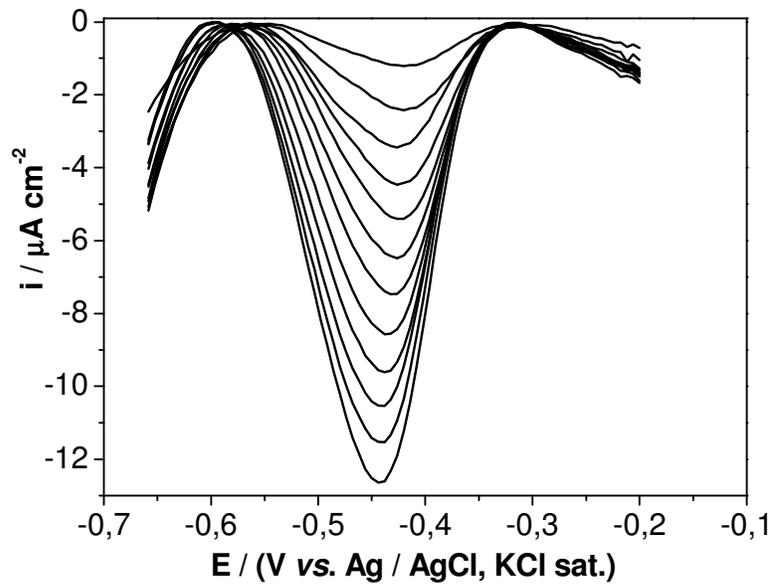


Figura 18: a) Voltamogramas de onda quadrada para adições sucessivas de NFT em tampão BR pH 4,0 no intervalo de concentrações: $4,97$ a $56,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. b) Curva analítica traçada a partir dos voltamogramas de onda quadrada para a NFT em eletrodo de diamante dopado com 20000ppm de boro.

Comparando-se as inclinações das curvas de calibração para os eletrodos, vê-se que o eletrodo com maior nível de dopagem apresenta maior coeficiente angular, apresentando assim, maior sensibilidade ao analito, como pode ser visto na Figura 19. Este resultado sugere que para sistemas onde se requer limites de detecção e de quantificação muito baixos, o eletrodo de diamante com maior nível de dopagem é o mais viável.

Os resultados obtidos também possibilitaram a conclusão que os excipientes contidos na amostra farmacêutica não interferem na determinação eletroquímica, permitindo que se trabalhe com a amostra comercial sem a necessidade de nenhum tipo de pré-tratamento.

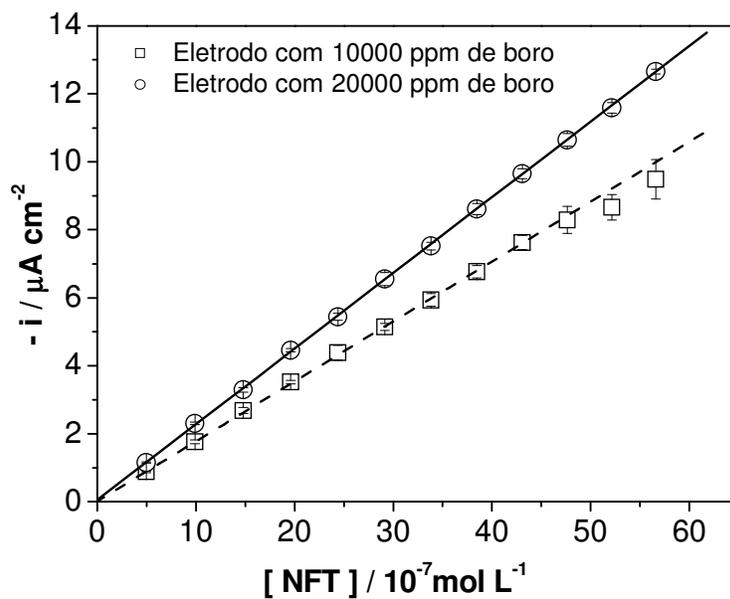


Figura 19: Superposição das curvas analíticas referentes aos eletrodos com 10000ppm e 20000ppm de boro.

4.6) Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação são parâmetros de extrema importância para uma técnica analítica. O limite de detecção é o menor valor de concentração ou quantidade de substância que pode ser identificada por um procedimento analítico e o limite de quantificação é a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser medida com uma determinada precisão e exatidão aceitável.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados de acordo com as equações 3 e 4, respectivamente:

$$LD = 3 \times S / b \quad (4)$$

$$LQ = 10 \times S / b \quad (5)$$

Onde:

S = Desvio padrão da medida do branco.

b = Coeficiente angular da curva analítica para amostra.

O desvio padrão (S) foi obtido a partir do tratamento estatístico de 10 voltamogramas do branco (eletrólito suporte), de onde se determinou os valores de corrente no mesmo potencial do pico de redução obtido nas análises da NFT.

A Tabela 1 apresenta os resultados para os limites de detecção e de quantificação da NFT para os eletrodos com 10000 e 20000 ppm de dopagem de boro e também os dados de coeficiente de correlação (R^2) e coeficiente angular (S) referentes às curvas de recuperação obtidas para os eletrodos.

Tabela 1: Resultados referentes à curva analítica da nitrofurantoina em eletrodo de diamante dopado com 10000ppm e 20000 ppm de boro.

Parâmetros	Dopagem de 10000 ppm	Dopagem de 20000 ppm
	de boro	de boro
R	0,9997	0,9998
S (A)	$1,56 \times 10^{-8}$	$6,03 \times 10^{-9}$
b (A/mol L⁻¹)	1,74	2,22
LD (mol L⁻¹)	$2,69 \times 10^{-8}$ (6,40 $\mu\text{g L}^{-1}$)	$8,15 \times 10^{-9}$ (1,94 $\mu\text{g L}^{-1}$)
LQ (mol L⁻¹)	$8,96 \times 10^{-8}$ (21,33 $\mu\text{g L}^{-1}$)	$2,72 \times 10^{-8}$ (6,47 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Repetibilidade (%)	1,20	0,95
Reprodutibilidade (%)	3,40	1,19

A reprodutibilidade e repetibilidade apresentaram bons resultados, mostrando a estabilidade do eletrodo. Comparativamente o eletrodo de 20000 ppm de boro apresentou os melhores resultados.

O limite de detecção (LD) foi de $2,69 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para o eletrodo menos dopado e de $8,15 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ para o eletrodo com 20000 ppm de dopagem.

O limite de quantificação (LQ) para o eletrodo com 10000 ppm de dopagem foi de $8,96 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, enquanto que para o eletrodo com maior nível de dopagem foi de $2,72 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

Analisando os resultados obtidos é possível notar a influência direta do teor de boro na resposta analítica dos eletrodos de diamante, onde o eletrodo com 20000 ppm de boro apresenta sempre um desempenho superior, com limite de detecção e limite de quantificação cerca de três vezes maior que o eletrodo com 10000 ppm de boro.

4.7) Curva de recuperação da NFT em eletrólito de suporte

As Figuras 20 e 21 apresentam as curvas de recuperação para a NFT em eletrólito de suporte utilizando os eletrodos de diamante com 10000 e 20000 ppm de boro, onde as condições experimentais utilizadas foram as mesmas utilizadas para obtenção das curvas analíticas.

Os experimentos foram feitos utilizando-se amostra comercial de um fármaco na forma de apresentação em cápsula, contendo como princípio ativo a NFT, sem nenhum pré-tratamento ou etapa de extração para o isolamento do princípio ativo da amostra.

As curvas de recuperação obtidas para amostras de medicamento comercial mostram boa reprodutibilidade e sem grandes interferências devido a impurezas e aos excipientes contidos no fármaco. O eletrodo com o maior nível de dopagem apresentou uma melhor inclinação da curva de recuperação, com um coeficiente angular de 2,2 A/mol L⁻¹, enquanto que o eletrodo menos dopado apresentou um coeficiente angular de 1,74 A/mol L⁻¹, como já pode ser visto para as curvas analíticas.

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos a partir das curvas de recuperação acima. A análise destes resultados destaca o bom desempenho dos eletrodos na recuperação do fármaco em tampão BR, com percentagens médias de recuperação de $104,64 \pm 2,75$ e $103,33 \pm 1,88$ para os eletrodos dopados com 10000 e 20000 ppm de boro, respectivamente.

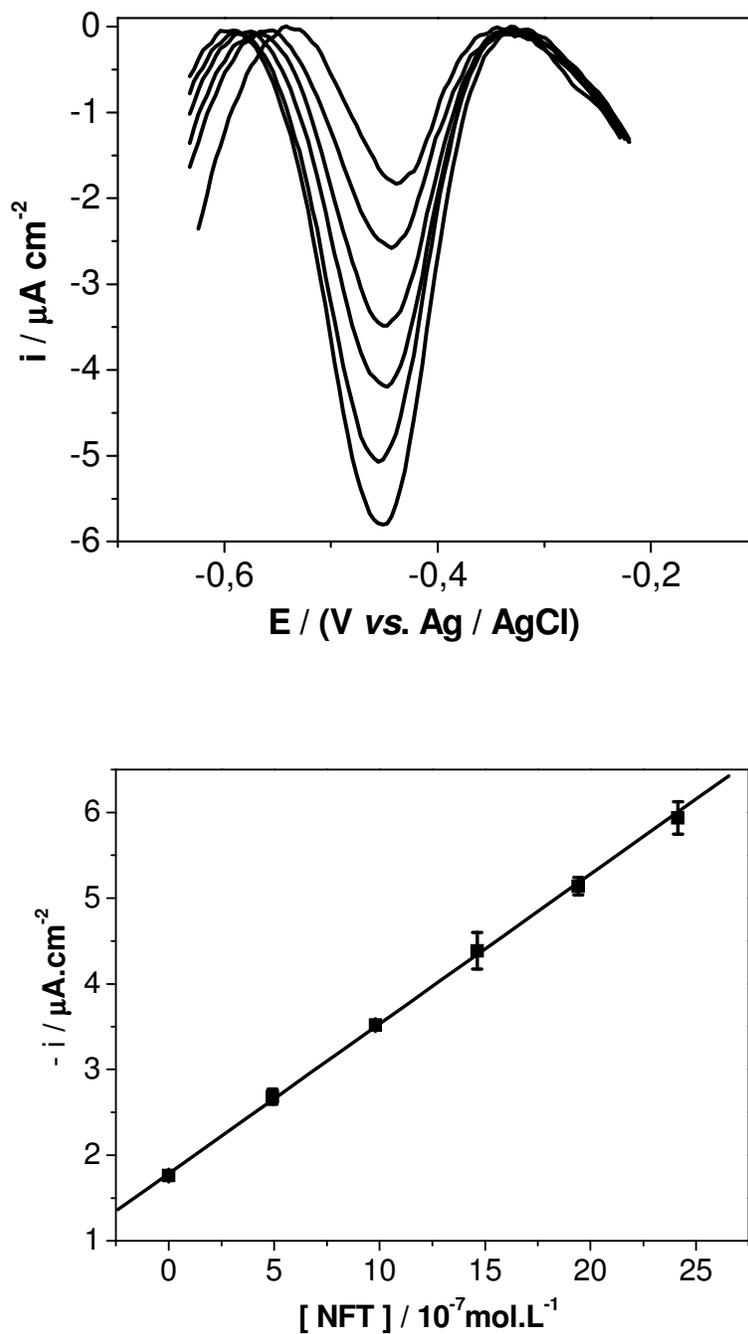


Figura 20: a) Voltamogramas de onda quadrada para adições sucessivas da solução da amostra comercial de NFT em tampão BR pH 4,0. b) Curva de recuperação traçada a partir dos voltamogramas de onda quadrada para a NFT em eletrodo de diamante dopado com 10000 ppm de boro.

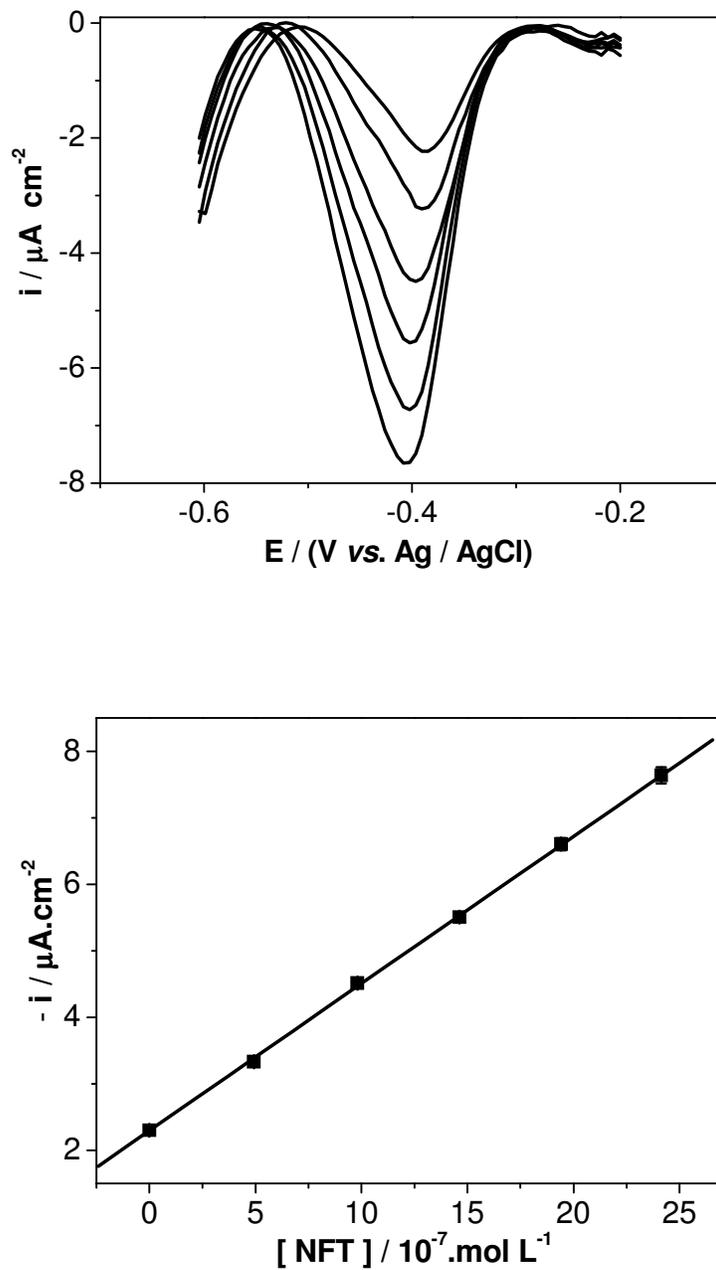


Figura 21: a) Voltamogramas de onda quadrada para adições sucessivas da solução da amostra comercial de NFT em tampão BR pH 4,0. b) Curva de recuperação traçada a partir dos voltamogramas de onda quadrada para a NFT em eletrodo de diamante dopado com 20000 ppm de boro.

Tabela 2: Valores de recuperação em eletrólito utilizando os eletrodos com 10000 ppm e 20000 ppm de boro.

Dopagem /ppm de boro	[teor.] (10^{-7}mol L$^{-1}$)	[rec.] (10^{-7}mol L$^{-1}$)	% recuperação (n = 3)
10000	9,90	10,36 ± 0,23	104,64 ± 2,75
20000	9,90	10,23 ± 0,19	103,33 ± 1,88

Os resultados das análises da NFT mostraram percentagens de recuperação semelhantes apesar da diferença nos níveis de dopagem, mostrando que para o nível de concentração de NFT estudada os eletrodos de diamante apresentam um desempenho bem próximo, com o eletrodo com 20000 ppm de boro mostrando melhor desempenho, principalmente se for observado o desvio padrão das recuperações, que mostra uma maior precisão dos resultados.

A partir dos resultados apresentados foi escolhido o eletrodo com 20000 ppm de boro para as análises posteriores de recuperação em fluido biológico.

4.8) Comparação da técnica por medidas de UV-Vis

A solução de NFT apresenta uma coloração amarelada característica que apresenta uma única banda de absorção na região do UV com um máximo de absorbância em 368 nm, permitindo que o composto seja analisado e quantificado pela técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta e do visível. A espectrofotometria se fundamenta na lei de Lambert-Beer, que prevê uma correlação

linear entre a concentração da espécie analisada e a absorbância de radiação visível em uma faixa de concentração determinada experimentalmente.

$$\log (I_0/I) = A = \epsilon bc \quad (6)$$

Onde:

A = Absorbância;

I_0 = intensidade da radiação incidente;

I = intensidade da radiação transmitida;

ϵ = coeficiente de absorvidade molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

b = caminho óptico através da solução;

c = concentração mol L^{-1} .

A Figura 22 apresenta a curva de calibração para a NFT, que foi construída a partir das medidas de seis soluções de concentrações conhecidas da amostra padrão de NFT no intervalo de 10^{-6} a $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As medidas foram feitas em triplicata e a curva traçada a partir dos valores médios dos pontos e seus respectivos desvios padrões.

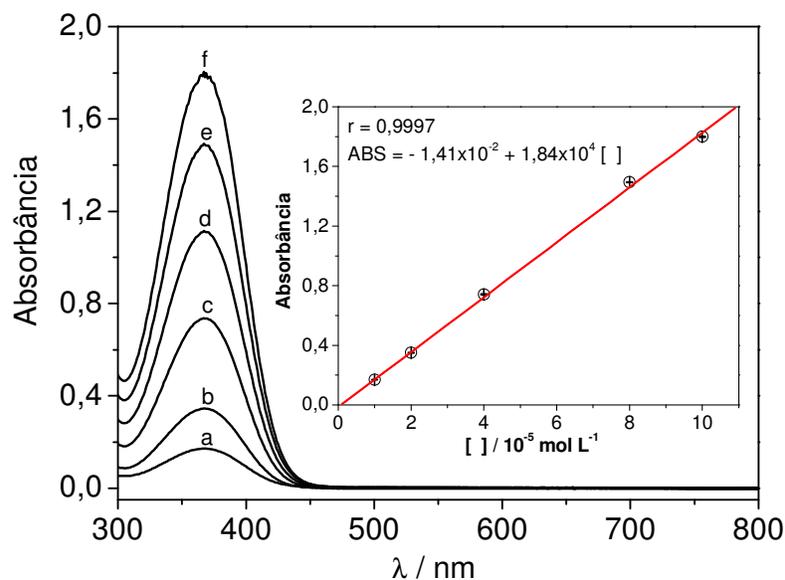


Figura 22: Espectros de UV-Vis para a NFT em tampão BR pH 4,0 no intervalo de concentração: 10^{-6} a $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Inserção: Curva de calibração para nitrofurantoina obtida a partir dos espectros de UV-Vis.

A curva obtida a partir das medidas de absorvância apresentou ótima linearidade em toda a faixa de concentração estudada com um coeficiente de correlação de 0,9997 e sensibilidade de $1,84 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Tabela 3).

Tabela 3: Valores referentes à curva de calibração obtida pela técnica de UV-vis.

Parâmetros	UV-vis
r	0,9997
S (A)	$6,07 \times 10^{-4}$
b (A/ mol L⁻¹)	$1,84 \times 10^4$
LD (mol L⁻¹)	$9,88 \times 10^{-8}$ (23,55 $\mu\text{g L}^{-1}$)
LQ (mol L⁻¹)	$3,29 \times 10^{-7}$ (78,35 $\mu\text{g L}^{-1}$)

Os LD e LQ obtidos por espectrofotometria foram de $9,88 \times 10^{-8}$ e $3,29 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, valores cerca de 10 vezes maiores 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 UV-Vis.

4.9) Aplicação da metodologia proposta em fluido biológico

A aplicação da metodologia foi feita em urina humana utilizando a metodologia descrita para as etapas anteriores. A Figura 23a apresenta os voltamogramas de onda quadrada para 6 adições sucessivas de concentração de fármaco, onde a primeira

corresponde a uma alíquota de urina dopada com a NFT e em seguida foram feitas adições de alíquotas de solução de padrão da NFT.

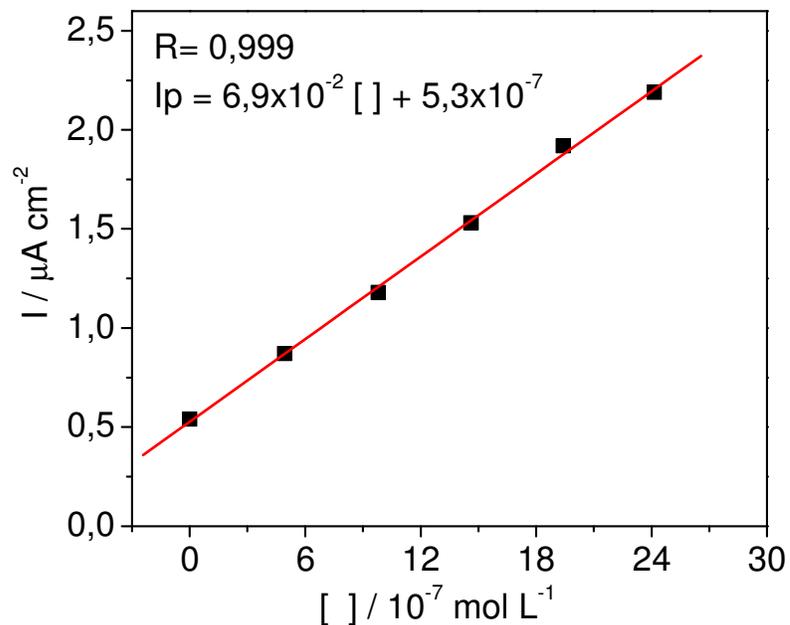
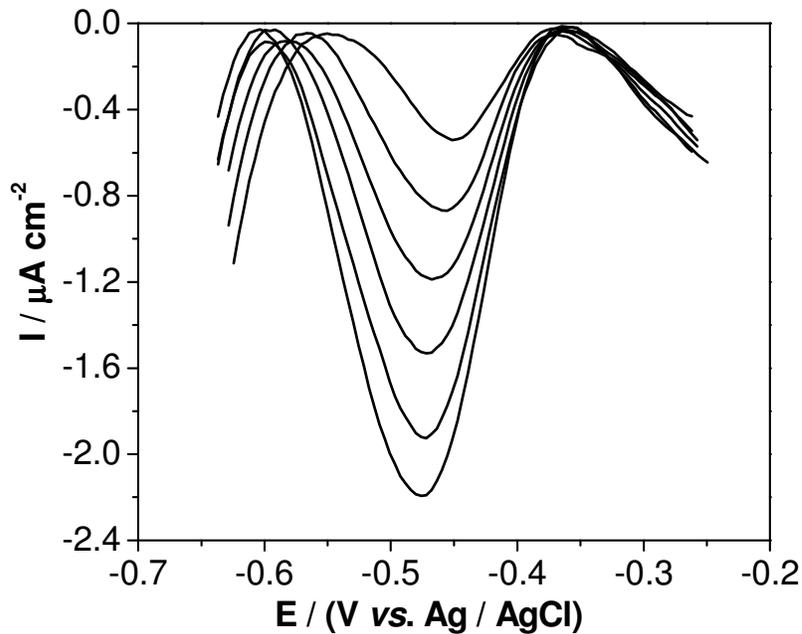


Figura 23: Voltamogramas de onda quadrada referentes à amostra de urina dopada com NFT. Inserção: Curva de recuperação em urina humana obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada.

Os voltamogramas mostraram picos bem resolvidos e uma resposta proporcional ao aumento da concentração de analito.

A Figura 23b mostra a curva traçada a partir dos valores obtidos na etapa de aplicação da metodologia. A curva apresentou boa correlação dos pontos $R^2 = 0,999$, e o valor da recuperação obtido para a amostra de NFT em urina foi de $7,68 \pm 1,8 \text{ mol L}^{-1}$, equivalente a $86,8 \pm 0,89 \%$ de recuperação.

O resultado apresentou uma boa resposta eletroquímica do EDDB em um meio bastante complexo, mostrando a seletividade da metodologia, já que não apresentou processo outros processos de redução na mesma região da NFT.

5) Conclusões

Os estudos de pH feito para os filmes de diamante com 5000, 10000, 20000 ppm de boro mostraram comportamento semelhante, indicando que o pH 4,0 oferece a melhor condição de trabalho. Além disso, foi possível observar que o eletrodo com menor teor de boro na composição não oferece as condições necessárias para se estudar o fármaco em questão, visto o menor sobrepotencial deste para a reação de desprendimento de hidrogênio, que acaba competindo com a redução do nitrocomposto.

A determinação dos parâmetros da voltametria de onda quadrada se mostrou de fundamental importância para se ter bons resultados com a técnica. Para o filme com 10000 ppm de boro os parâmetros ótimos foram: frequência de 80 s^{-1} , amplitude de 40 mV e incremento de varredura de 4 mV; para o filme com 20000 ppm de boro os parâmetros ótimos foram: frequência de 100 s^{-1} , amplitude de 60 mV e incremento de varredura de 4 mV.

As curvas analíticas mostraram que o filme de diamante dopado com 20000 ppm de boro tem maior sensibilidade ao fármaco estudado, assim como LD e LQ mais baixos que o filme de diamante dopado com 10000 ppm de boro. As curvas de recuperação também mostraram que o sistema não sofre interferência da amostra utilizada, sendo desnecessárias etapas de pré-tratamento, o que torna o método ainda mais rápido e barato. Comparativamente, os eletrodos de diamante dopados com 10000 e 20000 ppm de boro apresentaram recuperação de $104,64 \pm 2,75$ e $103,33 \pm 1,88$ respectivamente, mostrando que, para o sistema estudado, os dois filmes apresentam excelentes percentagens de recuperação.

Para fins de comparação, a técnica de UV-Vis foi utilizada por ser comumente utilizada para determinação de compostos orgânicos que apresentam coloração, bem como fármacos. A técnica apresentou LD e LQ de $9,88 \times 10^{-8}$ e $3,29 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, valores cerca de 10 vezes maiores que os obtidos para a metodologia eletroanalítica proposta.

Por último a aplicação da metodologia apresentou bons resultados e mostrou que o eletrodo de diamante é uma superfície viável para o estudo de nitrocompostos e quando aliado a uma técnica eletroquímica poderosa apresenta vantagens práticas e econômicas. Não apresentou interferência referente à matriz, urina humana, apesar da complexidade da mesma. A porcentagem de recuperação foi de $86,8 \pm 0,89$, dentro do limite analítico exigido.

7) Referências Bibliográficas

- [1] Barek, J., Fischer, J., Navra'til, T., Peckova', K., Yosypchuk, B., Zima, J., *Electroanal.*, vol 19, p 2003, 2007.
- [2] Brajter, A., Goyal, R. N., Wrona, M. Z., Laçava, T., Nguyen, N. T. and Dryhurst, G., *Bioelectrochem. & Bioenerg*, vol 8, p 413, 1981.
- [3] Katekawa, E., Maximiano, F., Rodrigues, L. L., Delbem, M. F. and Serrano, S. H. P., *Anal. Chim. Ac.*, vol 385, p 345, 1999.
- [4] Pennington, J. M., Millar, J., Jone, C. P. L., Owesson, C. A., Mcloughlin, D. P. and Stamford, J. A., *J. Neur. Meth.*, vol 5, p 140, 2004.
- [5] Boopathi, M., Won, M. S. and Shim, Y. B. 2004, *Anal. Chim. Acta*, 512, 191.
- [6] Tominaga, M., Shimazoe, T., Nagashima, M. and Tanigushi, I., *Electrochem. Comm.*, vol 7, p 189, 2005.
- [7] Hupert, M., Muck, A., Wang, J., Stotter, J., Cvackkova, Z. Haymond, S., Show, Y., Swain, G. M., *Diamon. Rel. Mat.*, vol 12, p 1940, 2003.
- [8] Dou, I., Fujishima, A., Comninellis, Ch., *Electrochem. Comm*, vol 5, p 695, 2003.
- [9] Da-Silva Julião, M. S, Ferreira, E. I., Ferreira, N. G., Serrano S. H. P., *Electrochim. Ac.*, vol 51, p 5080, 2006.
- [10] G. K. Mcevory, Editor, *AHFS Drug Information*, *Am. Soc. of Hosp. pharm.*, p 438, 1990.
- [11] Mottier, p., Seu-Ping K., Gremaud, E., Richoz, J., Delatour, T., Goldmann, T., Guy, P. A., *Jour. of Chrom.*, vol 85, p 1065, 2005.
- [12] Díaz, T. G., Cabanillas, A. G., Valenzuela, M. I. A., Correa, C. A., Salinas, F., *Jour. of Chrom.*, vol 764, p 243, 1997.

- [13] Finzi, J. K., Donato, J. L., Sucupira, M., Nucci, De G., *Jour. of Chrom. B*, vol 30, p 824, 2005.
- [14] Leitner, A., Zo'llner, P., Lindner, W., *Jour. of Chrom. A*, vol 49, p 939, 2001.
- [15] Muth, P., Metz, R., Slems, B., Bolten, W. W., Vergin, H., *Journal of Chromatography A*, 729, 251, 1996.
- [16] Ghawji, A. B., Fogg, A. G., *Analyst.*, vol 111, p 157, 1986.
- [17] Fogg, A.G., Ghawij, A. B., *Analyst.*, vol 113, p 727, 1988.
- [18] Souza, D., Machado, S. A. S., Avaca, L. A., *Quím. Nova*, vol.26, p 81, 2003.
- [19] Mircesk, V. Komorsky-Lovric, S., Lovric, M., *Square – Wave Voltammetry: Teoria e Aplicação*, editor: Springer, Berlin, 2007.
- [20] Souza, D., Codognoto, L., Malagutti, A. R., Toledo, R. A., Pedrosa, V. A., Oliveira, R. T. S., Mazo, L. H., Avaca, L. A., Machado, S. A. S., *Quím. Nova*, vol.27, p 790, 2004.
- [21] Mason, W. D., Sandmann, B., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 65, p 599, 1976.
- [22] Hammam, E., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analytical*, vol 30, p 651, 2002.
- [23] Spitsyn, B. V., Bouilov, L.L., Alexenko, A. E., *Brazilian Journal of Physics*, vol 30 p 471 2000.
- [24] Silva, L. L. G., Corac, E. J., Barros, R. C. M., Távora-Airoldi, V. J., Leite, N. F., Iha, K., *Materials Research*, vol 2, p 99, 1999.
- [25] Santana, M. H. P., Faria, L. A., Boodts, J. F. C., *Electrochimica Acta*, vol 50, p 2017, 2005.

- [26] Suffredini, H. B., Pedrosa, V. A., Codognoto, L., Machado, S. A. S., Rocha-Filho, R. C., Avaca, L. A., *Electrochimica Acta*, vol 49, p 4021, 2004.
- [27] Salazar-Banda, G. R., Andrade, L. S., Nascente, P. A. P., Pizani, P. S., Rocha-Filho, R. C., Avaca, L. A., *Electrochimica Acta*, vol 51, p 4612, 2006.
- [28] Wangfuengkanagul, N., Chailapakul, O., *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analytical*, vol 28, p 841, 2002.
- [29] Park, J., Show, Y., Quaiserova, V., Galligan, J. J., Fink, G. D., Swain, G. M., *Journal electroanalytical Chemistry*, vol 583, p 56, 2005.
- [30] Britton, H. T. Robinson, R. A. *Journal of Chemical Society*, vol.287, p.458, 1931.
- [31] Ferreira, N.G.; Silva, L.L.G.; Corat, E.J.; Trava-Airoldi, V. J., *Diamond and Related Materials*, vol 11, p. 1523, 2002.
- [32] Ferreira, N.G.; Silva, L.L.G.; Corat, E.J.; Trava-Airoldi, V.J., *Diamond and Related Materials*, vol 11, p 657, 2002.
- [33] Brett, A. M. O., Brett, C. M. A. *Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*. Coimbra: Almedina, p191, 1996.
- [34] Nunez-Vergara, L. J., Sturm, J.C, Olea-Azar, C., Navarrete-encina, P., Bollo, S., vol 32, p 399, 1999.
- [35] O`Deal, J. J., Smyth, W.F., Palmer, R. F., *Electroanalytical Chemistry*, vol. 345, pp 287, 1993.