



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ELETROANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE PENICILINAS UTILIZANDO ELETRODO DE
COBRE**

GIOVANA ANCESKI BATAGLION

Florianópolis

Novembro/2009

Giovana Anceski Bataglion

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ELETROANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE PENICILINAS UTILIZANDO ELETRODO DE
COBRE**

Relatório apresentado ao
Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial da
disciplina de Estágio Supervisionado II
(QMC 5512)

Orientador: Almir Spinelli

Florianópolis
Novembro/2009

Giovana Anceski Bataglion

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ELETROANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE PENICILINAS UTILIZANDO ELETRODO DE
COBRE**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Almir Spinelli
Orientador

Prof. Iolanda da Cruz Vieira

Prof. Arlindo C. Felipe

Florianópolis
Novembro/2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a equipe do GEPEEA, Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos, situado no laboratório 310 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, onde este trabalho foi desenvolvido sob orientação do professor Almir Spinelli.

A Deus.

A UFSC.

Ao professor Almir Spinelli pela oportunidade dada para o desenvolvimento deste estudo e, sobretudo pela sua orientação.

A banca examinadora.

Aos meus pais e minha irmã.

Aos meus amigos.

Aos professores que colaboraram com a minha formação.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Antibióticos β - lactâmicos.....	3
2.2 Determinação analítica.....	4
2.3 Formação de complexos Cu^{2+} - antibióticos β -lactâmicos.....	4
2.4 Superfície do eletrodo de cobre: camada passivadora.....	5
2.5 Técnicas eletroanalíticas.....	8
2.5.1 <i>Voltametria cíclica</i>	9
2.5.2 <i>Técnicas de pulso: voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada</i>	10
2.6 Tratamento dos dados.....	12
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivos gerais.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4 METODOLOGIA.....	16

4.1 Reagentes.....	16
4.2 Célula e eletrodos.....	16
4.3 Equipamentos.....	17
4.4 Procedimento.....	17
4.4.1 <i>Estudo do eletrólito suporte</i>	17
4.4.2 <i>Estudo do pH</i>	17
4.4.3 <i>Estudo da concentração do eletrólito suporte</i>	18
4.4.4 <i>Estudo dos parâmetros instrumentais</i>	18
4.4.5 <i>Curva analítica</i>	19
4.4.6 <i>Amostras</i>	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1 Comportamento ciclovoltagemétrico do eletrodo de cobre.....	20
5.2 Efeito dos agentes complexantes β -lactâmicos.....	21
5.3 Efeito do pH.....	23
5.4 Efeito da concentração do eletrólito suporte.....	24
5.5 Análise da velocidade de varredura.....	25
5.5.1 <i>Estudo Eletroquímico</i>	26
5.6 Seleção da técnica de análise.....	29
5.7 Efeito da concentração do antibiótico β -lactâmico sobre a corrente anódica.....	31
5.7.1 <i>Curva analítica</i>	32
5.5.2 <i>Amostras</i>	34
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Estrutura química de algumas penicilinas importantes (González, 2005).....3
- FIGURA 2. Resposta voltamétrica do eletrodo de cobre em NaOH 0,10 mol L⁻¹; velocidade de varredura, 100 mV s⁻¹; (a) Cu(0)/Cu(I): -0,34 V; (b) Cu(I)/Cu(II): -0,11 V; (c) Cu (II)/Cu(I): -0,50 V e (d) Cu (I)/Cu(0): -0,81 V (Garcia, 2007).....6
- FIGURA 3. Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo e corrente resultante no voltamograma cíclico.....9
- FIGURA 4. Forma de aplicação do potencial (A) e voltamograma esquemático da voltametria de pulso diferencial (B).....11
- FIGURA 5. Forma de aplicação do potencial e voltamograma esquemático da voltametria de onda quadrada.....11
- FIGURA 6. Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre em a) tampão fosfato pH 7,0; b) KCl pH 5,8; c) tampão amônia pH 8,5 e d) NaOH pH 12,0. $v = 75 \text{ mV s}^{-1}$ 20
- FIGURA 7. Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre em tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ e pH 7,0 em a) ausência e b) em presença de antibiótico β -lactâmico ampicilina (1,0

x 10^{-5} mol L⁻¹). Condições: $v=75$ mV s⁻¹.....22

FIGURA 8. Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH a) 7,0; b) 8,10 e c) 9,25. Condições: $v=75$ mV s⁻¹.....23

FIGURA 9. Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre em a) tampão fosfato pH 7,0 variando a concentrações de 0,10 a 1,00 mol L⁻¹ e b) tampão fosfato pH 7,0 variando a concentrações de 0,10 a 1,00 mol L⁻¹ em presença de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ do antibiótico β -lactâmico ampicilina. Condições: $v=75$ mV s⁻¹.....24

FIGURA 10. Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre variando a velocidade de varredura em a) tampão fosfato 1,00 mol L⁻¹ pH 7,0 e b) em presença de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ do antibiótico β -lactâmico ampicilina.....25

FIGURA 11. Dependência da i_{pa} vs velocidade de varredura para os padrões de ampicilina e penicilina ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).....26

FIGURA 12. Variação do E_{pa} com a v para a oxidação de cobre em tampão fosfato na ausência e presença de padrões de ampicilina e penicilina ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).....27

Figura 13. Variação da i_{pa} com a $v^{1/2}$ para oxidação de cobre em tampão fosfato na ausência (a) e em presença (b) de padrões de ampicilina e penicilina ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).....27

Figura 14. Variação da função corrente com a v para a oxidação de cobre em

tampão fosfato na ausência (a) e em presença (b) de padrões de ampicilina e penicilina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).....28

Figura 15. Variação do $\log i_{pa}$ com o $\log v$ para a oxidação de cobre em tampão fosfato na ausência (a) e em presença (b) de ampicilina e penicilina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).....29

Figura 16. Voltamograma do eletrodo de cobre em tampão fosfato $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e na presença de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do antibiótico β -lactâmico penicilina realizado pela técnica de a) VPD ; $v=25 \text{ mV s}^{-1}$; AP=35mV;b)VOQ $f=75 \text{ Hz}$ e c) VC ; $v=100 \text{ mV s}^{-1}$ 30

Figura 17. Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de cobre em presença do antibiótico β -lactâmico a) ampicilina e b) penicilina, ambos em tampão fosfato $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 . Condições: $v=100 \text{ mV s}^{-1}$ 31

Figura 18. Ampliação dos voltamogramas cíclicos para o eletrodo de cobre em presença do antibiótico β -lactâmico a) ampicilina e b) penicilina, conforme apresentados acima.....31

Figura 19. Curva de calibração para a) padrão de antibiótico β -lactâmico ampicilina e b) padrão de antibiótico β -lactâmico penicilina, ambos em tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,032

Figura 20. Curva de adição de padrão e analítica para a) padrão de antibiótico β -lactâmico ampicilina e b) padrão de antibiótico β -lactâmico penicilina, ambos em tampão fosfato $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,034

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de validação obtidos a partir das curvas analíticas.....	33
Tabela 2. Resultados referentes à quantificação dos antibióticos ampicilina e penicilina nas amostras farmacêuticas.....	35
Tabela 3. Resultados referentes à recuperação dos antibióticos nas curvas de adição de padrão.....	36

ABREVIATURAS

Σ	somatória
μA	microamperé
μL	microlitro
B	inclinação da curva de calibração/coeficiente angular
SD_b	desvio padrão de dez leituras da corrente
RSD	desvio padrão relativo
E_{pc}	potencial de pico catódico
E°	potencial formal de redução
$i_{pa}v^{-1/2}$	função corrente anódica
i_{pa}	corrente de pico anódica
LD	limite de detecção
$\log v$	logaritmo da velocidade de variação do potencial
LQ	limite de quantificação
mg	miligrama
mV	milivolts
mVs^{-1}	milivolts por segundo
mol L^{-1}	mol por litro

n	número de medições, número de elétrons
nm	nanômetros
r	coeficiente de correlação
SCE	eletrodo de calomelano saturado
v	velocidade de variação do potencial
V	volts
VC	voltametria cíclica
VOQ	voltametria de onda quadrada
VPD	voltametria de pulso diferencial
vs	versus
X_i	valor individual de uma medição
X	medição aritmética de um pequeno número de medições
S1	primeira leitura da corrente em voltametria de pulso diferencial
S2	segunda leitura da corrente em voltametria de pulso diferencial
ΔE	amplitude de pulso de potencial da voltametria de pulso diferencial
i_c	corrente capacitiva
i_f	corrente faradaica
E_{OQ}	amplitude de pulso da voltametria de onda quadrada
E_{etapa}	potencial da etapa de rampa de potencial em degraus da voltametria de onda quadrada

$2E_{0Q}$ amplitude de pico a pico da onda quadrada

τ tempo de ciclo da onda quadrada

$1/\tau$ frequência da onda quadrada em Hz

RESUMO

O efeito complexante dos antibióticos β -lactâmicos frente ao íon cobre (II) possibilitou a utilização do eletrodo metálico para a determinação destas espécies em amostras farmacêuticas. Para o desenvolvimento da metodologia, foram estudadas as condições experimentais com a finalidade de conseguir melhores resultados, assim como os parâmetros intrínsecos de cada técnica utilizada. Os resultados obtidos sugerem que o método proposto responde de maneira eficiente na determinação de formulações farmacêuticas, oferecendo limites de detecção e quantificação dentro da faixa necessária. Entretanto, o método responde de maneira semelhante para os dois fármacos estudados.

Palavras chave: Penicilinas; Eletrodo de cobre; Complexos de cobre.

1. INTRODUÇÃO

Antibióticos são medicamentos amplamente empregados no tratamento de infecções bacterianas nos humanos assim como nos animais (Hernández, 2003). Até o momento foram encontrados mais de 40000 antibióticos e por volta de 80 estão em uso, eles apresentam estruturas diversas e por isso são separados por classes e grupos (Joshi, 2002). Dentre os diversos antibióticos, a classe dos β -lactâmicos age contra as infecções bacterianas inibindo a síntese protéica nos ribossomos das bactérias pela leitura errônea do código genético (Sher, 1997).

As penicilinas são um grupo de antibióticos que faz parte da classe dos β -lactâmicos e possui como estrutura básica um anel heterocíclico de cinco membros ligado a um anel β -lactâmico que apresenta diferentes substituintes dependendo do antibiótico (Hernández, 2003; Joshi, 2002). As chamadas penicilinas semi-sintéticas como a ampicilina e amoxicilina são mais resistentes a β -lactamase e são sintetizadas a partir do ácido 6-aminopenicilâmico que é obtido da cultura de *Penicillium chrysogenum* (Joshi, 2002).

Uma vez que os antibióticos atuam como importantes compostos bioativos e quimioterapêuticos, eles possuem importância na química medicinal, veterinária e indústria alimentícia.

A realização de um controle dos níveis de antibióticos se dá tanto pela necessidade de monitoramento dos resíduos destes em amostras biológicas e em alimentos assim como seu monitoramento em amostras farmacêuticas através do controle de qualidade seja em indústrias ou laboratórios de análise.

A análise de penicilinas e outros antibióticos é comumente realizada por ensaios biológicos, e mais recentemente por técnicas cromatográficas (Hernández, 2003; Joshi, 2002), entretanto as técnicas eletroanalíticas são pouco exploradas para a determinação de antibióticos como as penicilinas. Estas técnicas oferecem baixo custo de análise e pouco consumo de reagentes, sendo, portanto, uma opção para determinação destas substâncias.

As técnicas voltamétricas consistem na medida da corrente em função do potencial aplicado e recentemente tem sido utilizadas também na determinação de substâncias que não são eletroativas, uma vez que estas substâncias possam

interagir com a superfície eletródica como por exemplo através da complexação, onde a intensidade de corrente é alterada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

As penicilinas foram os primeiros antibióticos a serem usados no tratamento de infecções causadas por microorganismos gram positivos e gram negativos em humanos e animais. O grupo das penicilinas faz parte de uma classe de antibióticos chamados de β -lactâmicos e apresenta uma estrutura originada da fusão de um anel β -lactâmico com um segundo anel heterocíclico de cinco membros que é chamado de tiazolidina (Fig.1). Várias penicilinas e outros antibióticos são chamados de semi-sintéticos por apresentarem em uma parte da molécula, o ácido 6-aminopenicilâmico que é preparado a partir da penicilina G ou V e posteriormente através de síntese são introduzidos outros grupos na molécula (Joshi, 2002).

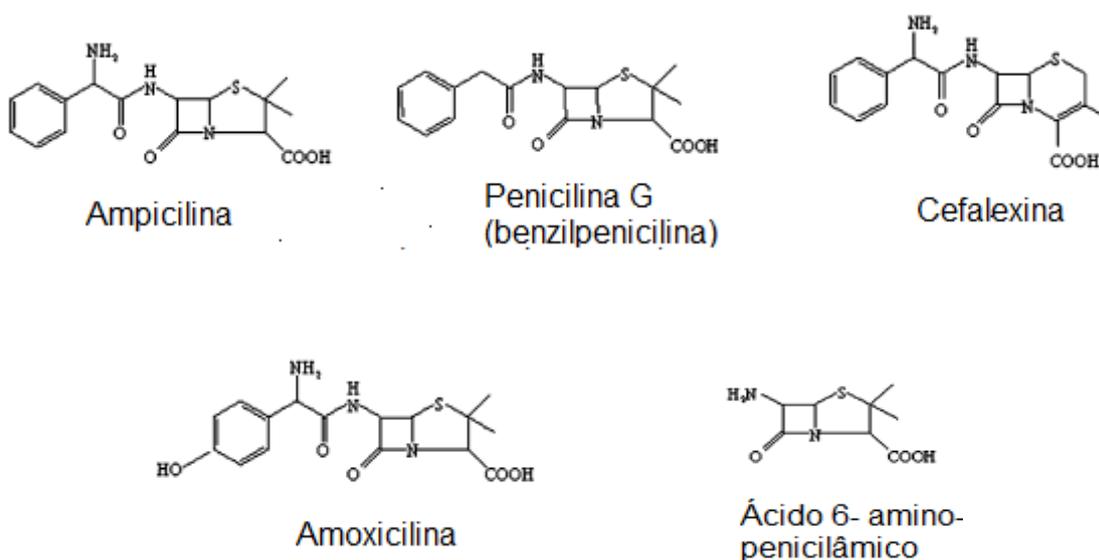


Figura 1: Estrutura química de algumas penicilinas importantes (González, 2005).

Os antibióticos exigem técnicas de análises sensíveis, uma vez que suas determinações são dificultadas pela composição das amostras como, por exemplo, excipientes em formulações farmacêuticas.

2.2 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA

A concentração de antibióticos β -lactâmicos tem sido extensivamente determinada por técnicas como cromatografia a gás, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e recentemente por eletroforese capilar (Hernández, 2003; Joshi, 2002). Técnicas eletroanalíticas para a determinação de antibióticos são raras na literatura; Belal cita a redução de antibióticos β -lactâmicos no eletrodo de gota pendente de mercúrio após o tratamento do analito com ácido nítrico e nitrito de sódio, processo chamado de derivatização (Belal, 1993).

As técnicas eletroanalíticas comumente permitem análise direta da amostra ou mesmo quando necessitam de um pré-tratamento, estes são mais rápidos e simples do que aqueles usados nas técnicas cromatográficas (Garcia, 2007). O eletrodo de mercúrio largamente utilizado vem sendo substituído por outras opções devido à toxicidade deste metal. Eletrodos sólidos oferecem uma janela eletroquímica com potenciais bem positivos o que os torna atrativos para a química analítica. Eletrodos de trabalho metálicos podem ser utilizados e a escolha do material depende do tipo de substâncias que se queira determinar (Garcia, 2007).

2.3 FORMAÇÃO DE COMPLEXOS Cu^{2+} - ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Nas estruturas químicas apresentadas (Fig.1) pode-se observar a presença de grupos funcionais que podem atuar como ligantes frente a íons metálicos.

O cobre é um metal de transição que apresenta configuração $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^1$ e pode apresentar mais de um estado de oxidação (I, II e III), entretanto o cátion cobre (II) é mais comum e estável e, portanto estes íons apresentam configuração d^9 com um elétron desemparelhado (Coutinho, 2009).

Os íons cobre (II) funcionam como biometais atuando como constituinte de enzimas e outras moléculas biologicamente ativas. No corpo humano os íons cobre II livres ou coordenados a proteínas, enzimas, aminoácidos, bases nucleicas, nucleotídeos, glicosídeos, nucleotídeos e outros bioligantes podem interagir com as penicilinas interferindo na ação do fármaco (Sher, 1997).

No trabalho de Sher, a complexação entre cobre e penicilinas foi investigada

por técnicas polarográficas e espectroscópicas devido esta interação possuir importância na alteração da atividade antimicrobiana quando o metal está presente (Sher, 1997). Foi observado neste trabalho que os antibióticos β -lactâmicos interagem com o íon metálico Cu^{2+} de modo a formar complexos com diferente número de coordenação. Foram observados complexos CuL e CuL_3 solúveis e CuL_2 precipitado (Sher, 1997).

Os polarogramas foram obtidos para diferentes antibióticos do grupo das penicilinas e o resultado foi semelhante, apenas diferenciando no deslocamento do potencial para a redução do complexo formado (Sher, 1997).

Outro trabalho realizado acerca da complexação do íon cobre com antibióticos β -lactâmico utiliza os métodos espectroscópicos e cinéticos para estudar o mecanismo de hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos catalizada pelo íon cobre (II) em meio ácido (González, 2005).

Trabalhos recentes relatam a utilização do eletrodo de cobre na determinação de aminoácidos e pesticidas como glifosato que interagem com o íon cobre II de modo a formar complexos resultando da dissolução da camada de óxido presente na superfície do eletrodo (Coutinho, 2009). Visto a existência de estudos que confirmam a formação de complexos entre os antibióticos do grupo das penicilinas com o íon cobre (II), também é esperado que a formação destes complexos resulte na dissolução da camada de óxido presente na superfície do eletrodo e conseqüentemente poder explorar o efeito da complexação na corrente anódica do metal para determinações analíticas.

2.4 SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE COBRE: CAMADA PASSIVADORA

Estudos voltamétricos em diferentes valores de pH a cerca da superfície metálica do cobre vem sendo realizados e sabe-se que a química deste processo é bem complexa (Lorimer, 2004). Para a utilização do eletrodo de cobre é necessário que o mesmo sofra um pré-tratamento onde na superfície do eletrodo é gerada uma camada de óxidos e hidróxidos de cobre que é chamada de camada passivadora (Sierra, 2008).

O estudo eletroquímico da superfície eletródica deve-se a importância das

espécies presentes na camada passivadora em processos electrocatalíticos em meios fortemente alcalinos. Um exemplo do efeito electrocatalítico do cobre está na sua utilização como detector electroquímico acoplado a técnicas cromatográficas, onde o metal em meio altamente alcalino age catalisando a reação de oxidação de alcoóis, aminoácidos e outros compostos polares pela formação da espécie cobre (III) que atua como mediador redox ente o analito e o eletrodo (Coutinho, 2009).

A utilização do eletrodo de cobre, porém vai além daquela citada para a determinação de espécies que oxidam, embora ainda existam poucos relatos, ele vem mostrando utilidade na determinação de substâncias complexantes que nas mesmas condições não se apresentam electroativas (Garcia, 2007).

Os princípios que norteiam a utilização do eletrodo de cobre na determinação de espécies complexantes estão baseados na formação/dissolução da camada de óxido/hidróxido na superfície do eletrodo quando este é submetido a uma varredura de potencial positivo. A formação da camada passivadora é fortemente afetada pelas condições da superfície do eletrodo, do meio iônico, do pH e da concentração de oxigênio (Coutinho, 2009).

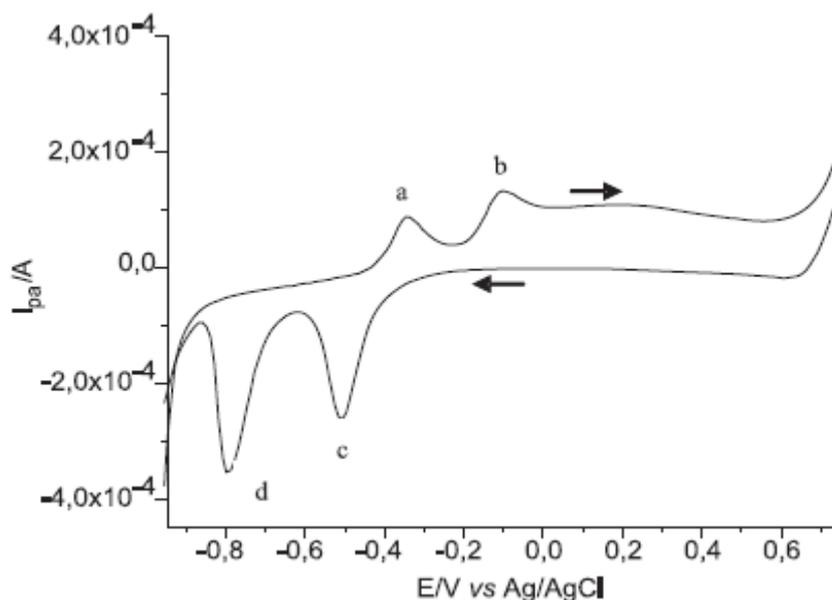


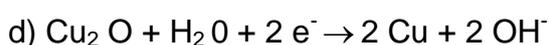
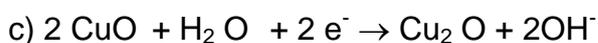
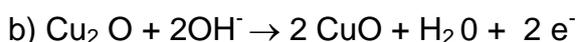
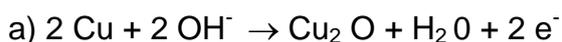
Figura 2: Resposta voltamétrica do eletrodo de cobre em NaOH 0,10 mol L⁻¹; velocidade de varredura, 100 mV s⁻¹; (a) Cu(0)/Cu(I): -0,34 V; (b) Cu(I)/Cu(II): -0,11 V; (c) Cu (II)/Cu(I): -0,50 V e (d) Cu (I)/Cu(0): -0,81 V (Garcia, 2007).

Propõe-se que a camada passivadora é composta por Cu/Cu₂O/CuO/Cu(OH)₂ e que estas espécies apresentam comportamento diferenciado dependendo do meio no qual estão inseridas (Lorimer, 2004).

Voltamogramas cíclicos (VC) obtidos em NaOH 0,1 mol L⁻¹ mostraram dois picos anódicos e dois picos catódicos (Fig.2) (Garcia, 2007).

O primeiro pico anódico (a) é atribuído à formação do óxido cuproso e o segundo pico anódico (b) é atribuído a formação de óxido cúprico. Após o pico de formação do óxido cúprico entende-se como formada a camada contendo óxido e hidróxido de Cu (II) e Cu (I) que é conhecida como camada passivadora. Na varredura negativa, tem-se a redução do óxido cúprico a óxido cuproso como mostrado no pico (c) e posteriormente a redução do óxido cuproso a cobre metálico no pico (d). (Garcia, 2007).

Em meio altamente alcalino, sugere-se que as seguintes reações envolvem o processo na superfície do eletrodo:



A presença de substâncias que formam complexos estáveis com os íons cobre e interagem com esta camada de óxido fazem com que a mesma seja dissolvida. O resultado deste processo é que o equilíbrio de formação da camada de óxido é deslocado para a formação do óxido (princípio de Le Chatelier) e a corrente de oxidação é aumentada proporcionalmente a quantidade de óxido que foi dissolvido (Coutinho, 2009). Diferentes substâncias atuam como ligantes para o cobre com maior ou menor potencialidade e isso resultará em uma diferença na magnitude da corrente anódica obtida.

Essa potencialidade pode ser compreendida a partir de aspectos termodinâmicos e cinéticos. O aspecto termodinâmico compreende a estabilidade do complexo formado e os aspectos cinéticos compreendem a velocidade de formação e dissolução do óxido, a velocidade a qual a espécie complexante é transportada da

solução para a superfície do eletrodo e a que o complexo formado é transportado para a solução (Sierra, 2008).

Um estudo realizado analisando o comportamento de diferentes substâncias complexantes com os íons cobre (II) dentre as quais estão o aminoácido glicina (percussor do glifosato), o herbicida glifosato e um produto de sua degradação apresenta a potencialidade do eletrodo de cobre na determinação de substâncias complexantes e apresenta claramente que as substâncias por terem estruturas diferentes resultam em magnitudes de correntes diferentes já que dissolvem a camada de óxido em diferentes proporções (Coutinho, 2009).

O presente trabalho é uma proposta de se estudar a utilização do eletrodo de cobre para a determinação de antibióticos do grupo das penicilinas, visto que o eletrodo já foi utilizado para a determinação de substâncias complexantes e que outros estudos mostram que as penicilinas também apresentam essa característica de atuar como ligante.

2.5 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

O comportamento do eletrodo de cobre na presença de penicilinas será estudado por técnicas eletroanalíticas que dependem da medida da corrente em função do potencial aplicado e, portanto são chamadas de técnicas voltamétricas (Skoog, 2002).

Os experimentos são realizados em uma célula que é constituída de três eletrodos imersos em uma solução contendo o analito e também um excesso de um eletrólito não reativo chamado de eletrólito suporte.

Um dos três eletrodos é chamado de eletrodo de trabalho, que neste sistema será o eletrodo metálico de cobre, cujo potencial em relação ao eletrodo de referência varia linearmente com o tempo (Skoog, 2007). Como eletrodo de referência será usado o sistema prata/cloreto de prata que tem o potencial constante de 0,199 V durante todo o experimento. O terceiro eletrodo é chamado de contra - eletrodo e é entre ele e o eletrodo de trabalho que a corrente flui na célula, um fio de platina pode ser usado para esta finalidade (Skoog, 2007).

Os experimentos eletroanalíticos são realizados em equipamentos chamados

de potenciostatos que são acoplados a um microcomputador, onde os sinais de excitação são gerados eletronicamente pela variação do potencial de maneira sistemática em relação ao eletrodo de referência e a corrente resultante é registrada. Desta maneira a variável independente é o potencial do eletrodo de trabalho contra o eletrodo de referencia e não o potencial entre o eletrodo de trabalho e o contra - eletrodo (Skoog, 2002).

2.5.1. VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica (VC), embora não seja utilizada com freqüência para a determinação quantitativa, é de extrema importância para o estudo da reversibilidade das reações redox, na detecção de intermediários de reação e nos estudos de produtos formados no decorrer de uma reação (Nicholson, 1964).

Nesta técnica a varredura de potencial é feita em uma direção e posteriormente o sentido da varredura é invertido (sinal de excitação triangular), enquanto a corrente é medida, resultando no voltamograma cíclico apresentado na figura (3) (Skoog, 2002).

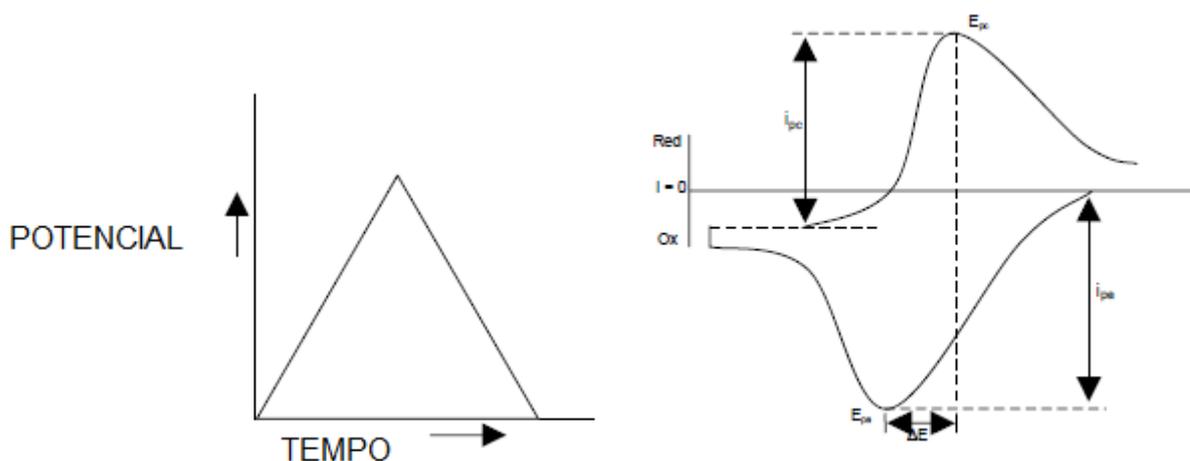


Figura 3: Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo e corrente resultante no voltamograma cíclico.

Portanto pretende-se por esta técnica avaliar o efeito da velocidade de varredura no sistema. Este parâmetro permite através da equação de Randles Sevcik (1), avaliar se o processo na superfície do eletrodo se dá por difusão ou

adsorção. E ainda através do estudo da velocidade consegue-se verificar a formação de algum intermediário que em outras condições não podem ser detectados, assim como a reversibilidade do sistema que é dependente da velocidade de varredura (Nicholson, 1964).

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

A equação (1) mostra que para um sistema eletroquímico ideal a corrente de pico é proporcional a concentração (C) da espécie oxidada ou reduzida dada em (mol cm^{-3}), onde (n) é o número de elétrons por molécula oxidada ou reduzida, (A) é a área do eletrodo dada em (cm^2), (ν é a velocidade de varredura do potencial em (V s^{-1}) e (D) é o coeficiente de difusão das espécies nas unidades ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$).

2.5.2 TÉCNICAS DE PULSO: VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL E VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

As técnicas de pulso são baseadas na cronoamperometria, ou seja, na medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. As características da corrente medida estão relacionadas tanto com a largura do pulso quanto com o degrau de potencial que é aplicado no eletrodo para promover o processo faradaico (Souza, 2003).

Nestas técnicas de pulso, a perturbação do potencial do eletrodo não é uma função linear do tempo do experimento, sendo que a sistemática para a variação de potencial segue uma seqüência de pulsos de potenciais, cujas respostas de corrente obtidas dependem de como estes pulsos são aplicados. E é esta diferença na maneira de aplicar os pulsos de potencial que define as características básicas de cada uma destas técnicas (Souza, 2003).

Na voltametria de pulso diferencial os pulsos são superpostos a uma rampa linear de potencial ou superpostos a um sinal em forma de degrau. Nesta técnica além do parâmetro velocidade de varredura, há o efeito de duração, modulação e

amplitude do pulso de potencial (Skoog, 2007).

Nas técnicas de pulso a corrente é medida antes da aplicação do pulso e no final deste, sendo assim as correntes são subtraídas visto que a primeira corrente lida é referente à contribuição da corrente capacitiva e a segunda é a contribuição da corrente faradaica (Fig.5).

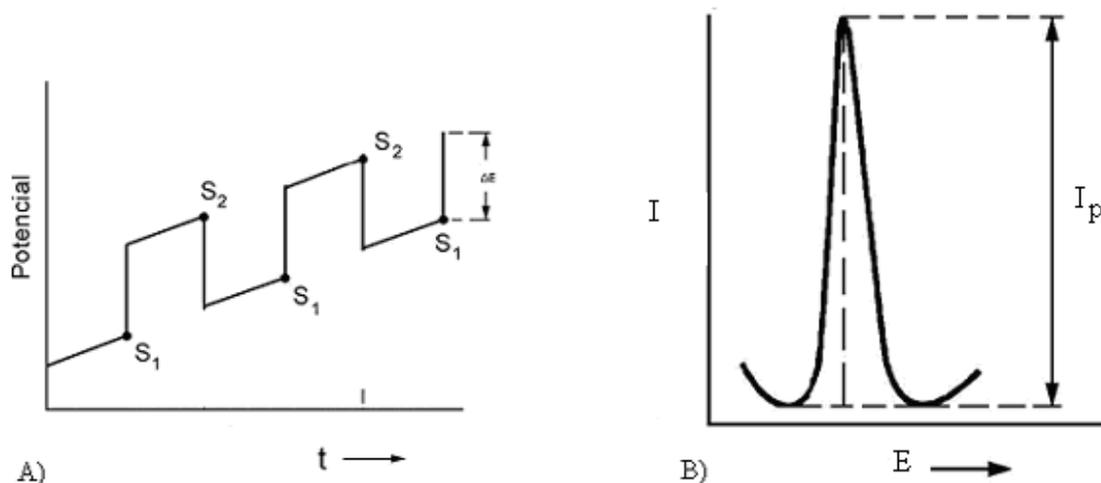


Figura 4: Forma de aplicação do potencial (A) e voltamograma esquemático da voltametria de pulso diferencial (B).

Uma vez que se deseja somente a corrente faradaica que é a corrente referente à reação de oxidação/redução da espécie de interesse, lendo a corrente no final do pulso tem-se que a corrente capacitiva é significativamente reduzida e a razão sinal ruído aumenta resultando em uma maior sensibilidade (Skoog, 2007).

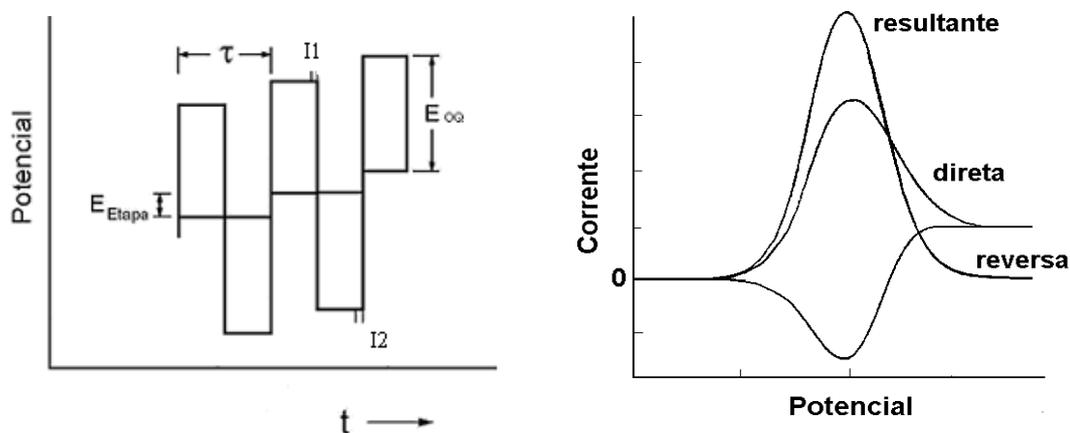


Figura 5: Forma de aplicação do potencial e voltamograma esquemático da voltametria de onda quadrada.

A voltametria de onda quadrada também reduz a corrente capacitiva e, portanto apresenta maior sensibilidade devido os pulsos em duas direções (Fig. 5). A técnica pode ser utilizada para estudos mecanísticos assim como a voltametria cíclica, porém com a vantagem da maior sensibilidade (Skoog, 2008).

Nesta técnica, os parâmetros são basicamente os mesmos da voltametria de pulso diferencial com o acréscimo da frequência.

Para a determinação dos fármacos, o procedimento a ser realizado consiste em aplicar uma varredura de potencial na direção positiva, no intervalo em que se observará o pico de oxidação para o cobre. As medidas serão realizadas sem desoxigenar a solução, pois a formação da camada de óxido é dependente da quantidade de oxigênio disponível no meio.

2.6. TRATAMENTO DOS DADOS

A relação entre o sinal obtido e a concentração da espécie de interesse será avaliada através da construção de uma curva analítica, onde as soluções são preparadas a partir de um padrão.

A partir dos dados obtidos e também da curva analítica pode-se avaliar os parâmetros de validação do IMMETRO e da ANVISA que são normalmente: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (Ribani, 2004).

A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Pode-se analisar a concordância entre as curvas obtidas pelo método de adição de padrão e pela calibração analítica, onde o comportamento paralelo entre as linhas de regressão sugere que o método tem seletividade (Ribani, 2004).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma faixa de aplicação. Essa relação de proporção é normalmente expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica, onde o coeficiente de correlação permite uma estimativa da qualidade da curva. O intervalo de concentração onde se fizer verdadeira a equação da reta $y = ax + b$ é conhecido como faixa linear dinâmica

(Ribani, 2004).

A precisão representa a dispersão dos resultados obtidos em ensaios diferentes e será avaliada pela estimativa do desvio padrão absoluta (s), pelo intervalo de confiança média ou ainda pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD) conforme as equações abaixo (2 e 3) (Ribani, 2004).

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

A exatidão do método pode ser analisada através de ensaios de recuperação, onde se adiciona uma substância na amostra e então determina-se a recuperação que é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. O composto adicionado pode ser o padrão da substância de interesse adicionado à amostra (Ribani, 2004).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) serão avaliados neste trabalho através dos parâmetros da curva analítica, ou seja, através das seguintes equações (4 e 5), onde B é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

$$\text{LD} = \frac{3 \text{SD}_b}{B} \quad (4)$$

$$\text{LQ} = \frac{10 \text{SD}_b}{B} \quad (5)$$

O método a ser utilizado para a quantificação do composto de interesse será o método de adição de padrão. Este consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra que será analisada no momento do seu preparo. Este método é de grande importância principalmente para análise de amostras complexas, onde os efeitos de matriz são importantes e não se tem um padrão interno satisfatório ou uma matriz isenta da substância de interesse (Ribani, 2004).

A partir dos voltamogramas obtidos, constrói-se uma curva de adição de padrão relacionando as quantidades da substância adicionada a amostra com as

respectivas correntes de pico obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à corrente de pico da substância que esta sendo determinada, sem qualquer adição de padrão. A extrapolação da reta define no eixo das abcissas, a concentração da substância analisada (Ribani, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo principal do trabalho é utilizar o eletrodo de cobre para determinar o teor de antibiótico β -lactâmico em formulações farmacêuticas através de técnicas voltamétricas como voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo determinado, serão realizadas as seguintes etapas específicas:

- ✓ A verificação da habilidade complexante do íon cobre frente ao analito.
- ✓ Estudo das condições experimentais como o tipo de eletrólito suporte, a concentração do mesmo e pH.
- ✓ Avaliação dos parâmetros instrumentais que também influenciam na sensibilidade do método e, portanto serão avaliados nas condições experimentais determinadas previamente. Estes parâmetros incluem a velocidade de varredura de potencial na voltametria cíclica e nas técnicas de pulsos, tem-se ainda a altura de pulso e incremento de potencial e particularmente para a voltametria de onda quadrada, analisa-se o efeito da frequência do pulso.
- ✓ Estudo eletroquímico pretende-se conhecer as reações que ocorrem na superfície do eletrodo, o efeito dos mecanismos de transporte das espécies na solução, assim como a possível detecção de espécies intermédias.
- ✓ Comparação das técnicas voltamétricas na determinação dos antibióticos.
- ✓ Construção de curvas analíticas para verificar a relação de linearidade entre concentração da substância na forma de padrão e resposta obtida a fim de determinar a concentração do analito em uma formulação farmacêutica.
- ✓ O trabalho visa ainda tratar os dados coletados através dos parâmetros de validação de método do IMMETRO e ANVISA.

4 METODOLOGIA

4.1 REAGENTES

Para o preparo das soluções foi utilizada água destilada e desionizada com um sistema de purificação Micro química MQAMA301.

Os reagentes cloreto de potássio (KCl), cloreto de amônio (NH₄Cl), hidróxido de sódio (NaOH), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e dibásico (K₂HPO₄) foram adquiridos da Vetec e o reagente amônia (NH₃) utilizado foi adquirido da Synth.

Solução de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ foi utilizada para correção do pH das soluções tampão.

As soluções de eletrólitos suporte foram preparadas na concentração de 0,5 mol L⁻¹ para o estudo do melhor meio. Posteriormente, o sistema (KH₂PO₄/K₂HPO₄) foi preparado na concentração de 1,0 mol L⁻¹ e diluído conforme a necessidade.

Os padrões dos antibióticos β-lactâmicos ampicilina e penicilina foram adquiridos da Sigma e Fluka, respectivamente. Os padrões dos antibióticos assim como as soluções de trabalho na concentração de 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ foram armazenados em temperatura abaixo de 10°C durante todo o trabalho.

As amostras utilizadas foram os antibióticos ampicilina e penicilina, genéricos da marca Eurofarma®, apresentados na forma de cápsulas gelatinosas de 500 mg, adquiridos em farmácia comercial e utilizados para a determinação analítica.

4.2 CÉLULA E ELETRODOS

Os testes voltamétricos foram realizados em uma célula com capacidade para um volume de 15 mL com três eletrodos (trabalho, auxiliar e referência).

Como eletrodo de trabalho foi utilizado disco de cobre de área geométrica 2 cm² que foi moldado em resina epóxi Araldite® até atingir a forma de um bastão. Os eletrodos de referência e auxiliar são respectivamente, um eletrodo Ag/AgCl e um fio de platina. A limpeza da superfície do eletrodo de trabalho foi realizada antes de

cada teste. O eletrodo era polido até o brilho especular com uma lixa d'água de granulometria 1200, polido em alumina Arotec 0,5 μ , limpo em banho de ultra-som, lavado com água destilada e seco.

4.3 EQUIPAMENTOS

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato Modelo 263A EG&G PAR acoplado a microcomputador usando o software M270 para aquisição e análise dos dados.

Foi utilizado também uma balança analítica Shimadzu Libror AEX 200G para pesagem das substâncias e um potenciômetro ORION Modelo 720A para realizar as medidas de pH. Um ultra-som METASOM-14 foi utilizado para a limpeza do eletrodo de trabalho e homogeneização das soluções.

Micropipeta de precisão Labmate Soft 10-100 μ L e 100-1000 μ L e um agitador magnético FANEM Modelo 257 foram utilizadas, respectivamente, para a adição e homogeneização do sistema.

4.4 PROCEDIMENTO

4.4.1 ESTUDO DO ELETRÓLITO SUPORTE

Para a escolha do melhor eletrólito suporte foram obtidos voltamogramas cíclicos a uma velocidade de varredura de 75 mV s⁻¹ nos potenciais de -1,0 a 1,0 V em 10 mL de diferentes soluções - KCl, NH₄Cl / NH₃, NaOH e KH₂PO₄ / K₂HPO₄, todas na concentração de 0,5 mol L⁻¹.

Após cada ensaio a superfície do eletrodo era limpa conforme descrito no item 4.2.

4.4.2 ESTUDO DO pH

Para o sistema que apresentou melhor resposta no item 4.4.1, foi avaliado o efeito do pH na faixa de 7,0 a 9,25, novamente rodando voltamogramas cíclicos nos

potenciais de -1,0 a 1,0 V na velocidade já usada anteriormente.

4.4.3 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DO ELETRÓLITO SUPORTE

O estudo da concentração do eletrólito suporte foi realizado para a solução que apresentou melhor resposta no item 4.4.1 e também 4.4.2. Na mesma velocidade de varredura (75 mV s^{-1}), a avaliação da concentração do eletrólito suporte foi realizada na faixa de 0,1 a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Para a análise da concentração do eletrólito suporte foram repetidos os voltamogramas também na presença de ampicilina ou penicilina, adicionando-se $10 \mu\text{L}$ da solução padrão $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ do respectivo antibiótico.

4.4.4 ESTUDO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS

Determinados o eletrólito suporte, o pH do meio e a concentração do eletrólito que apresentam melhor resposta, foram avaliados os parâmetros instrumentais das técnicas de voltametria cíclica, de pulso diferencial e de onda quadrada.

Para a voltametria cíclica, estudou-se o efeito da velocidade na faixa de 25 a 175 mV s^{-1} . Para cada velocidade era utilizada uma solução de 10 mL do eletrólito suporte e obtido o respectivo voltamograma no potencial de -1,0 a 1,0 V, posteriormente adicionava-se $10 \mu\text{L}$ de uma solução $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ do padrão do analito e registrava-se o voltamograma novamente. O procedimento foi realizado para a ampicilina e penicilina.

Para a técnica de pulso diferencial, realizou-se um estudo da influência dos parâmetros amplitude de pulso e velocidade de varredura de potencial. A amplitude de pulso de potencial foi variada de 5 a 35 mV e após a verificação do valor ótimo, variou-se a velocidade de varredura de potencial de 5 a 25 mV. Para os dois parâmetros o procedimento era registrar o voltamograma para a solução de tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0 que atua como branco e posteriormente adicionava-se $10 \mu\text{L}$ de uma solução $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ do padrão do fármaco. O procedimento foi realizado para os dois fármacos em estudo.

Para a técnica voltametria de onda quadrada, variou-se a frequência de 5 a

100 Hz. O procedimento era registrar o voltamograma para a solução de tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0 que atua como branco e posteriormente adicionava-se $10 \mu\text{L}$ de uma solução $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ do padrão do fármaco, assim como nos estudos para a voltametria de pulso diferencial. O procedimento novamente foi realizado para os dois fármacos em estudo.

4.4.5 CURVA ANALÍTICA

Após a verificação da melhor técnica e os parâmetros otimizados para sua aplicação, foram construídas as curvas analíticas referentes a soluções padrão de ampicilina e penicilina. Para tal, preparou-se uma solução estoque de cada um dos padrões na concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em água desionizada. A partir desta solução, obteve-se a solução trabalho na concentração final de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Realizou-se um voltamograma somente para o tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0 como branco e, em seguida, adicionava-se $10 \mu\text{L}$ do padrão do analito, agitava-se a solução por 60 s e novamente registrava-se o voltamograma até obter-se a curva analítica.

4.4.6 AMOSTRAS

Para a análise das amostras de penicilina e ampicilina, ambas da marca Eurofarma® na forma de cápsulas gelatinosas de 500mg, foi pesado o conteúdo de uma cápsula do medicamento e em um grau a amostra foi finamente homogeneizada com pistilo. Após pesou-se a quantidade apropriada para preparação de uma solução do antibiótico que tivesse concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. A curva de adição de padrão foi construída obtendo um voltamograma para a solução de tampão fosfato e em seguida adicionou $10 \mu\text{L}$ da solução da amostra do medicamento e posteriormente adicionava $10 \mu\text{L}$ da solução de padrão do respectivo fármaco. Destacando que a cada adição da amostra ou padrão, o sistema ficava sob agitação por 60 s.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPORTAMENTO CICLOVOLTAMÉTRICO DO ELETRODO DE COBRE

A escolha do eletrólito suporte é de extrema importância para os estudos eletroquímicos e eletroanalíticos, e sua escolha deve considerar alguns aspectos como por exemplo a estabilidade química e eletroquímica, ou seja, as espécies químicas do eletrólito suporte não devem reagir com as outras espécies presentes na solução e também não devem sofrer reações de oxidação e redução em toda faixa de potencial de interesse (Agostinho, 2004). Os gráficos (Fig.6) ilustram o comportamento eletroquímico do eletrodo de cobre em diferentes soluções de eletrólito suporte pela técnica de voltametria cíclica, com velocidade de variação de potencial de 75 mV s^{-1} . Os eletrólitos suporte estudados foram o tampão fosfato, KCl, tampão amônio e NaOH, todos na concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

O comportamento ciclovoltagemétrico obtido para o eletrodo de cobre nos meios estudados sugeriu que o melhor meio para estudar o efeito da complexação é o tampão fosfato, sendo que neste eletrólito a varredura de oxidação apresentou somente um pico, o que é desejável, pois a presença de outros picos próximos pode interferir no resultado obtido.

Para uma reação eletródica ser considerada reversível, os valores de i_{pa} e i_{pc} devem ser aproximadamente iguais em módulo e a diferença entre E_{pa} e E_{pc} deve ser dada pela equação 6, onde n é o número de elétrons que participam da reação (Baldwin, 1984).

$$\Delta_p = |E_{pa} - E_{pc}| \cong 0,059 / n \quad (6)$$

Os valores encontrados para i_{pa} e i_{pc} são 313 e $412 \mu\text{A}$, respectivamente, e para E_{pa} e E_{pc} são 85 e 293 mV , respectivamente, o que sugere uma reação irreversível pois tanto a razão entre i_{pa} e i_{pc} não é um, assim como a diferença entre os potenciais de picos não obedece a equação 6. Também é observado no próprio voltamograma (a) que a varredura de oxidação apresenta somente um pico e já a

varredura de redução apresenta dois picos de diferentes magnitudes, aspecto característico de processos irreversíveis.

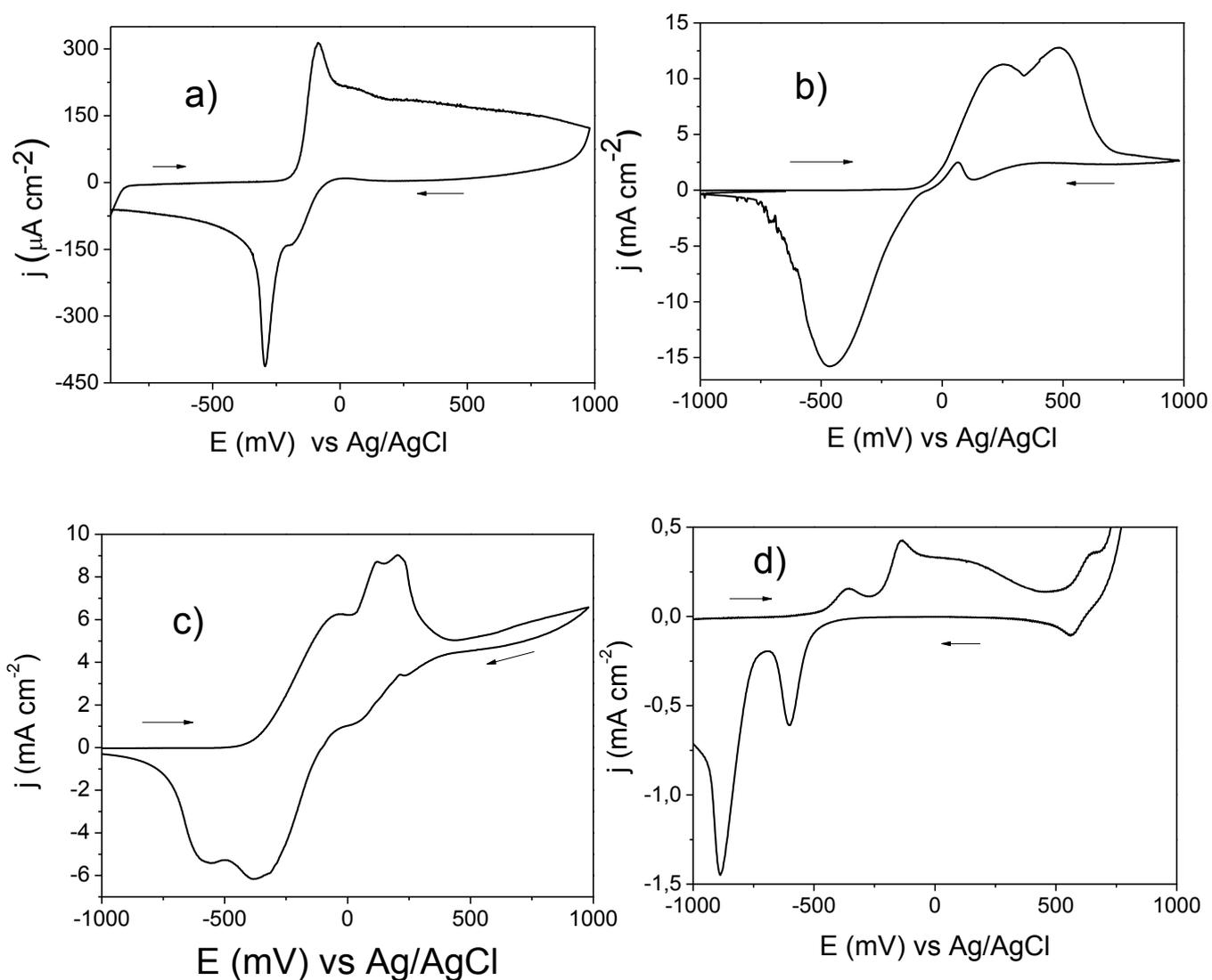


Figura 6: Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre em a) tampão fosfato pH 7,0; b) KCl pH 5,8; c) tampão amônia pH 8,5 e d) NaOH pH 12,0. $v = 75 \text{ mV s}^{-1}$.

5.2 EFEITO DOS AGENTES COMPLEXANTES β -LACTÂMICOS

No voltamograma cíclico registrado em tampão fosfato verificou-se um único pico anódico e dois picos catódicos (Fig. 7). O pico anódico indica a oxidação do

cobre metálico a cobre (II) formando o óxido cúprico, e a ausência de outro pico de oxidação indica que não há a formação de cobre (I), portanto a princípio indica a não formação de óxido cuproso na camada passivadora. A varredura contrária, no sentido da redução, entretanto, apresenta dois picos, o primeiro sendo atribuído a redução de cobre (II) a cobre (I), ou seja, óxido cúprico indo à óxido cuproso, e o segundo pico sendo atribuído a redução do óxido cuproso (cobre I) a cobre metálico.

Outro aspecto que influenciou a escolha do melhor eletrólito suporte para o trabalho foi a formação do complexo entre o íon Cu^{2+} com o antibiótico. É observado (Fig. 7) que a presença de antibiótico β -lactâmico resulta em um aumento na corrente anódica em relação ao eletrólito suporte sem o antibiótico. Portanto o tampão fosfato foi utilizado para todos os ensaios posteriores.

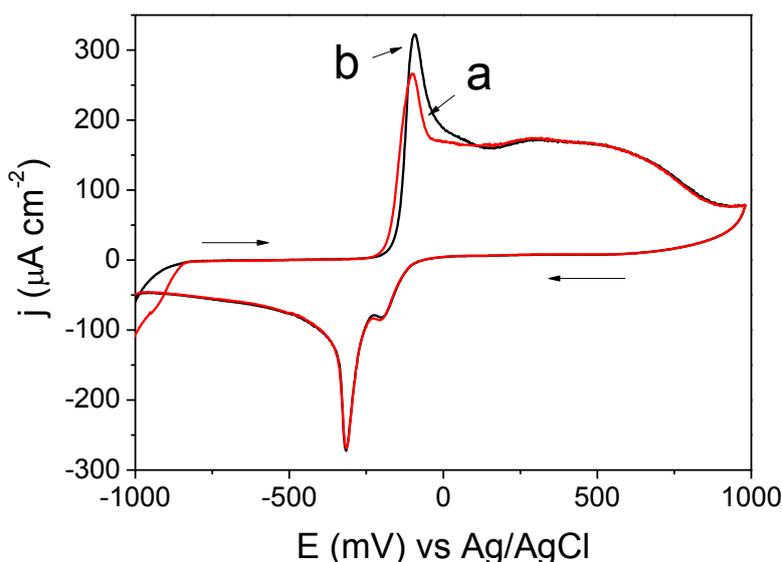


Figura 7: Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre em tampão fosfato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0 em a) ausência e b) presença de antibiótico β -lactâmico ampicilina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Condições: $v = 75 \text{ mV s}^{-1}$.

Pode-se interpretar o aumento de corrente anódica como sendo resultado do deslocamento do equilíbrio de formação da camada de óxido no sentido dos produtos, já que na presença do antibiótico, o Cu^{2+} presente na camada passivadora da superfície do eletrodo é complexado.

5.3. EFEITO DO pH

Destacando que o eletrodo de cobre não é um eletrodo inerte e, portanto pode reagir com o meio o qual está em contato, realizou-se o estudo do melhor pH para o processo. As análises foram feitas somente em pH neutro ou acima deste pois a camada de óxido é dissolvida em pH ácido, e portanto, o estudo não faria sentido. Foi estudado o comportamento do eletrodo de cobre no pH de 7,0 a 9,25 como mostrado (Fig. 8) e devido aos resultados obtidos, valores maiores de pH não foram estudados.

Os voltamogramas mostram que a corrente de pico anódica praticamente não se altera com o aumento do pH e além disso, há uma pior definição do pico de oxidação do cobre e portanto, o tampão fosfato pH 7,0 mostrou ser o melhor meio para o estudo e as análises posteriores foram realizadas neste meio.

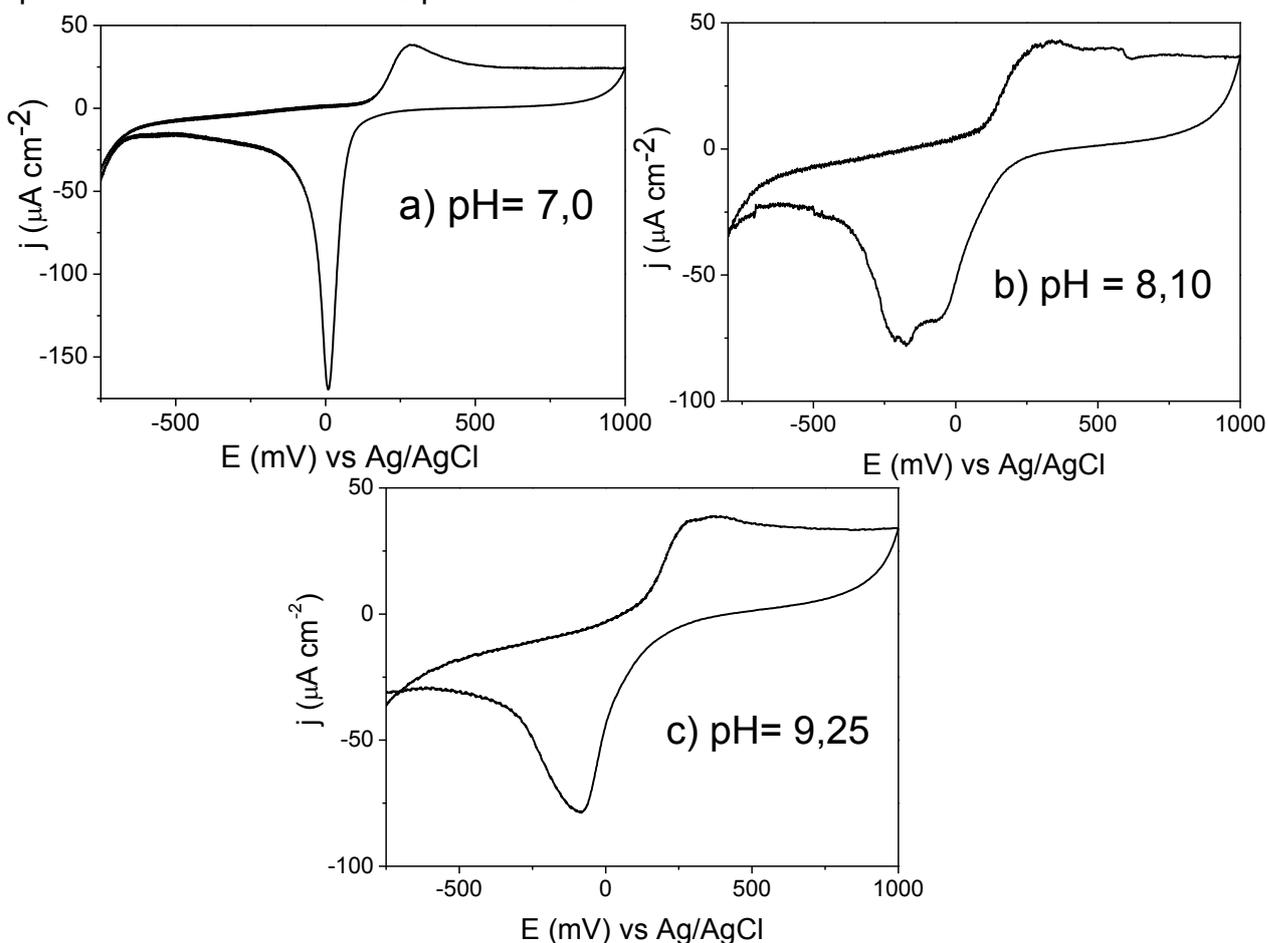


Figura 8: Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH a) 7,0; b) 8,10 e c) 9,25. Condições: $v = 75 \text{ mV s}^{-1}$.

5.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO ELETRÓLITO SUPORTE

O eletrólito suporte é um eletrólito que quando adicionado em altas concentrações pode conferir à solução e à interface em estudo uma série de propriedades. Estas propriedades são resultado da manutenção da força iônica alta e constante da solução, portanto o estudo da concentração do eletrólito suporte é de grande importância (Agostinho, 2004).

Neste trabalho avaliou-se o efeito da concentração do eletrólito suporte variando a mesma na faixa de 0,10 a 1,0 mol L⁻¹ e os resultados obtidos estão apresentados abaixo (Fig.9).

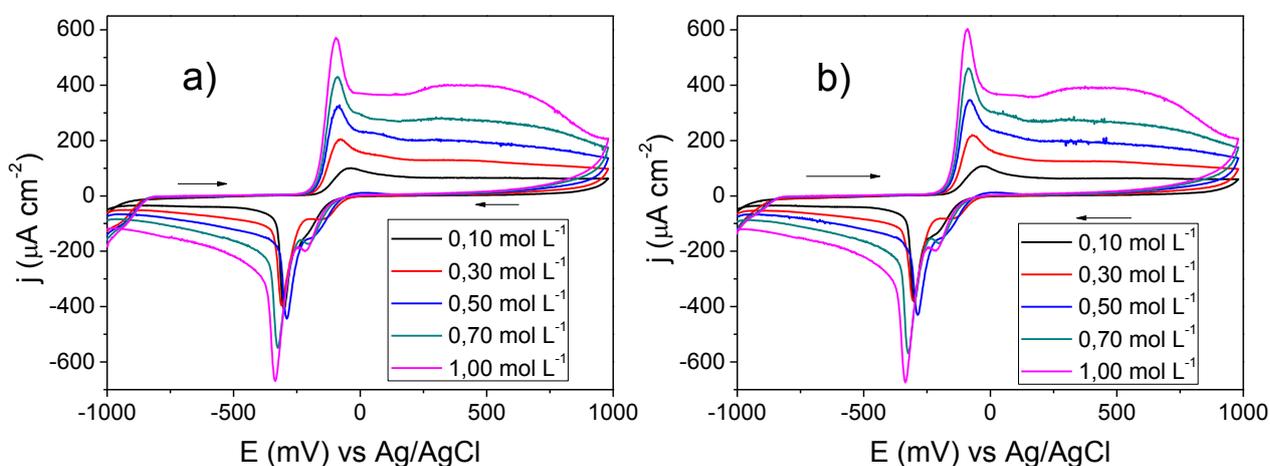


Figura 9: Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre em a) tampão fosfato pH 7,0 variando a concentrações de 0,10 a 1,00 mol L⁻¹ e b) tampão fosfato pH 7,0 variando a concentrações de 0,10 a 1,00 mol L⁻¹ em presença de 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ do antibiótico β -lactâmico ampicilina. Condições: $\nu = 75 \text{ mV s}^{-1}$.

O estudo foi realizado na ausência e presença do antibiótico β -lactâmico, pois além da reação de óxido-redução, há reações químicas associadas à formação da camada de óxidos na superfície do eletrodo e também a reação de complexação que é a reação de interesse, embora esta última apresente dependência das anteriores.

Foi observado nos voltamogramas que conforme a concentração do eletrólito suporte era aumentada, também as diferenças de i_{pa} observadas entre o branco

(voltamograma a) e o antibiótico (voltamograma b) eram maiores e, portanto a concentração do tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi definida como a solução de trabalho e utilizada para os estudos posteriores. Vale ressaltar que os dois antibióticos (ampicilina e penicilina) apresentaram resultados semelhantes.

5.5 EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA DE POTENCIAL

Após as condições experimentais estabelecidas, realizou-se a variação dos parâmetros instrumentais. Na voltametria cíclica, o estudo da velocidade de varredura é importante para definir parâmetros que resultem em um pico com maior corrente e definição, mas também é importante para realizar o estudo eletroquímico do sistema. Foram realizados voltamogramas cíclicos na faixa de velocidades de 25 a 175 mV s^{-1} e os resultados obtidos são apresentados abaixo (Fig.10).

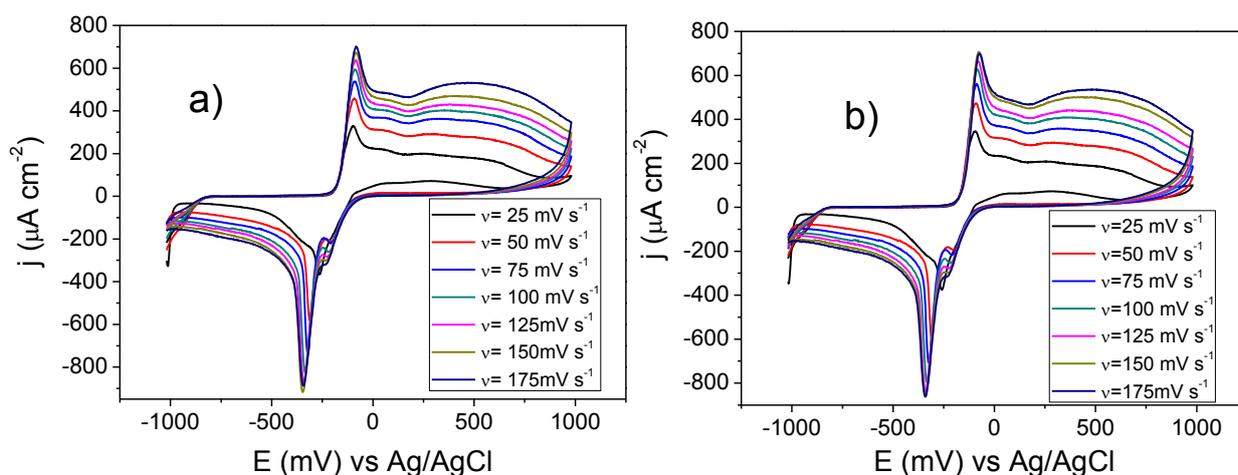


Figura 10: Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre variando a velocidade de varredura em a) tampão fosfato $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e b) em presença de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do antibiótico β -lactâmico ampicilina.

Para um sistema reversível, a intensidade da i_{pa} aumenta linearmente com o aumento da velocidade conforme com a equação de Randles Sevcik (equação 1). Os dados obtidos mostram que o sistema não segue perfeitamente este comportamento (Fig.11) e apesar da melhor definição do pico em velocidades maiores, a diferença entre a corrente do branco (tampão fosfato) e a corrente na presença do analito é crescente apenas até a velocidade de 100 mV s^{-1} (Fig. 11).

Portanto, esta foi a velocidade escolhida para dar continuidade ao trabalho.

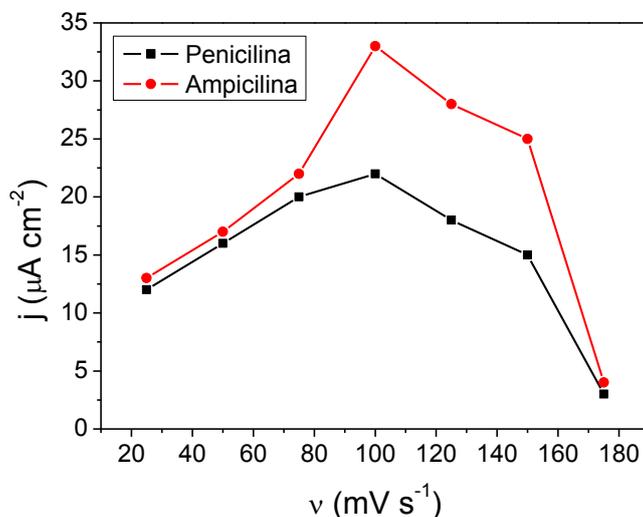


Figura 11: Dependência da i_{pa} vs velocidade de varredura para os padrões de ampicilina e penicilina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

5.5.1 ESTUDO ELETROQUÍMICO

Para sistemas reversíveis o E_{pa} não depende da v , entretanto sistemas que apresentam alguma reação de transferência eletrônica irreversível ou reação de transferência eletrônica perturbada por uma reação química acoplada mostram um comportamento diferente, onde há deslocamento do E_{pa} com o aumento da v . Os dados obtidos experimentalmente (Fig.12) mostram o comportamento esperado para processos irreversíveis.

O gráfico obtido a partir dos valores de i_{pa} em função $v^{1/2}$ para o eletrodo de cobre em tampão fosfato (Fig. 13 a) mostra que a corrente aumenta com $v^{1/2}$, embora exista um desvio da linearidade. Um comportamento linear representa um processo controlado por difusão. Para o eletrodo de cobre em tampão fosfato e em presença dos antibióticos β -lactâmicos (Fig. 13 b), entretanto nota-se que há aumento da corrente para as velocidades até 100 mV s^{-1} , embora o comportamento apresente um leve desvio da linearidade, mostrando que o processo é controlado por difusão

até a velocidade de 100 mV s^{-1} , e posteriormente o sistema apresenta um comportamento irregular devido o efeito de complexação não estar sendo mais favorecido. O comportamento em velocidades maiores que 100 mV s^{-1} , entretanto, é decrescente, pois a partir desta v já não há tanto aumento de corrente atribuído ao efeito de complexação.

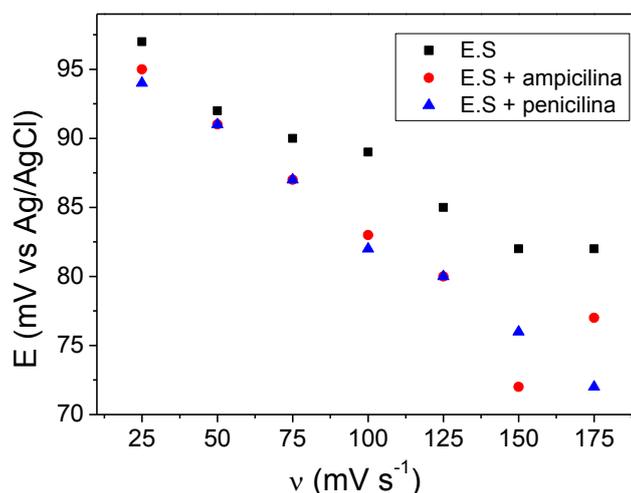


Figura 12: Variação do E_{pa} com a v para a oxidação de cobre em tampão fosfato na ausência e em presença de padrões de ampicilina e penicilina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

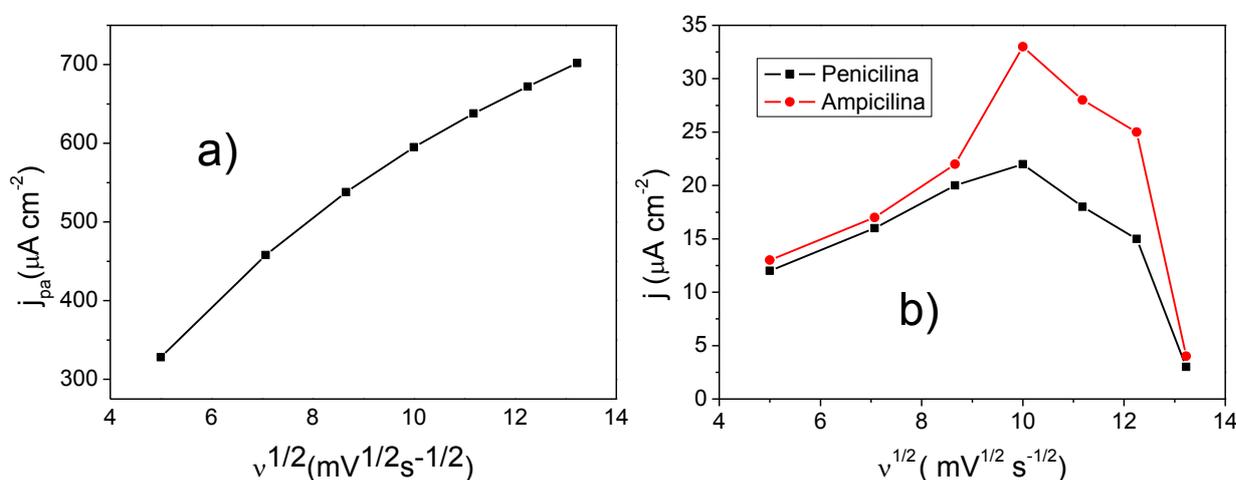


Figura 13: Variação da i_{pa} com a $v^{1/2}$ para oxidação de cobre em tampão fosfato na ausência (a) e em presença (b) de padrões de ampicilina e penicilina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

A análise da função corrente ($i_{pa} v^{-1/2}$) vs v é uma outra alternativa para estudar

o processo na superfície do eletrodo. A função corrente é independente de v , ou seja, é constante para processos reversíveis e irreversíveis. Porém, quando existe reação química envolvida, há uma variação desta função e ela pode ser crescente ou decrescente. Analisando (Fig.14 a) pode-se notar que para o eletrodo de cobre em tampão fosfato o resultado é concordante com a teoria, ou seja, há reação química envolvida no processo. E ainda, em presença do analito (Fig. 14 b) tem-se um comportamento também decrescente evidenciando também a presença de reações químicas envolvidas no sistema.

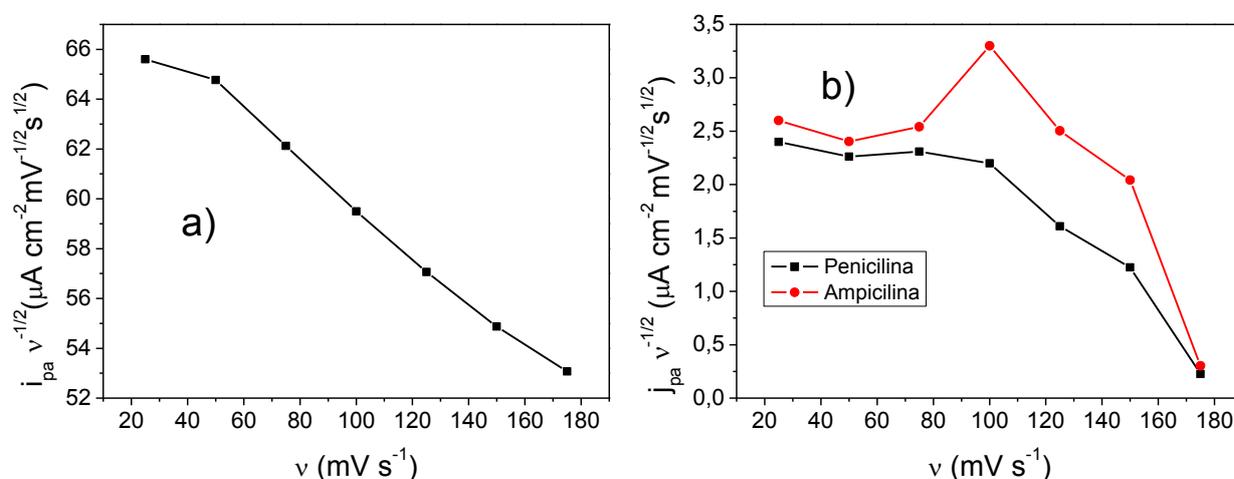


Figura 14: Variação da função corrente com a v para a oxidação de cobre em tampão fosfato na ausência (a) e em presença (b) de padrões de ampicilina e penicilina ($1,0 \times 10^{-5} mol L^{-1}$).

Através do estudo eletroquímico também é possível avaliar o transporte de massa na interface eletrodo/solução através da variação do logaritmo da i_{pa} em função do logaritmo da v . Teoricamente, um comportamento linear com coeficiente angular próximo a 1,0 indica que o processo é controlado por adsorção e valores próximos a 0,5 indicam que o processo é controlado por difusão.

Para o sistema cobre em tampão fosfato sem adição de analito, a inclinação da reta encontrada foi de 0,39, o que caracteriza um sistema controlado por difusão, e em presença de ampicilina e penicilina os valores encontrados foram 0,48 e 0,46 respectivamente, o que também caracteriza um processo controlado por difusão (Fig. 15). Os valores menores que 0,5 são característicos de processos que

apresentam reações químicas acopladas à reação de transferência de carga.

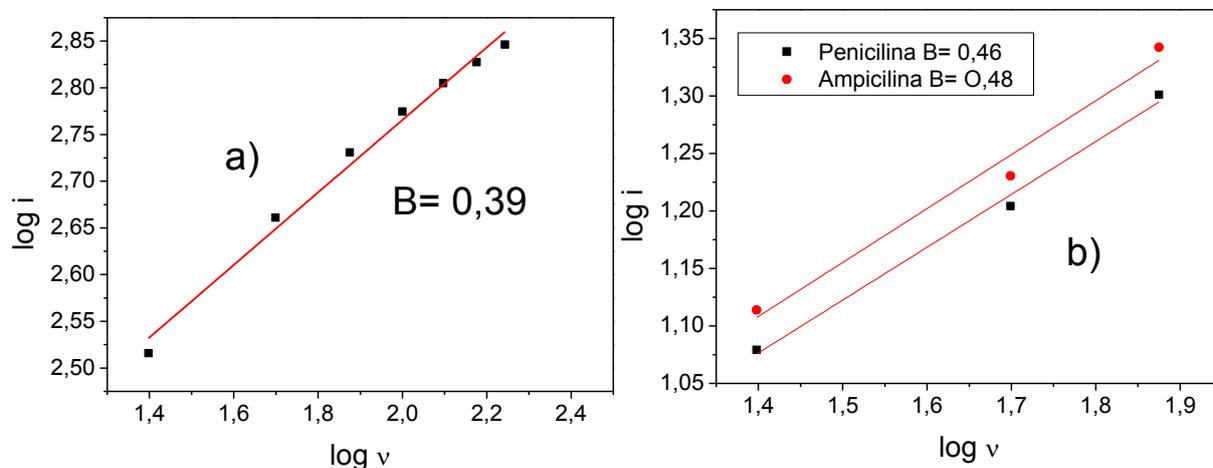


Figura 15: Variação do $\log i_{pa}$ com o $\log v$ para a oxidação de cobre em tampão fosfato na ausência (a) e presença (b) de ampicilina e penicilina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

5.6 SELEÇÃO DA TÉCNICA DE ANÁLISE

Como já foi citada durante o trabalho, a VC não é muito utilizada para análises quantitativas, pois as técnicas de pulso apresentam maior sensibilidade e por isso resultam em menores limites de detecção e quantificação. No presente trabalho foram estudadas também as técnicas de pulso diferencial e de onda quadrada. Após os parâmetros destas técnicas serem otimizados observou-se que dentre as técnicas estudadas a voltametria cíclica é a que apresenta maior Δi comparando o voltamograma realizado apenas em tampão fosfato com aquele em presença de antibiótico β -lactâmico, e por isso a técnica escolhida também para a determinação quantitativa dos fármacos é a voltametria cíclica (Fig. 16).

Uma possível interpretação destes resultados está na velocidade das técnicas de pulso, estas são mais rápidas que a voltametria cíclica. Na VC, como foi discutido no item 5.5, em velocidades muito altas foi observado um decréscimo de corrente atribuída à complexação, o que leva a sugerir que em v altas a formação do complexo entre cobre (II) e o analito não é favorecida.

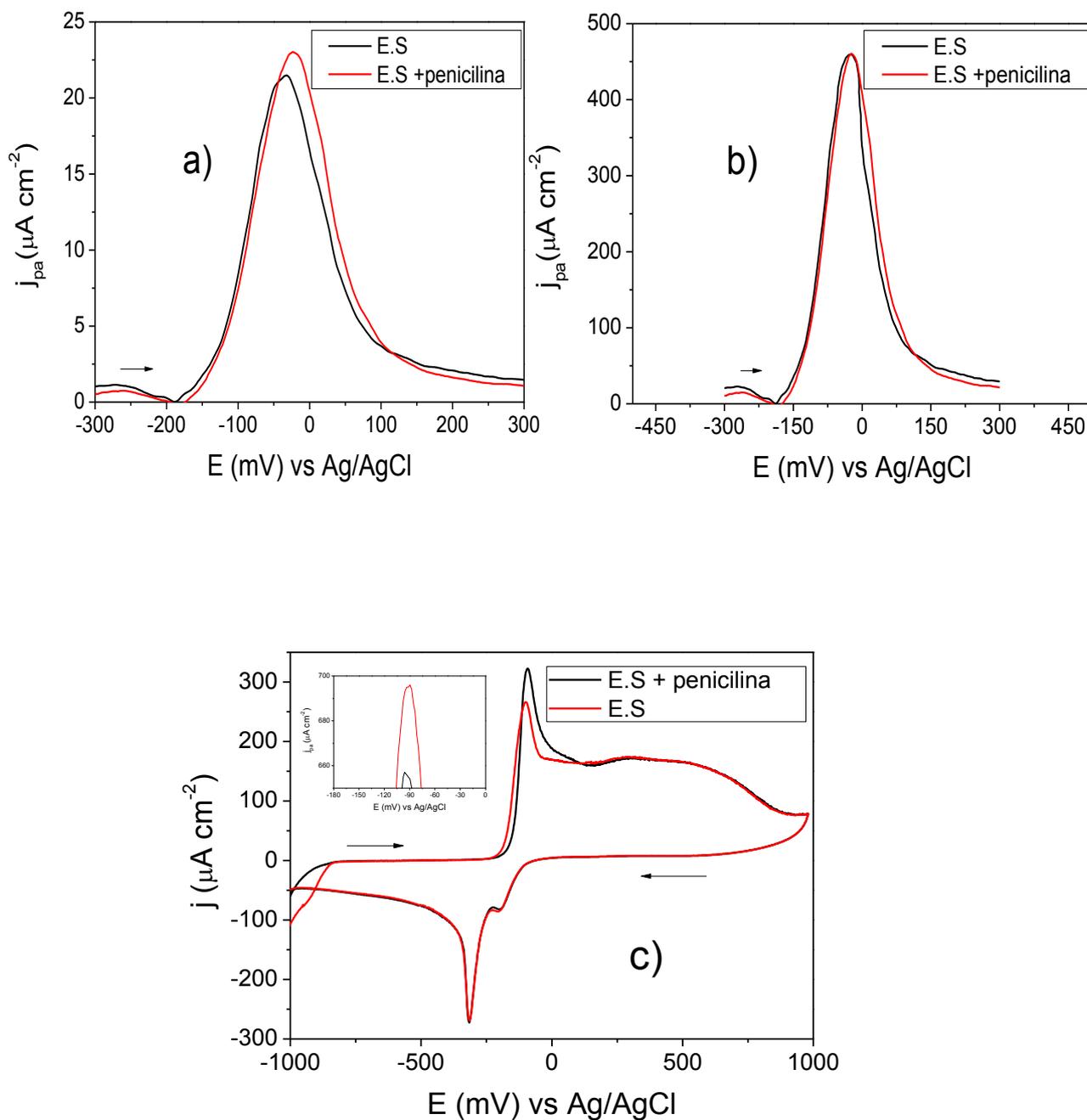


Figura 16: Voltamograma do eletrodo de cobre em tampão fosfato 1,00 mol L⁻¹ pH 7,0 e em presença de 1,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ do antibiótico β-lactâmico penicilina realizado pela técnica de a) VPD ; $v=25\text{mV s}^{-1}$; AP=35mV; b) VOQ $f=75$ Hz e c) VC ; $v=100\text{mV s}^{-1}$.

5.7 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO ANTIBIÓTICO β -LACTÂMICO SOBRE A CORRENTE ANÓDICA

A partir das condições experimentais e dos parâmetros instrumentais otimizados, fez-se o estudo da relação entre a i_{pa} obtida com a concentração do analito. Foi verificado que a i_{pa} aumentava concordantemente com a adição do antibiótico. Os voltamogramas obtidos estão apresentados abaixo (Fig. 17) e também ampliados (Fig.18) para melhor visualização.

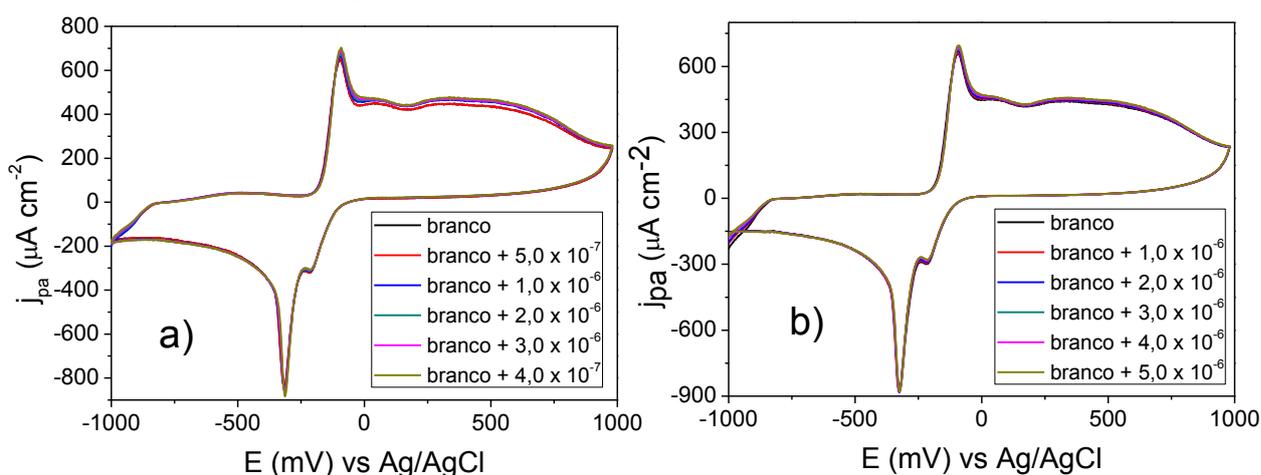


Figura 17: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em presença do antibiótico β -lactâmico a) ampicilina e b) penicilina, ambos em tampão fosfato $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 . Condições: $v=100 \text{ mV s}^{-1}$.

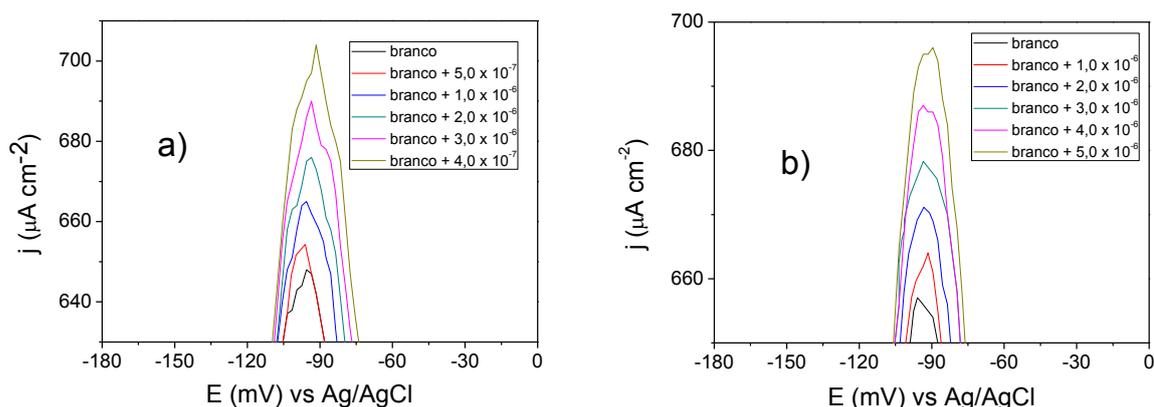


Figura 18: Ampliação dos voltamogramas cíclicos para o eletrodo de cobre em presença do antibiótico β -lactâmico a) ampicilina e b) penicilina, conforme apresentados acima.

5.7.1. CURVA ANALÍTICA

As curvas analíticas obtidas para os antibióticos β -lactâmicos ampicilina e penicilina, respectivamente estão apresentadas abaixo (Fig. 19 a e b). A partir dos dados obtidos nas análises e das curvas analíticas para os dois analitos, calculou-se os parâmetros de validação (tabela 1).

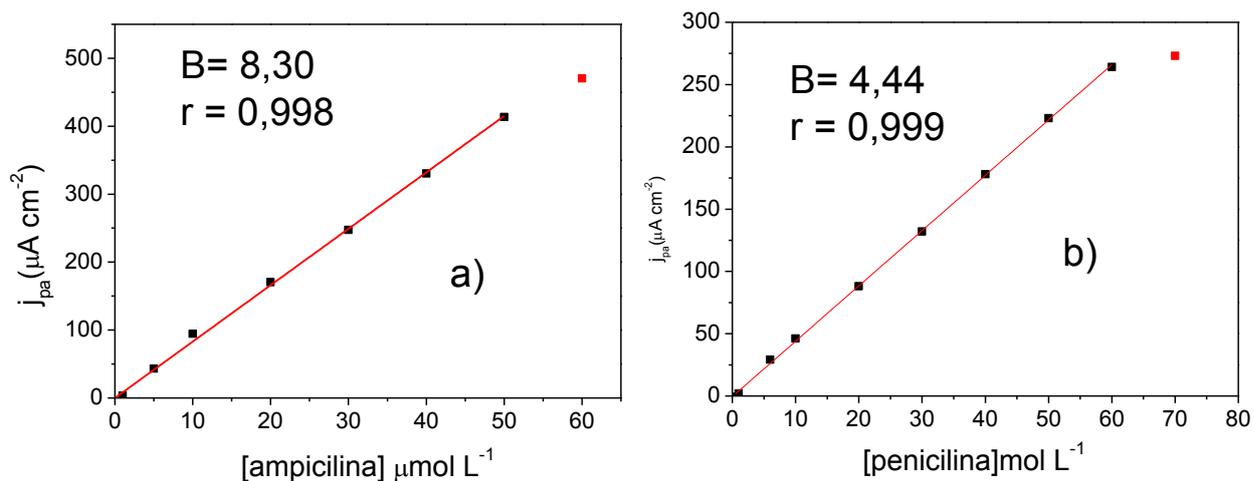


Figura 19: Curvas analíticas para a) padrão de antibiótico β -lactâmico ampicilina e b) padrão de antibiótico β -lactâmico penicilina, ambos em tampão fosfato $1,0 mol L^{-1}$ pH 7,0 .

Um parâmetro estudado que está relacionado com a precisão método proposto é a repetibilidade. A partir da tabela 1 pode-se concluir que as análises apresentaram boa repetibilidade, pois houve concordância entre os resultados de medidas sucessivas de um mesmo método, efetuadas nas mesmas condições.

Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem valores de RSD de 1 a 2 %. A tabela 1 apresenta os dados encontrados pelo estudo de repetibilidade de dez voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de tampão fosfato $1,0 mol L^{-1}$ pH 7,0 em presença de $1,0 \times 10^{-5} mol L^{-1}$ de antibiótico β -lactâmico, tendo como parâmetro analisado a corrente de pico anódica. Os valores encontrados para o desvio padrão relativo foram de 1,67 e 1,72 e estão dentro da faixa aceita.

A avaliação da precisão do método também foi realizada através da

reprodutibilidade mediante o cálculo do desvio padrão relativo de dez leituras da corrente de pico anódica para o eletrodo de cobre na presença de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do padrão de antibiótico. Para a reprodutibilidade avaliou-se experimentos realizados em mais de uma rodada e também em condições diferentes, como por exemplo, em equipamentos diferentes. Os resultados obtidos para a reprodutibilidade foram de 1,55 e 1,68 para a ampicilina e penicilina respectivamente para experimentos realizados em um único dia, assim como a reprodutibilidade dos experimentos realizados em dias diferentes apresentaram os valores de 1,57 e 1,64 para a ampicilina e penicilina respectivamente, que são satisfatórios.

Tabela 1: Parâmetros de validação obtidos a partir das curvas analíticas

Parâmetros	Ampicilina	Penicilina
Faixa Linear (mol L^{-1})	$1,0 \times 10^{-7}$ a $5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7}$ a $6,0 \times 10^{-5}$
B ($\text{A L mol}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	8,30	4,44
Desvio padrão da inclinação	0,13	0,029
Intercepto (μAcm^{-2})	0,02	-0,43
Desvio padrão do intercepto	3,33	1,04
SD_b (μA)	0,19	0,20
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,069	0,135
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,229	0,450
R	0,998	0,999
S	0,186	0,198
Repetibilidade i_{pa} (%) ^{a,b}	1,67	1,72
Reprodutibilidade i_{pa} (%) ^{a,b} interday	1,55	1,68
Reprodutibilidade i_{pa} (%) ^{a,b} intraday	1,57	1,64

^a desvio padrão relativo, ^b n= 10

5.7.2 AMOSTRAS

As amostras foram analisadas pelo método de adição de padrão, que baseia-se em adições sucessivas da solução padrão à uma porção conhecida da amostra.

A vantagem deste método é que ele minimiza os efeitos de matrizes que normalmente causam problemas, uma vez que esta contém espécies que afetam as propriedades das substâncias que estão sendo analisadas. Os dados são tratados de maneira que o valor de corrente encontrado para a amostra sem qualquer adição de padrão seja relacionada com o zero de concentração e as correntes encontradas elas adições sucessivas de padrões seja relacionada com as respectivas concentrações adicionadas. A corrente lida é indicada nos eixos das ordenadas e a concentração no eixo das abscissas, formando assim uma reta, onde extrapolando-a no eixo das abscissas, encontra-se a concentração da substância analisada (Fig. 20).

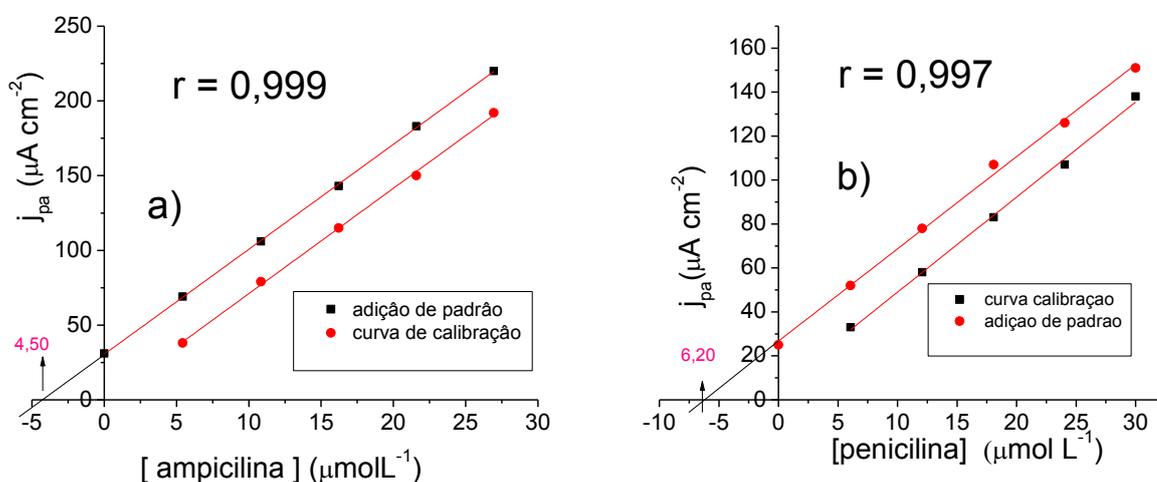


Figura 20: Curva de adição de padrão e analítica para a) padrão de antibiótico β -lactâmico ampicilina e b) padrão de antibiótico β -lactâmico penicilina, ambos em tampão fosfato $1,00 mol L^{-1}$ pH 7,0 .

De acordo com o tratamento dos dados obtidos das determinações das

formulações farmacêuticas, realizadas em triplicata, e representados na tabela 2, observa-se que os excipientes contidos nas amostras dos fármacos não produziram efeito interferente e relevante no sinal analítico obtendo-se um valor médio de 502,6 mg e 501,4 mg para ampicilina e penicilina, respectivamente.

Tabela 2: Resultados referentes à quantificação dos antibióticos ampicilina e penicilina nas amostras farmacêuticas

Amostra	Valor rotulado (mg)	Valor encontrado (mg)	Média (mg)	Desvio padrão relativo(%)
	500	502,3		
Ampicilina	500	502,5	502,6	0,08
	500	503,1		
	500	501,5		
Penicilina	500	501,7	501,4	0,019
	500	501,1		

Os resultados a cerca da recuperação dos antibióticos nas amostras foram satisfatórios uma vez que apresentaram um erro e desvio padrão muito pequeno indicando, portanto, que o método apresenta exatidão e um elevado grau de concordância entre os resultados obtidos nas determinações realizadas. Vale ainda ressaltar que a matriz da amostra não apresentou influência significativa, uma vez que a inclinação das curvas analíticas é bem próxima àquelas da curva da adição de padrão para os dois fármacos (tabela 3).

A média da recuperação encontrada para a ampicilina e penicilina são 99,68 e 100,06 % respectivamente, resultando em um desvio padrão de 0,12 para a

ampicilina e 1,19 para a penicilina.

Tabela 3: Resultados referentes à recuperação dos antibióticos nas curvas de adição de padrão

AMPICILINA			PENICILINA		
Quantidade adicionada (mg)	Quantidade encontrada (mg)	Recuperação (%)	Quantidade adicionada (mg)	Quantidade encontrada (mg)	Recuperação (%)
19,06	19,00	99,71	21,60	22,02	101,97
38,11	37,93	99,52	43,19	43,06	99,68
57,17	56,95	99,61	64,79	64,18	99,06
76,22	76,03	99,75	86,39	85,67	99,17
95,28	95,10	99,81	108,00	108,40	100,41

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados experimentais obtidos para a análise dos parâmetros que caracterizam o processo eletródico através da voltametria cíclica, o eletrodo de cobre mostrou-se eficiente na determinação de antibióticos β -lactâmicos via efeito de complexação. O estudo das componentes dos voltamogramas, potencial e corrente de pico, foram indispensáveis para o estudo eletroquímico do sistema e para a determinação dos melhores parâmetros a fim de obter melhores resultados. O processo na superfície apresentou-se como um processo irreversível, apresentando oxidação de cobre metálico à cobre (II) e redução deste a cobre (I) e posteriormente a cobre metálico.

A técnica escolhida para a quantificação dos fármacos foi a voltametria cíclica em vez as técnicas de pulso, visto que ela apresentou maior corrente para o analito. Os parâmetros de precisão e exatidão avaliados forneceu resultado dentro do estabelecido pelas exigências das aplicações analíticas, sendo 1,67 e 0,08 respectivamente para a ampicilina e para a penicilina é 1,72 e 0,02 respectivamente. A determinação analítica encontrou valores médios de 502,6 mg para ampicilina e 501,4 mg para penicilina, mostrando a alto grau de concordância dos resultados obtidos.

Os valores de limite de detecção encontrados para ampicilina e penicilina foram 0,069 e 0,135 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, assim como para os valores de limite de quantificação de 0,229 e 0,450 $\mu\text{mol L}^{-1}$, valores considerados baixos para a técnica de voltametria cíclica.

Entretanto, os dois antibióticos β -lactâmicos apresentaram o mesmo comportamento, diferindo apenas na magnitude de acréscimo de corrente em relação ao branco, portanto, a técnica responde de maneira semelhante para os dois fármacos estudados. O cobre é um metal que apresenta capacidade de complexação com inúmeras substâncias e isso pode acarretar problemas para a determinação dos antibióticos em amostras mais complexas como leite, água residual e outros alimentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinho, Sílvia M. L.; Villamil, Ruth F.V.; Neto, Augusto Agostinho; Aranha, Hernani.; O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processo de eletrodo, *Química nova*, 27, 5,813-817, **2004**.

Baldwin, Richard P.; Ravichandran, K.; Johnson, Ronda K.; A cyclic voltametry experiment for the instrumental analysis laboratory, *Journal of chemical education*, 820-823, **1984**.

Belal, F.; Rizk, S. M.; Eid, M., Polarographic determination of some penicillins through nitrosation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17, 275-282, **1998**.

British Pharmacopeia, I e II, Her Majesty's Stationary Office, London, **1993**.

Coutinho, B. F. C.; Coutinho, M. F. L.; Mazo, H. L.; Estudo do comportamento eletroquímico de substâncias complexantes utilizando o eletrodo de cobre, *Química Nova*, 32, 1, 228-233, **2009**.

Coutinho, B. F. C.; Mazo, H. L.; Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão , *Química Nova*, 28, 6, 1038-1045, **2005**.

Garcia, F. A.; Rollemberg. C. M.; Determinação voltamétrica do herbicida glifosato em águas naturais utilizando eletrodo de cobre, *Química Nova*, 30, 7, 1592-1596, **2007**.

González, F. A.; Badía, R.; García, D. E. M.; Insights into the reaction of β -lactam antibiotics with copper (II) ions in aqueous and micellar media: Kinetic and spectrometric studies, *Analytical Biochemistry*, 341, 113–121, **2005**.

Hernández, M.; Borrull, F.; Calull, M.; Analysis of antibiotics in biological samples by capilar electrophoresis, *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 7+8, **2003**.

Joshi, S.; Review: HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 795–809, **2002**.

Lorimer, P. J.; Mason, J. T.; Plattes, M.; Walton, J. D.; Passivation phenomena during sonovoltammetric studies on copper in strongly alkaline solutions, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 568, 379-390, **2004**.

Nicholson, S. R.; Shain, I.; Theory of Stationary Electrode Polarography, *Analytical*

Chemistry, 36, 706-723, **1964**.

Ribani, M.; Bottoli, G. B. C.; Collins, H. C.; Jardim, F. S. C. I.; Melo, C. F. L.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, Química Nova, 27,5, 771-780, **2004**.

Sher, A.; Veber, M.; Gomiscek, M. M.; Spectroscopic and polarographic investigations: copper(II)-penicillin derivatives, 148, 191-199, **1997**.

Sierra, V. E.; Méndez, A. M.; Sarria, M. V.; Cotés, T. M.; Electrooxidación de glifosato sobre electrodos de níquel y cobre, Química Nova, 31, 2, 220-226, **2008**.

Skoog, A. D.; Holler; J. F.; Nieman, T. A.; Princípios de análise instrumental, Bookman, Porto Alegre, **2002**.

Skoog, A. D.; West, M. D.; Holler; J. F.; Crouch, S. R.; Fundamentos de química analítica, Thomson Learning, **2007**.