



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos

***Estudo Eletroquímico e Determinação
de L-dopa em Produto Farmacêutico por
Voltametria Cíclica.***

Aluna: Lidiane Almeida da Silva
Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli
Florianópolis – SC
2006

Lidiane Almeida da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à disciplina QMC 5510 –
Estágio Supervisionado, do Curso de
Graduação em Química, da
Universidade Federal de Santa
Catarina, desenvolvido no semestre de
2006.1.

Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

**Florianópolis – SC
2006**

*Ao meu avô Osvaldo, minha
mãe Ivoneide , meu pai Valdemiro (in
memoriam) e ao meu namorado
Anderson pela confiança, apoio, e amor
incondicional.*

Agradecimentos

Esse estágio foi desenvolvido no GEEPEA – Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos, situado no laboratório 310 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Prof. Dr. Almir Spinelli.

Ao Professor Dr. Almir Spinelli, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho no laboratório GEPPEA, obrigada pela sua dedicação, orientação e paciência.

Agradeço minha família, minha razão de viver. Obrigada pela oportunidade e pela confiança que depositaram em mim. Tantas renúncias feitas para que eu chegasse até aqui. Minha mãe, sempre amiga, minha companheira, suportando a distância e a falta de não ter-me ao seu lado. Meu avô meu porto seguro, obrigada pela criação e pelo amor incondicional durante todos esses anos, me adotando como filha, e me dando o amor de um pai. Ao meu pai que mesmo estando me olhando lá de cima sei que está orgulhoso de mim.

Aos meus amigos que conquistei durante os anos de faculdade, e aos que cultivo há muito tempo, faltaria espaço para demonstrar a gratidão que sinto por vocês. À vocês, Jaqueline, Fernanda, Dany, Nara, Carol, Danilo, Zacca, Eduardo, Luciano, Cristian, Fran, Mari, Ale, Lô, Bruna Six, Ari, Elisa, Rebeca, Dr. Sérgio, Xandê, Cris prima, Gra, Carla, obrigada pelo companheirismo, amizade, força para que eu chegasse até aqui e pelos bons momentos compartilhados durante todos esses anos.

À você Ju, minha amiga Sá e Jê, obrigada pelo amor, carinho, apoio que me deram durante todos esses anos.

Aos meus colegas de tcc's Fran e Otoniel, pelo companheirismo e ajuda mútua.

Às minhas amigas Cris e Ana Karina, obrigada pela paciência, dedicação, conselhos, e todos os ensinamentos na elaboração desse trabalho.

Aos amigos de laboratório: Ivanise, Meggie, Silvia, Fran, Otoniel, Cris, Ana Karina.

Ao meu namorado Anderson, pelo apoio, amor, carinho, amizade, durante todos esses anos de ausência, tornando meus dias mais felizes.

Ao Departamento de Química e à Universidade Federal de Santa Catarina. E a todos os professores do Departamento.

Resumo.....	7
1. Introdução.....	9
2. Objetivos.....	14
3. Parte Experimental.....	15
3.1 Reagentes e soluções.....	15
3.2 Métodos Eletroquímicos – Equipamentos.....	15
3.3 Voltametria Cíclica.....	15
3.4 Determinação de L-dopa em comprimidos de Prolopa®.....	16
3.5 Validação do método proposto.....	17
4. Resultados e Discussão.....	18
4.1 Comportamento voltamétrico da L-dopa.....	18
4.2 Influência do pH.....	20
4.3 Influência da velocidade de variação de potencial (v).....	21
4.4 Curva de calibração para L-dopa.....	26
4.5 Aplicação da metodologia para determinação da L-dopa.....	29
4.5.1 Determinação de L-dopa em formulação farmacêutica.....	29
5. Conclusão.....	33
6. Referências Bibliográficas.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da L-dopa.....	9
Figura 2: Voltamograma cíclico para a L-dopa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em solução acetato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ , pH 3,0 e $\nu = 100$ mVs ⁻¹	18
Figura 3: Mecanismo de oxidação para a L-dopa.	19
Figura 4: Voltamogramas cíclicos para uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de L-dopa em solução acetato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ , $\nu = 100$ mVs ⁻¹ para diferentes pHs.	20
Figura 5: Voltamogramas cíclicos para uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de L-dopa em solução acetato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ e pH 3,0 para o aumento de ν de 10 a 200 mVs ⁻¹	21
Figura 6: Curva $E_{pa} \times \nu$ para a L-dopa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em solução acetato 0,1 mol L ⁻¹ , e pH 3,0.....	22
Figura 7: Gráfico $i_{pa} \nu^{-1/2} \times \nu$ para L-dopa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em solução acetato 0,1 mol L ⁻¹ , e pH 3,0.	23
Figura 8: Gráfico $\log i_{pa} \times \log \nu$ para a L-dopa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em solução acetato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ e pH 3,0.....	24
Figura 9: Gráfico de $i_{pa} \times \nu^{1/2}$, para a L-dopa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em solução acetato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ e pH 3,0.	25
Figura 10: Curva de calibração para L-dopa variando a concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em solução acetato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ e pH 3,0.	26
Figura 11: Voltamogramas cíclicos obtidos para determinação de L-dopa em amostra de comprimido de Prolopa®.....	30
Figura 12: Gráfico de $i_{pa} \times$ mg L-dopa adicionada.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Repetibilidade para uma solução de L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ e pH 3,0.	28
Tabela 2: Resultados obtidos para quantificação de L-dopa em amostras de comprimido Prolopa [®] através do método eletroanalítico.....	31
Tabela 3: Estudo da adição e recuperação de L-dopa na formulação farmacêutica Prolopa [®]	32

Estudou-se o comportamento eletroquímico da L-dopa em solução de acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 3,0, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$ e fez-se a determinação eletroanalítica em formulação farmacêutica Prolopa® utilizando a técnica de voltametria cíclica. O comportamento voltamétrico da L-dopa foi caracterizado por dois picos ($E_{pa} = 535 \text{ mV}$ e $E_{pc} = 340 \text{ mV}$ vs Ag/AgCl). Foi realizada a análise de alguns critérios em função da variação da velocidade do potencial, que caracterizaram o processo eletródico como sendo eletroquimicamente irreversível e controlado por difusão, sugerindo a presença de uma reação química acoplada à transferência eletrônica no processo de oxidação da L-dopa. Utilizando as melhores condições de trabalho foi aplicada uma metodologia analítica (método da adição de padrão) para determinação de L-dopa em uma formulação farmacêutica Prolopa®. A curva analítica de trabalho foi construída no intervalo de concentrações de $5,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e o limite de detecção (LD) obtido foi de $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Para garantir a confiabilidade dos resultados foram avaliados alguns parâmetros de validação de métodos entre eles precisão e exatidão, sendo encontrado 100,76 mg de L-dopa em uma formulação farmacêutica e um erro relativo (Er) de 2,06%

Palavras-chave: L-dopa, formulações farmacêuticas, métodos eletroanalíticos.

Introdução

A levodopa (L-dopa), 3 (3,4-dihidroxifenil) L-alanina – Figura 1) é um importante neurotransmissor e precursor biológico das catecolaminas.¹ A L-dopa está presente em várias espécies da família das leguminosas. No Brasil foi e ainda é extraída das sementes da espécie *Stylobium aterrimum*, conhecida vulgarmente como “mucuna preta”, planta própria da região tropical, pouco exigente e resistente a pragas. Entretanto, atualmente prefere-se obtê-la por outros meios, mais econômicos através da síntese química, a partir da 3-(3,4metilenodioxifenil)-L-alanina ou da L-tirosina, bem como, da fermentação da L-tirosina. É um pó cristalino, branco a esbranquiçado, inodoro, insípido e que, na presença de umidade, é rapidamente oxidado pelo oxigênio atmosférico e escurece.² É levemente solúvel em água, facilmente solúvel em ácido clorídrico diluído, e insolúvel em álcool. Apresenta ponto de fusão entre 284 °C – 286 °C, fórmula molecular C₉H₁₁NO₄ e massa molar 197,19g/mol.³

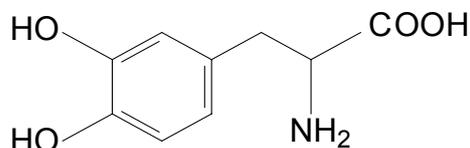


Figura 1: Estrutura química da L-dopa

A L-dopa é um medicamento utilizado no tratamento de pacientes portadores da doença de Parkinson. A doença de Parkinson (DP) é uma das doenças neurológicas mais prevalentes em indivíduos acima de 50 anos, afetando todas as classes sociais, raças, e sexos, sendo ligeiramente mais comum no sexo masculino. As primeiras manifestações da DP deve-se a diminuição da produção da dopamina em áreas cerebrais relacionadas com o movimento voluntário. A dopamina é uma catecolamina e um neurotransmissor sintetizado por células nervosas que age em regiões do cérebro promovendo entre outros efeitos, a sensação de prazer e de motivação. Clinicamente os sinais e sintomas da DP são: tremor de

repouso, rigidez muscular e redução dos reflexos posturais. Além desses sintomas motores descritos, apresenta também sintomas de ordem afetiva, cognitiva e comportamental.⁴

No entanto a dopamina não pode ser administrada oralmente, porque não penetra a barreira da corrente sanguínea. A solução encontrada foi utilizar um precursor da dopamina. A L-dopa é convertida em dopamina por reação da enzima dopa-descarboxilase compensando a deficiência da mesma no organismo, penetrando facilmente a barreira da corrente sanguínea.⁵

Catecolaminas são compostos orgânicos que apresentam um grupo alquilamina ligado ao anel benzênico que possui dois grupos hidroxilas (catecol). Esses compostos são extensamente usados no tratamento de asma, hipertensão, doença de Parkinson e infarto do miocárdio.⁶ As catecolaminas estão presentes em quantidades relativamente grandes em muitas formulações farmacêuticas, e muito tem sido o esforço para desenvolver um procedimento analítico, simples, rápido, exato e preciso para sua determinação. Diversos métodos têm sido empregado para a determinação de catecolaminas em espécies biológicas e/ou formulações farmacêuticas. A determinação de catecolaminas em fluidos biológicos normalmente requer o uso de técnicas analíticas, cromatográficas, fluorimétrica e/ou detecção eletroquímica.⁷

Técnicas eletroquímicas têm sido uma boa alternativa para a determinação de catecolaminas em formulações farmacêuticas, e vários artigos podem ser encontrados na literatura.^{5,8,9}

Devido ao grande uso da L-dopa em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos muitos métodos foram desenvolvidos para sua determinação. A literatura reporta diversas técnicas para sua análise em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos especialmente espectrofotometria e cromatografia líquida. No entanto, os dois grupos hidroxilas presentes na L-dopa, indicam que esta substância deve ser eletroativa, podendo ser facilmente oxidados, utilizando-se assim métodos eletroquímicos para a sua determinação.⁵

Métodos eletroquímicos são poderosas técnicas para análises, apresentando boa precisão e exatidão, alta sensibilidade e baixo custo. Entre diversos métodos eletroquímicos, a voltametria e/ou amperometria são métodos apropriados para detecção de compostos orgânicos devido sua simplicidade e rapidez.¹⁰

Uma de suas mais importantes características relaciona-se com o fato destas técnicas possibilitarem o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do

analito e alguma propriedade elétrica como corrente, potencial, condutividade, resistência, ou carga. Uma outra grande vantagem destas técnicas consiste na possibilidade da medida ser realizada diretamente na amostra sem necessidade de etapas de pré-purificação ou de separações prévias. Essas vantagens, aliadas ao curto tempo na realização das análises, ao baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados, fizeram com que elas sejam cada vez mais intensamente utilizadas.¹¹

Neste trabalho foi utilizada a técnica de voltametria cíclica. A voltametria cíclica (CV) tem se tornado uma ferramenta popular nos últimos anos para o estudo de reações eletroquímicas. Este método é talvez o mais versátil para o estudo de espécies eletroativas. Sua versatilidade combinado com a sua fácil detecção tem resultado no uso extensivo da CV nos campos da eletroquímica, química inorgânica, química orgânica, e bioquímica.¹²

A voltametria cíclica (CV) é uma técnica de grande interesse na área eletroquímica em geral porque pode ser usada qualitativamente ou quantitativamente na investigação de uma série de processos onde reações de oxidação-redução estão envolvidas. Nesta técnica o eletrodo de trabalho de uma dada cela eletroquímica tem a sua resposta de corrente (i) registrada em função de uma varredura de potencial (E) com diferentes velocidades (mVs^{-1}) e formas (triangular, quadrada, etc). Quando este registro é digitalizado, obtém-se um voltamograma (ixE) que pode ser tratado matematicamente para fornecer informações sobre a reversibilidade dos processos de oxidação-redução e uma série de outros parâmetros cinéticos de interesse.¹³

Assim em virtude de suas possíveis aplicações, os métodos voltamétricos tornaram-se importantes técnicas para o estudo de compostos farmacêuticos e, desta forma, várias metodologias eletroanalíticas têm sido desenvolvidas com bastante intensidade, visando não apenas a busca de uma maior sensibilidade, mas também a eliminação de interferências presentes nas matrizes, tempo de análise e baixo custo de equipamentos utilizados.¹⁴

O conhecimento das propriedades eletroquímicas e do mecanismo de oxidação da L-dopa é de grande importância no objetivo de investigar as reações que ocorrem durante sua ação biológica.

Investigações sobre o comportamento eletroquímico da L-dopa foram descritos por Liu e seus colaboradores,¹⁰ o mecanismo de eletro-oxidação da L-dopa foi estudado por voltametria cíclica e por espectro-eletroquímica de UV-vis. Os resultados obtidos revelam que o mecanismo de eletro-oxidação para a L-dopa em solução neutra sobre eletrodo de

carbono vítreo constitui um processo irreversível seguido de reações químicas, onde a dopaquinona formada durante a oxidação da L-dopa gera novos produtos eletroativos. Para soluções ácidas o processo passa a ser quase-reversível envolvendo a participação de 2 elétrons, onde é possível verificar a redução da dopaquinona.. Além disso, estudos sobre o efeito da velocidade de variação de potencial indicaram que o processo é controlado por difusão das espécies e não por adsorção.

Yan e colaboradores,¹⁵ investigaram o comportamento eletroquímico da L-dopa sobre eletrodo de carbono vítreo modificado utilizando voltametria cíclica, cronoamperometria e cronocoulometria. Os resultados mostraram que o processo é controlado por difusão e envolve dois elétrons e dois prótons. Além disso, nos estudos sobre a influência do pH no mecanismo de eletro-oxidação verificou-se que para soluções ácidas (pH 3,0 e 5,0) é visível a redução do produto formado na oxidação da L-dopa (dopaquinona) e que para soluções neutras (pH 7,0 e 9,0) o pico referente à redução não aparece.

Bergamine e seus colaboradores,⁵ utilizando a técnica de voltametria cíclica e de amperometria determinaram a L-dopa em duas formulações farmacêuticas sem tratamento prévio pelo método da adição de padrão. O limite de detecção encontrado foi de $9,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e a taxa de recuperação foi de $104 \pm 4\%$ e $108 \pm 8\%$ para duas formulações farmacêuticas. Além disso, estes autores estudaram a influência do pH e da velocidade de variação de potencial no comportamento eletroquímico da L-dopa $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em meio de acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹. Os resultados mostraram que o processo é controlado por difusão.

Um dos objetivos do trabalho proposto é a aplicação de uma metodologia eletroanalítica para a determinação do composto L-dopa em formulações farmacêuticas, visando também a validação do método proposto, a fim de assegurar que os resultados obtidos atendam às exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados, pois a necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que o novo método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, se faz necessário validar o método.

Vários autores definem validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras. Todos os órgãos regulamentadores exigem que um procedimento analítico seja validado.

Uma das definições de validação proposta pela ANVISA pode ser transcrita como: “A validação deve garantir, através de estudos experimentais que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.”¹⁶

Vários artigos e revisões têm sido publicados a respeito de validação de métodos analíticos, os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação.

Porém nenhuma publicação descreve especificamente a respeito de validação de métodos eletroquímicos. No entanto, baseado nos ensaios e especificações existentes nas monografias da United States Pharmacopeia, relata que não importa se o método em questão é ou não cromatográfico, os princípios gerais podem ser aplicados com sucesso para qualquer um deles.¹⁴

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Esses termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho, e algumas vezes como figuras de mérito. Alguns desses parâmetros serão estudados no presente trabalho, com o objetivo de demonstrar que o método analítico é adequado para seu propósito.

Objetivos

Este trabalho tem como objetivos estudar o comportamento eletroquímico da L-dopa utilizando métodos eletroquímicos, através de técnica de voltametria cíclica, bem como aplicar uma metodologia eletroanalítica para a determinação da L-dopa em formulações farmacêuticas, visando obter um método simples, rápido, de baixo custo, com boa precisão e exatidão. Finalmente, é objetivo também validar o método adotado, a fim de assegurar que os resultados obtidos sejam confiáveis e adequados para seu propósito.

3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste estudo são de grau analítico adquiridos da Sigma (L-dopa), da Vetec (acetato de sódio, hidróxido de sódio), da Dinâmica (ácido acético glacial), da Arotec (alumina 0,05 μ). Os reagentes foram utilizados sem purificação prévia. Água destilada foi utilizada na preparação das soluções.

Para os estudos eletroquímicos preparou-se 50 mL de solução estoque do padrão L-dopa na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ utilizando como eletrólito suporte uma solução de acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹, com o pH sendo ajustado para 3,0 utilizando ácido acético glacial. Adicionou-se hidróxido de potássio para obter as soluções com pH básico.

Para os estudos eletroanalíticos as soluções foram preparadas por diluição de uma solução de L-dopa $7,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para a concentração desejada.

3.2 Métodos Eletroquímicos – Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato EG&G PARTM, modelo 263A, em conjunto com o software M270 acoplado a um computador.

Os gráficos apresentados foram editados no programa de computador ORIGINTM da empresa Micronal. As estruturas químicas foram elaboradas no programa de computador CHEMWINDOWTM da empresa Softshell.

As medidas de pH foram realizadas em um calibrador Orion 720A, em conjunto com um agitador magnético Fanem 257.

Para a dissolução dos reagentes foi utilizado um ultra-som modelo Matason 14.

3.3 Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em uma célula eletroquímica modelo PARC, contendo três eletrodos: eletrodo de carbono vítreo foi utilizado como eletrodo de trabalho (E.T.), um eletrodo de fio de platina utilizado como contra eletrodo (C. E.) e

Ag/AgCl saturado com KCl utilizado como eletrodo de referência (E.R.). Sendo que, todos os valores de potencial mencionados são referentes a este eletrodo.

A capacidade da célula eletroquímica era de 20 mL. Para o estudo da influência de velocidade (v) e influência de pH, 15 mL de solução de L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada como descrita anteriormente no procedimento experimental, foram adicionados à célula. Antes de registrar cada voltamograma o eletrodo de trabalho foi cuidadosamente polido com uma pasta de alumina ($0,05 \mu\text{m}$), e colocado em banho ultra-som por aproximadamente 60 s para remover a alumina remanescente, em seguida lavado com água destilada. Antes de registrar cada voltamograma cíclico a solução foi desoxigenada por 5 minutos com N_2 . A faixa de potencial aplicada foi de -200 mV a 900 mV . A influência da velocidade de variação de potencial (v), foi estudada variando-se a velocidade de 10 a 200 mVs^{-1} e a influência do pH variando-se o pH de 3,0 a 10,0.

3.4 Procedimento para determinação de L-dopa em comprimidos de Prolopa®

Um comprimido de Prolopa® 125 mg, segundo o fabricante contém 100 mg de L-dopa e 25 mg de benserazida, foi macerado até um fino pó. O pó macerado foi dissolvido em uma certa quantidade de solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (eletrólito suporte) e transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL. A amostra foi agitada e levada ao ultra-som, por aproximadamente 3 minutos.

Uma alíquota de 15 mL da amostra foi adicionada na célula eletroquímica e a solução foi desoxigenada por 5 minutos com N_2 . Como no procedimento anterior o eletrodo de trabalho foi cuidadosamente polido com uma pasta de alumina ($0,05 \mu\text{m}$), e colocado em banho ultra-som por aproximadamente 60 s para remover a alumina remanescente e posteriormente lavado com água destilada.

Após o primeiro voltamograma foram realizadas adições sucessivas do padrão L-dopa na forma sólida, e registrados os voltamogramas após cada adição. A quantificação foi obtida graficando i_{pa} em função de mg L-dopa adicionada.

3.5 Validação do método proposto

Para a validação do método proposto primeiramente foi construída uma curva de calibração variando a concentração de L-dopa de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Foram realizados 10 voltamogramas cíclicos para o branco, e a partir dos dados obtidos da curva de calibração e do desvio padrão das correntes obtidas para o branco, foram calculados o Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).

A determinação da L-dopa em uma formulação farmacêutica Prolopa® foi realizada em triplicata, usando a mesma solução estoque preparada como descrita anteriormente no item 3.4. A partir dos valores obtidos foi testada a precisão do método, sendo calculados desvio padrão absoluto (s), erro relativo (Er), desvio padrão relativo (RSD).

A precisão foi testada em termos de repetibilidade, realizando 10 medidas sucessivas através da voltametria cíclica para uma solução de L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$ e pH 3,0. Outro critério testado em termos de repetibilidade foi a análise da terminação da L-dopa feita em triplicata como já descrito anteriormente.

4.1 Comportamento voltamétrico da L-dopa

O comportamento voltamétrico da L-dopa ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi estudado sobre eletrodo de carbono vítreo, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na velocidade de variação de potencial de 100 mVs^{-1} e pH 3,0.

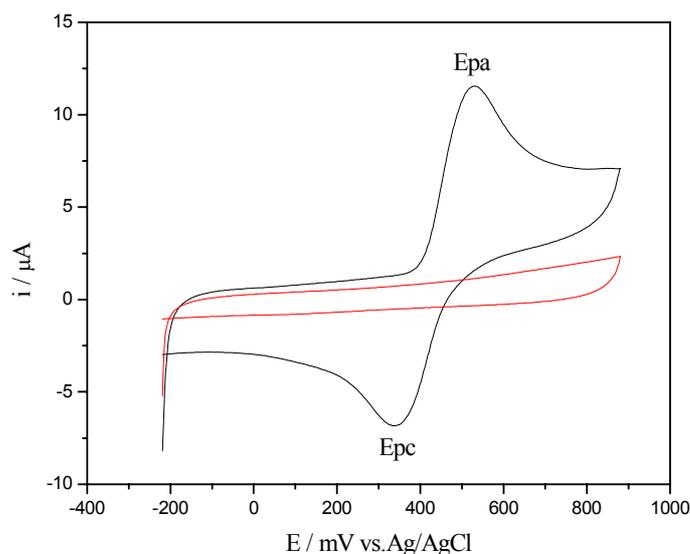


Figura 2: Voltamograma cíclico para a L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,0 e $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$

Sob as condições experimentais descritas acima, na Figura 2 observa-se que o voltamograma é caracterizado por dois picos bem definidos, um pico de oxidação $E_{pa} = 535 \text{ mV}$ quando a variação de potencial é feita na direção positiva, e outro pico $E_{pc} = 340 \text{ mV}$ quando a variação de potencial é feita na direção negativa.

De acordo com a literatura ^{5,10,15}, o pico de oxidação em 535 mV é atribuído a oxidação da L-dopa a quinona correspondente (dopaquinona). Dependendo das condições experimentais, a dopaquinona pode sofrer na seqüência reações químicas gerando novas espécies eletroativas. Com relação ao pico de redução em 340 mV, este pode estar associado a redução da dopaquinona ou a redução das espécies eletroativas originárias das reações químicas posteriores a oxidação da L-dopa. De forma simplificada, a Figura 3 mostra um esquema reacional para a oxidação da L-dopa.

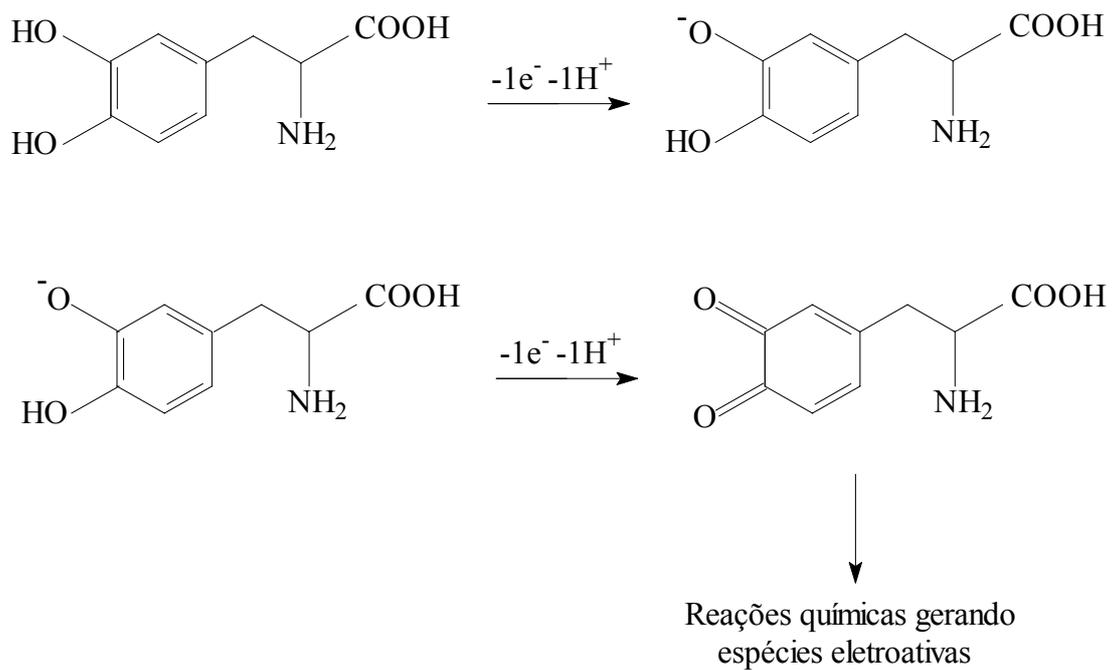


Figura 3: Mecanismo de oxidação para a L-dopa.

4.2 Influência do pH

A influência do pH na resposta da corrente e do potencial de pico foi avaliada variando-se o pH do eletrólito suporte utilizado, no caso solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de 3,0 a 10,0. A Figura 4 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$ em diferentes pHs.

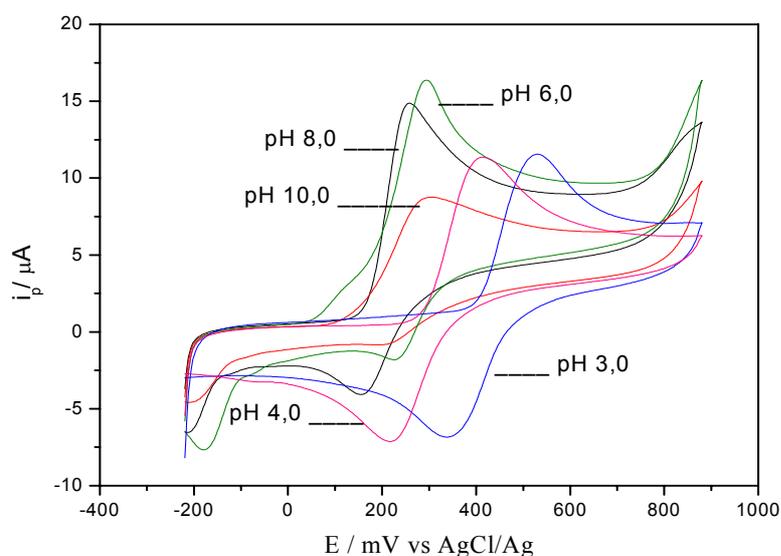


Figura 4: Voltamogramas cíclicos para uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de L-dopa em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$ para diferentes pHs.

Nesta figura pode-se verificar que a concentração do próton produz alterações significativas no perfil voltamétrico da L-dopa. Isto indica que as reações no eletrodo são influenciadas por reações de protonação.⁵ Entretanto não houve reprodutibilidade ou uma variação constante no aumento das densidades de corrente de acordo com o aumento do pH. Este fato sugere que a L-dopa apresenta um complicado processo eletroquímico onde a reversibilidade do sistema sofre alterações de acordo com as condições experimentais adotadas.^{5,10,15} Por outro lado, a L-dopa em meio aquoso apresenta dois hidrogênios ionizáveis¹⁷ sendo $pK_{a1} = 2,24$ e $pK_{a2} = 9,30$, por isso a condição de pH 3,0 foi adotada para a determinação farmacológica.

4.3 Influência da velocidade de variação de potencial (v)

Utilizando a técnica de voltametria cíclica, pode-se estudar o processo eletródico de uma reação, analisando alguns parâmetros relacionados à influência da velocidade de variação de potencial sobre potencias e correntes observadas nos voltamogramas cíclicos.¹⁸

Desta forma, o estudo do comportamento eletroquímico da L-dopa foi estudado avaliando-se a influência da velocidade de variação de potencial no intervalo de 10 a 200 mVs^{-1} em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 3,0.

A Figura 5 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de variação de potencial.

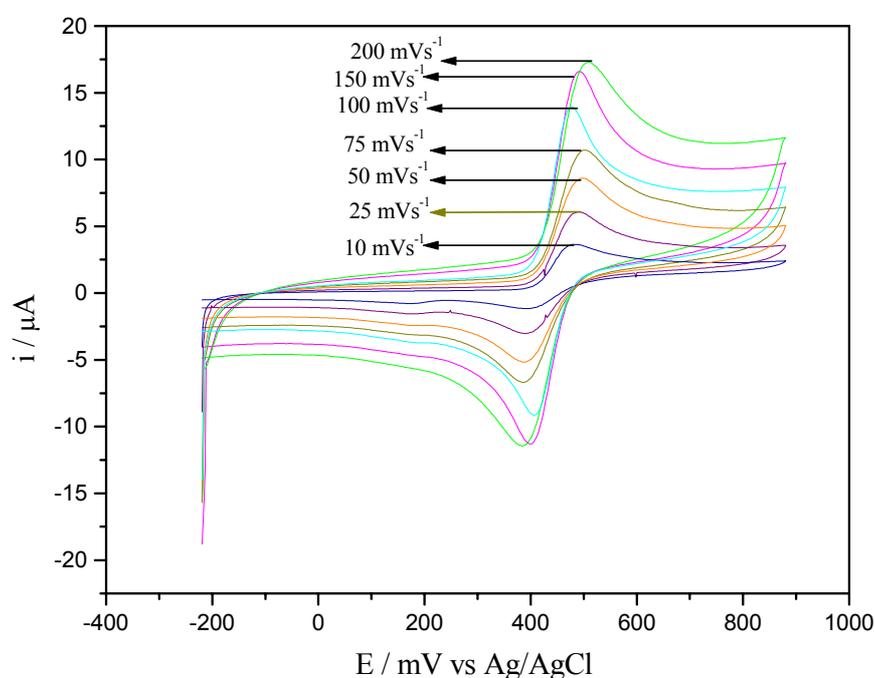


Figura 5: Voltamogramas cíclicos para uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de L-dopa em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 3,0 para o aumento de v de 10 a 200 mVs^{-1} .

De acordo com os voltamogramas cíclicos mostrados acima verificou-se que a corrente de pico catódica e anódica, e os potencias associados a cada pico aumentam gradativamente com o aumento da v . Para continuidade dos estudos foi adotado a velocidade de variação de potencial de 100 mVs^{-1} .

A Figura 6 mostra o gráfico E_{pa} x ν para a oxidação da L-dopa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução acetato de sódio $0,1$ mol L⁻¹ e pH 3,0.

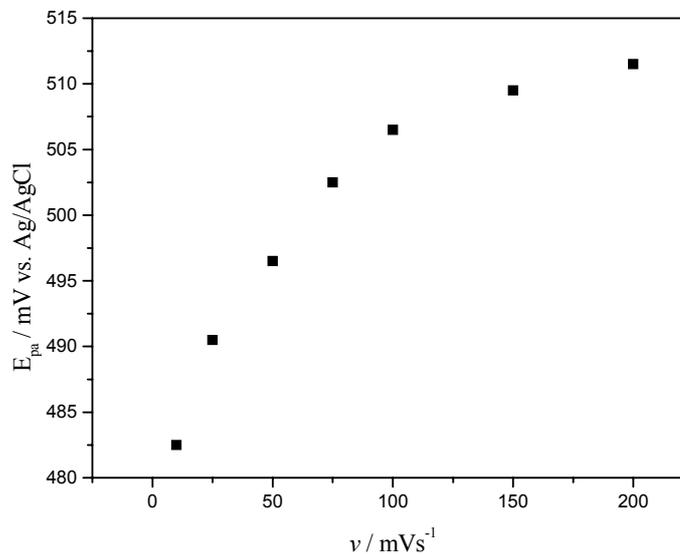


Figura 6: Curva E_{pa} x ν para a L-dopa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução acetato $0,1$ mol L⁻¹, e pH 3,0.

Na Figura 6 observa-se que ocorre um deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos à medida que a velocidade aumenta. De acordo com a literatura¹⁹ para processos eletroquimicamente reversíveis o potencial de pico independe de ν e $\Delta E_p = 59/n$ mV e para processos eletroquimicamente irreversíveis o potencial de pico é dependente de ν .

Em nosso estudo verificou-se que o potencial de pico (E_{pa}) é dependente de ν e foi obtido um valor para $\Delta E_p = 195$ mV. Embora o perfil voltamétrico para a L-dopa seja semelhante a um processo eletroquimicamente reversível nossos resultados sugerem que o mecanismo de eletro-oxidação para a L-dopa seja eletroquimicamente irreversível, mas quimicamente reversível.

Em outras palavras, no pico E_{pa} observa-se a oxidação da L-dopa a dopaquinona correspondente, a qual sofre na seqüência reações químicas acopladas levando a formação da ciclo-dopa. Continuando a série de reações químicas que ocorrem a partir da formação

da dopaquinona, a ciclo-dopa é transformada em dopa-cromo. Dessa maneira, o pico de redução E_{pc} esta associado à redução da dopa-cromo originando novamente a ciclo-dopa.¹⁰

Um critério bastante utilizado para determinar se no processo eletródico existe uma reação química acoplada é a análise da variação da função corrente ($i_p \cdot v^{-1/2}$) com o aumento de v . Para processos reversíveis e irreversíveis a função corrente ($i_{pa} v^{-1/2}$) é um parâmetro que independe de v . No entanto se a irreversibilidade do processo eletródico é proveniente de reações químicas acopladas ao processo de transferência eletrônica, a função corrente ($i_p \cdot v^{-1/2}$) varia com a v dependendo da natureza da reação química, podendo ser observada uma diminuição ou um aumento da mesma com o aumento da v .¹⁴

A Figura 7 mostra o gráfico $i_{pa} v^{-1/2}$ em função de v para a L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 3,0.

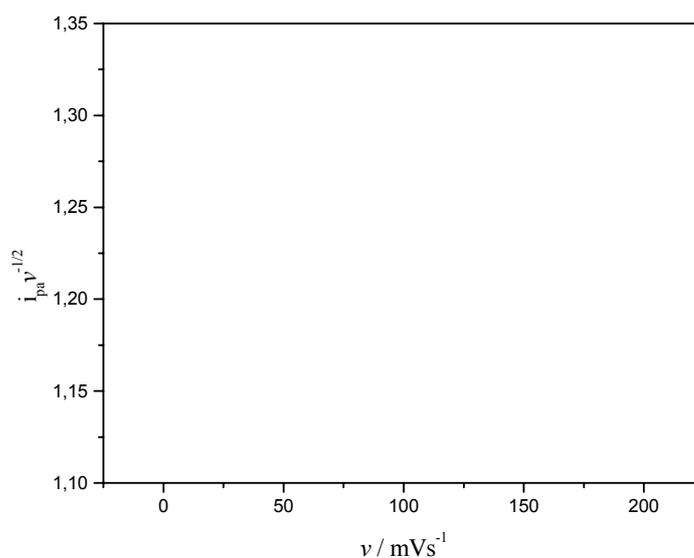


Figura 7: Gráfico $i_{pa} v^{-1/2} \times v$ para L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e pH 3,0.

De acordo com a curva acima, é observado um deslocamento da função corrente com o aumento da v de 10 para 200 mVs^{-1} , deste modo, esses resultados confirmam a presença de uma reação química acoplada à transferência eletrônica no processo de oxidação da L-dopa.

Para o estudo da etapa determinante da velocidade de reação foram estudados dois critérios muito utilizados na literatura, através da análise da curva da variação do logaritmo da i_{pa} em função do logaritmo da v e através da análise da curva de i_{pa} em função de $v^{1/2}$.

A etapa determinante da velocidade de reação pode ser através da transferência de massa, de uma reação química intermediária, de uma mudança de estado físico no caso por adsorção ou ainda por transferência de elétron.²²

A Figura 8 mostra o gráfico $\log i_{pa}$ x $\log v$ para a L-dopa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução acetato de sódio $0,1$ mol L⁻¹ e pH 3,0.

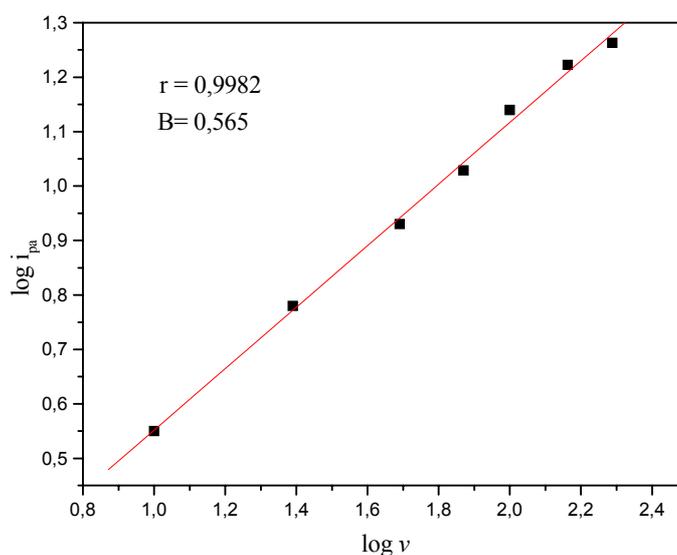


Figura 8: Gráfico $\log i_{pa}$ x $\log v$ para a L-dopa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução acetato de sódio $0,1$ mol L⁻¹ e pH 3,0.

Para um processo eletródico em que a etapa determinante da velocidade de reação é controlada por adsorção, um valor de inclinação para o gráfico $\log i_{pa}$ x $\log v$ próximo a 1,0 é esperado, para valores experimentais próximos a 0,5 indica que a etapa determinante da velocidade de reação é controlado por difusão.^{18,20}

Na Figura 8 observa-se que a curva $\log i_{pa}$ x $\log v$ apresentou um comportamento linear, apresentando um coeficiente de correlação de 0,9982, e valor de inclinação de aproximadamente 0,565. Neste caso a partir do valor de inclinação fica claro que a etapa determinante da velocidade de reação é controlada por difusão, ou seja feita por transferência de massa, a difusão surge quando existe uma diferença de concentração entre

duas regiões de uma solução, enquanto uma espécie é reduzida na superfície do cátodo (ou oxidada na superfície do ânodo), íons ou moléculas movem-se de uma região mais concentrada, para uma mais diluída.²²

Outro critério utilizado para determinar a etapa determinante da velocidade de reação, foi a análise da curva de $i_{pa} \times v^{1/2}$, segundo a teoria para processos irreversíveis i_{pa} varia linearmente com a $v^{1/2}$, indicando que a etapa determinante da velocidade de reação é controlada por difusão.^{18,20}

A Figura 9 mostra o gráfico $i_{pa} \times v^{1/2}$, para L-dopa $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 3,0.

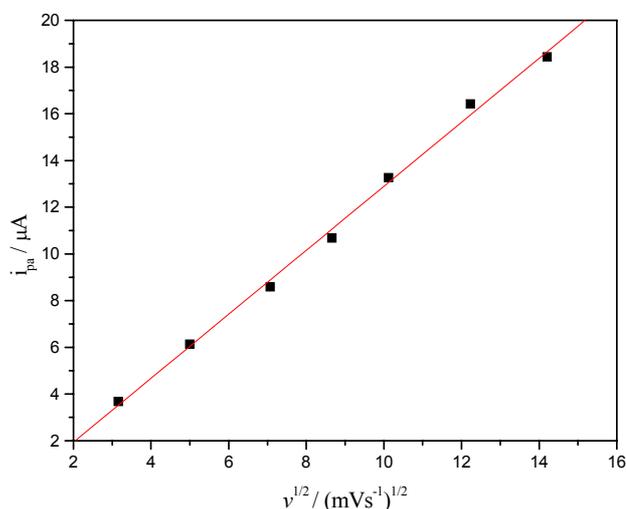


Figura 9: Gráfico de $i_{pa} \times v^{1/2}$, para a L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 3,0.

Analisando a Figura 9, podemos observar que a curva de $i_{pa} \times v^{1/2}$ apresentou uma relação linear, evidenciando assim a etapa determinante da velocidade de reação como sendo difusional.

4.4 Curva de Calibração para L-dopa

Usando as melhores condições de trabalho para o procedimento proposto foi construída uma curva de calibração para o padrão L-dopa. A Figura 10 mostra a curva obtida dentro de uma faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

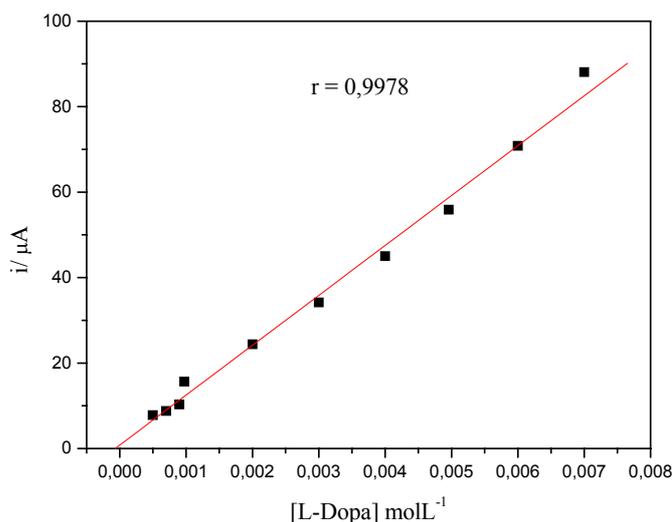


Figura 10: Curva de calibração para L-dopa variando a concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e pH 3,0.

De acordo com a Figura 10 a curva de calibração apresentou linearidade em todo intervalo de concentração estudada, apresentando um coeficiente de correlação 0,9978, indicando uma boa linearidade para a faixa de trabalho.

Primeiramente em termos de validação de métodos foram calculados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), que são características do desempenho de cada procedimento de análise e dependem de certas características em estudo.²¹

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental.

O limite de quantificação (LQ) de um método representa a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada de forma quantitativa com precisão e exatidão aceitáveis utilizando um determinado procedimento experimental. Baseado em

parâmetros da curva analítica, segundo a IUPAC, a LD e LQ podem ser calculadas através da equação:

$$LD = \frac{3 \cdot Sb}{b} \qquad LQ = \frac{10 \cdot Sb}{b} \qquad \text{Eq. (1)}$$

Onde nesta equação, Sb corresponde ao valor do desvio padrão dos valores de corrente obtidos da curva relacionada ao branco, ou do coeficiente linear da equação, e b representa o coeficiente angular da curva de calibração.²¹

Assim, 10 voltamogramas cíclicos foram obtidos para o branco e os 10 valores de corrente foram analisados, calculando-se um valor médio e um desvio padrão.

A partir da Eq. (1) e da curva analítica foram obtidos os valores para LD de $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para LQ de $6,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Esses resultados revelam uma boa sensibilidade do método, alcançando limites de detecções relativamente baixos.

A partir da faixa de concentração estudada, e limites de detecção calculados, assim como a boa linearidade apresentada, foi feita a determinação da L-dopa em uma formulação farmacêutica.

Precisão e exatidão foram outros critérios avaliados na validação do método proposto. A precisão representa o grau de concordância mútua, repetidos de uma mesma amostra que tenham sido realizadas exatamente do mesmo modo.¹⁶ A precisão, foi testada em termos da porcentagem do desvio padrão absoluto e através da repetibilidade.

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição: mesmo analista, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local, repetições em curto intervalo de tempo.¹⁶

Sendo assim, foram realizadas 10 medidas sucessivas através da técnica de voltametria cíclica para uma solução de L-dopa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, em solução acetato de sódio $0,1$ mol L⁻¹, $v = 100$ mVs⁻¹ e pH 3,0 e. A Tabela 1 apresenta os dados encontrados.

Tabela 1: Repetibilidade para uma solução de L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ e pH 3,0.

Amostra L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	
Parâmetro i_{pa} (μA)	
Valores medidos	12,03
	11,89
	11,41
	11,70
	11,81
	11,71
	11,72
	11,80
	11,73
	11,82
Média (μA)	11,76
Desvio padrão Absoluto (s)	0,18
RSD (%)	0,09

Através dos resultados mostrados na tabela acima, para o estudo da repetibilidade de 10 voltamogramas cíclicos obtidos para a solução de L-dopa, apresentando como parâmetro avaliado a corrente de pico anódica (i_{pa}), verifica-se que existe um grau de concordância entre os resultados obtidos, onde um valor de RSD igual a 0,09 foi obtido. Ficando claro desta forma, que o método aplicado apresenta boa precisão.

4.5 Aplicação da metodologia para determinação de L-dopa

4.5.1 Determinação de L-dopa em formulação farmacêutica

O método proposto foi aplicado para a determinação de L-dopa em uma formulação farmacêutica (Prolopa[®] 125mg), que segundo o fabricante apresenta 100 mg de L-dopa e 25 mg de benserazida, utilizando o método da adição de padrão.

O método da adição de padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra. Esse método é muito utilizado com o objetivo de minimizar os problemas causados pelo efeito de matriz, que geralmente apresentam espécies que afetam as propriedades das substâncias a serem determinadas, com isso o objetivo é realizar assim medidas experimentais nas mesmas condições ou na condição mais próxima possível das condições da matriz.¹⁴

Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas correntes obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde a corrente de pico da substância, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abscissas, a concentração da substância na amostra analisada.¹⁶

A partir dessa metodologia empregada, uma alíquota de 15 mL da solução estoque da amostra foi adicionada na célula eletroquímica, conforme descrito no procedimento experimental, a seguir foram realizadas adições sucessivas do padrão L-dopa em forma sólida, e registrados os voltamogramas após cada adição.

A Figura 11 mostra os voltamogramas obtidos para adição da alíquota de amostra e para adições sucessivas do padrão de L-dopa.

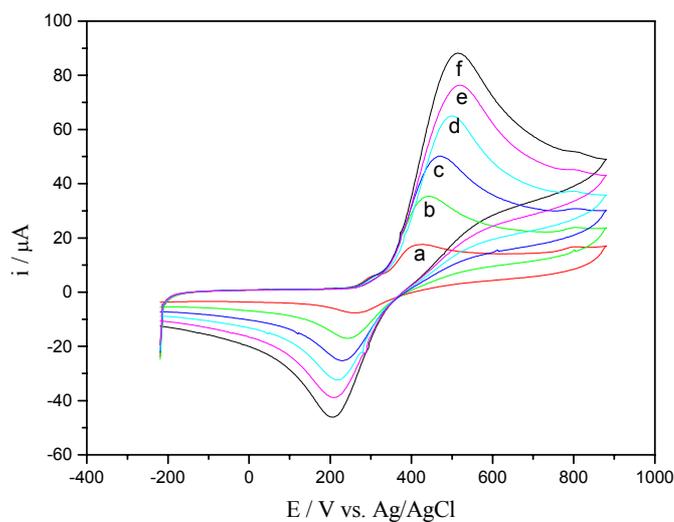


Figura 11: Voltamogramas cíclicos obtidos para determinação de L-dopa em amostra de comprimido de Prolopa®. (a) somente solução estoque (b-f) adições sucessivas de 3mg do padrão L-dopa em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ e pH 3,0.

Os valores obtidos para a determinação de L-dopa através do método da adição de padrão foram realizados em triplicata, utilizando a mesma solução estoque preparada como descrita no procedimento experimental. O gráfico da i_{pa} x mg L-dopa adicionada está apresentado na Figura 12.

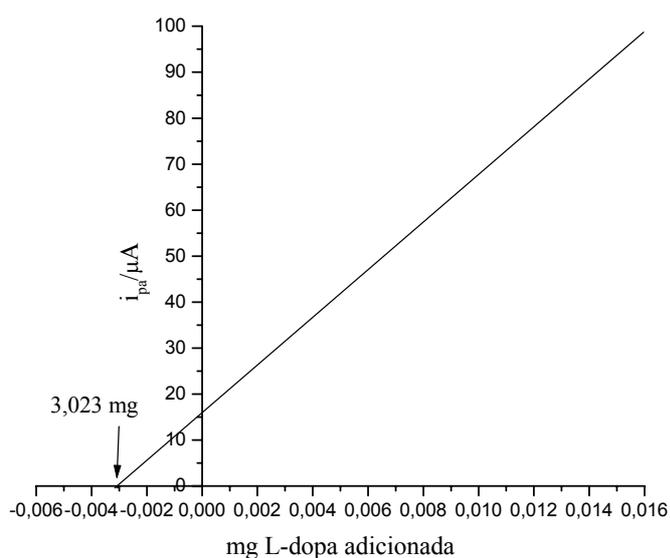


Figura 12: Gráfico de i_{pa} x mg L-dopa adicionada.

Os valores de L-dopa encontrados em (mg) e (%), desvio padrão absoluto (s), desvio padrão relativo (RSD) e erro relativo (Er), obtidos para uma média de três determinações de L-dopa na formulação farmacêutica de um comprimido Prolopa[®] estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados obtidos para quantificação de L-dopa na amostra de um comprimido Prolopa[®] através do método eletroanalítico.

Amostra	Valor rotulado L-Dopa (mg)	(%) L-dopa comprimido	Encontrado (mg)	(%) de L-dopa encontrada	(s) (%)	RSD (%)	Er (%)
	100	80	100,76	80,76			
Prolopa [®]	100	80	102,83	82,83	1,13	1,10	2,06
	100	80	102,60	82,60			
Média			102,06				

s = desvio padrão absoluto entre a média dos valores encontrados (mg), Er = erro relativo entre o valor encontrado (mg) e o valor rotulado.

Através do método de adição padrão obteve-se um valor encontrado para L-dopa de 3,023 mg no comprimido Prolopa[®] em 15 mL de solução. Esse valor corresponde a 100,76 mg de L-dopa na solução estoque preparada como descrita no procedimento experimental. Segundo o fabricante um comprimido de Prolopa[®] contém 100 mg de L-dopa e 25 mg de benserazida, o que corresponde a 80% de L-dopa em um comprimido, através dos valores encontrados e mostrados na Tabela 2 obteve-se 80,76% de L-dopa, observando-se assim excelentes resultados para o método proposto, ou seja uma boa exatidão do método, pois obteve-se um grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

Obteve-se um desvio padrão absoluto (s) igual a 1,13% e um desvio padrão relativo (RSD) igual a 1,10% o que revela uma boa precisão do método.

O erro relativo foi de 2,06%, este valor está dentro do valor de erro esperado para a técnica de voltametria cíclica, cujos valores de erros podem variar de 1 a 3%.

Como citado anteriormente foram feitas adições sucessivas de 3 mg do padrão L-dopa na forma sólida à célula eletroquímica. A tabela 3 mostra os valores obtidos para adição e recuperação da massa de L-dopa feitas a célula.

Tabela 3: Estudo da adição e recuperação de L-dopa na formulação farmacêutica Prolopa[®].

Padrão L-dopa			
Amostra	Adicionado (mg)	Encontrado (mg)	Recuperação (%)
Prolopa [®]	3,0	3,1	103,3
	6,0	5,9	98,3
	9,0	8,9	98,8
	12,0	11,7	98,8
	15,0	14,6	97,3

Através dos valores obtidos para o estudo da adição e recuperação mostrados na Tabela 3, observa-se que o método proposto apresentou excelentes resultados de recuperação. Comprovando novamente a boa exatidão do método proposto.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos para as análises dos critérios que caracterizam o processo eletródico através da técnica de voltametria cíclica, o processo de oxidação da L-dopa, é caracterizado por um processo eletroquimicamente irreversível e controlado por difusão, sugerindo também a presença de uma reação química acoplada à transferência eletrônica no processo de oxidação da L-dopa.

A aplicação da metodologia eletroanalítica, para a determinação do composto L-dopa em uma fórmula farmacêutica apresentou resultados bastante satisfatórios, obtendo-se um valor encontrado de 80,60% de L-dopa no comprimido Prolopa®, e um erro relativo (Er) de 2,06%. Desta maneira, fica claro que a aplicação do método da adição de padrão pode ser recomendada para a determinação de compostos em fármacos, pois apresentou resultados satisfatórios, além de ser um método simples, rápido, de baixo custo, de boa precisão e exatidão.

Para garantir que os resultados obtidos fossem confiáveis e atendessem às exigências das aplicações analíticas, foram realizados alguns estudos de validação de métodos, nos quais foram encontrados os valores para LD de $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e para LQ de $6,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, indicando uma boa sensibilidade do método. Precisão e exatidão também foram avaliados, apresentando excelentes resultados, taxas de recuperação de 103,3% foram encontradas.

Referências Bibliográficas

- 1 - Kawde, R. B.; Laxmeshwar, N. B.; Santhanam K. S. V.; *Sensors and Actuators B* ,**1995**, 23, 35-39.
- 2 - Korolkovas A.; Burckhalter J. H.; *Química Farmacêutica* 1988, 260.
- 3 - Cunha, F. A.; Oliveira, E.; Suassuna, I.; Silva, J. A. P. S.; Sollero, L.; Nobrega, M. A. F.; Costa, P. D.; Cruz, D. A. G.; *Farmacopéia Brasileira*. 3. ed. Brasil
- 4- Faria W. M.; Filho Z. D.; *Psiquiatria Biológica*, **2003**, 11 (2) 45-50.
- 5 - Bergamini, M. F.; Santos, A. L.; Stradiotto, N. R.; Zanoni, V. B.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2005**, 39, 54-59.
- 6 – Nagajara, P.; Murthy Srinivasa, K. C.; Rangappa, K. S.; Made Gowda, N. M.; *Talanta*. **1998**, 46, 39-44.
- 7 – Iolanda, C.V., Fatibello-Filho, O.; *Talanta*.**1998**, 46, 559-564.
- 8 – Garrido, E. M.; Lima, J. L. F. C.; Delerue-Matos, C.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **1997**, 15, 845-849.
- 9 – Teixeira, M. F. S.; Bergamini, M. F.; Marques, C. M. P.; Bochi N.; *Talanta*. **2004**, 63, 1083-1088.
- 10 – Liu, X.; Zhang, Z.; Cheng, G.; Dong, S.; *Electroanalysis*. **2003**, 15(2), 103-107.
- 11 – Souza, D.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A.; *Química Nova*. **2003**, 26, 81-89.
- 12 – Kissinger, P. T.; Heineman, W. R.; *Journal of Chemical Education*. **1983**. 60, 702-706.
- 13 – Aleixo, L. M., *Voltametria: Conceitos e Técnicas*. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil. Disponível em www.chemkeys.com, acessado em 10/06/2006.
- 14 – Magno, A. G. T., *Dissertação de mestrado: Estudo do Comportamento Eletroquímico e Determinação da Moxifloxacina Através de Técnicas Voltamétricas*. UFMS, **2005** Campo Grande /MS.
- 15 - Yan, X. X., Pang, D. W.; Lu, Z-X.; Lü, J-Q. ; Tong, H. ; *Journal Electroanalytical Chemistry*. **2004**, 569, 47-52.
- 16 – Ribani, M.; Bottoli, C. B. G., Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Química Nova*. **2004**, 27(5), 771-780.
- 17 – Sfinder scholar acessado em 10/06/2006.

- 18 - Bard, A.J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. **1980**, John Wiley & Sons Inc: New York, 1980.
- 19 – Baldwin, R. P.; Ravichandran, K.; Johnson, R. K.; *Journal of Chemical Education*. **1984**. 61, 820-823.
- 20 - Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O.; *Electrochemistry. Principles, Methods and Applications*. Oxford, Great Britain. 1993.
- 21 – Oliveira, R. T. S.; Machado, S. A. S.; *Química Nova*. **2004**, 27 (6), 911-915.
- 22 - Skoog, D. A.; Holler, J. F.; Niemann, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*. 5^a ed., Bookman, 2002.