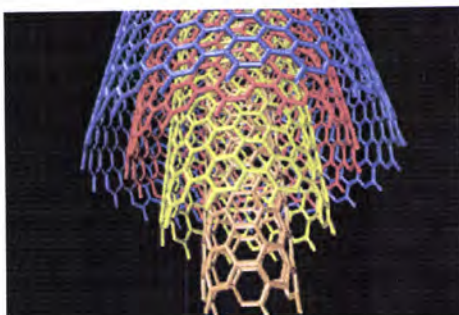




**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS DE
QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS
CONTAMINADAS**

Alfredina de Jesus da Cunha Veiga



Orientador: Professor Doutor Jorge Manuel Ginja Teixeira

Co-orientador: Professora Doutora Dora Maria Fonseca Martins Ginja Teixeira

Dissertação submetida à Universidade de Évora para obtenção do grau de Mestre
em Análises Químicas Ambientais

**Évora
2009**

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Desenvolvimento de métodos electroquímicos de quantificação
de fármacos em amostras de águas contaminadas**

Alfredina de Jesus da Cunha Veiga

Orientador: Professor Doutor Jorge Manuel Ginja Teixeira

Co-orientador: Professora Doutora Dora Maria Fonseca Martins Ginja Teixeira

Dissertação submetida à Universidade de Évora para obtenção do grau de Mestre em Análises Químicas
Ambientais



Évora

2009

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar por agradecer ao Professor Doutor Jorge Teixeira, orientador deste trabalho, e à Professora Doutora Dora Teixeira, co-orientadora, por todo o apoio, incentivo e disponibilidade que sempre manifestaram para me ajudar durante a realização do mesmo.

Em seguida, gostaria de agradecer à Ana Manhita, pela amizade e por toda a ajuda para resolver os meus problemas com o mundo dos pc.

Por último gostaria de agradecer aos meus pais, uma vez que sem a ajuda deles, nada disto teria sido possível.

RESUMO

Este trabalho teve como objectivo, o desenvolvimento de um método electroquímico, para quantificação do fármaco carbamazepina (CBZ) em águas contaminadas.

Neste trabalho foram utilizados quatro métodos voltamétricos: a voltametria cíclica, a voltametria de varrimento linear, a voltametria de onda quadrada e a voltametria de impulso diferencial. Os eléctrodos de trabalho utilizados foram, o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, o eléctrodo de carbono vítreo clássico e um eléctrodo de carbono vítreo modificado com um filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs). O eléctrodo de mercúrio de gota suspensa permitiu o estudo da redução da CBZ numa região de potencial mais catódico, e os eléctrodos de carbono vítreo, com e sem modificação, permitiram o estudo da oxidação da CBZ numa região de potencial mais anódico.

Nas condições experimentais estudadas, o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa revelou ser um sensor voltamétrico pouco eficaz na determinação quantitativa da carbamazepina, em amostras com uma matriz complexa. Entre os eléctrodos de carbono vítreo, o eléctrodo de carbono vítreo modificado com os MWCNTs revelou ser o sensor voltamétrico mais eficaz e sensível, na detecção e determinação da carbamazepina. Modificado com um filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, que previamente foram dispersos em dihexadecilhidrogenofosfato (DHP) e água, este novo eléctrodo permitiu obter uma resposta electroquímica da CBZ, consideravelmente superior ao eléctrodo não modificado.

Utilizando a voltametria de varrimento linear e as condições experimentais consideradas óptimas, o eléctrodo nanoestruturado permitiu obter uma relação linear entre o sinal medido e a concentração da CBZ no intervalo 0.13 – 1.60 μM (30.7 - 378 $\mu\text{g L}^{-1}$), com os limites de detecção e quantificação mais baixos, até à data reportados com métodos electroquímicos (0.04 e 0.14 μM , respectivamente).

O eléctrodo modificado foi aplicado na quantificação da CBZ, em formulações farmacêuticas, em águas naturais tratadas e em amostras de águas residuais, ambas

dopadas, obtendo-se taxas de recuperação consideravelmente elevadas (100.6%, 98.0%, 95.8%, respectivamente).

Os resultados obtidos, na análise da CBZ em amostras ambientais, com o eléctrodo modificado, foram comparados com resultados obtidos por HPLC-UV e LC-ESI-MS/MS, validando o método electroquímico desenvolvido neste trabalho.

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL METHODS FOR PHARMACEUTICALS QUANTIFICATION IN CONTAMINATED WATER SAMPLES

ABSTRACT

The aim of this work was to develop a new electrochemical method for the quantification of carbamazepine (CBZ) in contaminated waters.

In this study, four voltammetric methods were used: cyclic voltammetry, linear sweep voltammetry, square wave voltammetry and differential pulse voltammetry. The working electrodes used were the hanging mercury drop electrode (HMDE), the classical glassy carbon electrode (GCE), and a glassy carbon electrode modified with a film of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). Using HMDE, the reduction of CBZ was studied in the cathodic potential region. The CGE sensors, with or without modification, allowed the study of CBZ oxidation in the anodic potential region.

In the tested conditions, the results obtained for the quantification of CBZ using the HMDE sensor were not very satisfactory, especially when more complex samples were analysed. When the MWCNTs–dihexadecyl hydrogen phosphate (DHP) film-coated GCE was used for the voltammetric determination of CBZ, the results obtained showed that this modified electrode exhibits excellent enhancement effects on the electrochemical oxidation of CBZ. The oxidation peak current of CBZ at this film-modified electrode increased significantly, when compared with that at a bare glassy carbon electrode. The enhanced electrooxidation and voltammetry of CBZ at the surface of MWCNTs-DHP film coated GCE in phosphate buffer solution (pH 6.71) was attributed to the unique properties of MWCNTs such as large specific surface area and strong adsorptive properties providing more reaction sites.

The proposed method was applied to the quantification of CBZ in pharmaceutical formulations, drinking water and wastewater samples with good recoveries and low limits of detection and quantification (0.04 and 0.14 μM , respectively), and was positively compared with chromatographic techniques usually used in the quantification of pharmaceutical compounds in environmental samples.

HPLC-UV and LC-ESI-MS/MS were also used in the quantification of CBZ in pharmaceutical formulations and wastewater samples to prove the importance and accuracy of this voltammetric method.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CBZ - carbamazepina

CV – voltametria cíclica (*cyclic voltammetry*)

CNTs – nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*)

DPV – voltametria de impulso diferencial (*differential pulse voltammetry*)

DHP – dihexadecilhidrogenofosfato (*dihexadecyl hydrogen fosfate*)

E - potencial

E_i – potencial inicial

E_f – potencial final

E_F – energia de Fermi

E_f^o – potencial do par redox

E_p – potencial no máximo do pico

f – frequência

GCE – eléctrodo de carbono vítreo (*glassy carbon electrode*)

HMDE – eléctrodo de gota de mercúrio suspensa (*hanging mercury drop electrode*)

i_a – intensidade da corrente anódica

i_c – intensidade da corrente catódica

i_c – intensidade da corrente capacitiva

i_f – intensidade da corrente faradaica

i_p – intensidade de corrente no máximo do pico (relativamente à linha de base)

LSV – voltametria de varrimento linear (*linear sweep voltammetry*)

MWCNTs – nanotubos de carbono de paredes múltiplas (*multi-walled carbon nanotubes*)

MWCNTs-DHP/GCE – eléctrodo de carbono vítreo modificado com um filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas – dihexadecilhidrogenofosfato

m/z – razão massa carga

SWCNTs - nanotubos de carbono de paredes simples (*single walled carbon nanotubes*)

SWV – voltametria de onda quadrada (*square wave voltammetry*)

SPE – extracção em fase sólida (*solid phase extraction*)

SMDE – eléctrodo de gota de mercúrio estática (*static mercury drop electrode*)

t – tempo

v – velocidade de varrimento

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vi
ÍNDICE GERAL.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
INTRODUÇÃO	16
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1. 1. CARBAMAZEPINA	19
1. 2. ALGUNS FUNDAMENTOS DE ELECTROQUÍMICA NA INTERFACE ELÉCTRODO/SOLUÇÃO.....	25
1. 3. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS.....	28
1. 3. 1. VOLTAMETRIA CÍCLICA	29
1. 3. 2. VOLTAMETRIA DE VARRIMENTO LINEAR	32
1. 3. 3. TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS POR IMPULSOS	32
1. 3. 3. 1. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	33
1. 3. 3. 2. VOLTAMETRIA DE IMPULSO DIFERENCIAL.....	35
1. 4. ELÉCTRODOS DE TRABALHO	37
1. 4. 1. ELÉCTRODO DE MERCÚRIO DE GOTA SUSPensa	38
1. 4. 2. ELÉCTRODO DE CARBONO VÍTREO	38
1. 4. 3. ELÉCTRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS.....	40
1. 4. 3. 1. NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS.....	41
1. 5. PREPARAÇÃO DE AMOSTRA: EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	44
1. 6. QUANTIFICAÇÃO	45
1. 7. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	47

2. PARTE EXPERIMENTAL	52
2. 1. EQUIPAMENTO	52
2. 1. 1. CÉLULA ELECTROQUÍMICA.....	53
2. 1. 2. ELÉCTRODO DE REFERÊNCIA	54
2. 1. 3. ELÉCTRODO AUXILIAR.....	54
2. 1. 4. ELÉCTRODOS DE TRABALHO.....	55
2. 1. 4. 1. ELÉCTRODO DE MERCÚRIO DE GOTA SUSPensa.....	55
2. 1. 4. 2. ELÉCTRODO DE CARBONO VÍTREO	55
2. 1. 4. 3. ELÉCTRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO	56
2. 1. 5. HPLC–UV/Vis	57
2. 1. 6. LC-ESI-MS/MS	57
2. 1. 7. EQUIPAMENTO AUXILIAR	57
2. 2. MATERIAIS E REAGENTES.....	58
2. 3. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES	59
2. 4. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS	60
2. 5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE EFLUENTE.....	60
2. 6. TESTES DE DOPAGEM E RECUPERAÇÃO	61
2. 7. MEDIÇÕES VOLTAMÉTRICAS.....	62
2. 8. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR UV/Vis. (HPLC-UV/Vis) E COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS).....	65
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	67
3. 1. ESTUDO DO COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA CARBAMAZEPINA COM O ELÉCTRODO DE MERCÚRIO DE GOTA SUSPensa	67
3. 1. 1. VOLTAMETRIA CÍCLICA	67
3. 1. 1. 1. ESTUDO DA VELOCIDADE DE VARRIMENTO.....	69
3. 1. 2. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	73
3. 1. 2. 1. EFEITO DO PH	74
3. 1. 2. 2. EFEITO DO POTENCIAL INICIAL.....	75

3. 1. 2. 3. EFEITO DO TEMPO DE DEPOSIÇÃO	76
3. 1. 2. 4. EFEITO DA FREQUÊNCIA	77
3. 1. 2. 5. CURVA DE CALIBRAÇÃO	78
3. 1. 3. VOLTAMETRIA DE IMPULSO DIFERENCIAL	81
3. 2. ESTUDO DO COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA CARBAMAZEPINA USANDO UM ELÉCTRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO	83
3. 2. 1. ESTUDO PRELIMINAR	83
3. 2. 1. 1. VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	83
3. 2. 1. 2. VOLTAMETRIAS DE IMPULSO: VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA E VOLTAMETRIA DE IMPULSO DIFERENCIAL	88
3. 2. 2. ESTUDO DE VARIÁVEIS ELECTROANALÍTICAS QUE INFLUENCIAM A RESPOSTA DA CARBAMAZEPINA NO ELÉCTRODO MWCNTs-DHP/GCE	91
3. 2. 2. 1. EFEITO DA PRESENÇA DO SOLVENTE HIDROFÓBICO DHP	91
3. 2. 2. 2. EFEITO DA VELOCIDADE DE VARRIMENTO	93
3. 2. 2. 3. EFEITO DO TEMPO E POTENCIAL DE EQUILÍBRIO	96
3. 2. 2. 4. INFLUÊNCIA DO PH.....	98
3. 2. 2. 5. EFEITO DA QUANTIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS NO FILME MODIFICADOR	100
3. 2. 2. 6. INFLUÊNCIA DO ELECTRÓLITO DE SUPORTE.....	102
3. 2. 2. 7. INFLUÊNCIA DE POTENCIAIS INTERFERENTES.....	104
3. 3. QUANTIFICAÇÃO DE CARBAMAZEPINA COM O MWCNTs-DHP/GCE	108
3. 3. 1. CURVA DE CALIBRAÇÃO	108
3. 3. 2. DETERMINAÇÃO DA CARBAMAZEPINA EM AMOSTRAS REAIS.....	110
3. 3. 2. 1. DETERMINAÇÃO DA CARBAMAZEPINA NO FÁRMACO TEGRETOL [®]	111
3. 3. 2. 2. DETERMINAÇÃO DA CARBAMAZEPINA EM ÁGUA DA TORNEIRA DOPADA.....	112
3. 3. 2. 3. DETERMINAÇÃO DA CARBAMAZEPINA NUM EFLUENTE DOPADO.....	113
3. 4. QUANTIFICAÇÃO DA CARBAMAZEPINA: MÉTODO VOLTAMÉTRICO PROPOSTO <i>VERSUS</i> OS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS HPLC-UV/VIS E LC-ESI-MS/MS	115
4. CONCLUSÃO.....	118
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	123

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
7. ANEXOS.....	A1

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físicas, químicas e farmacológicas da carbamazepina (CBZ).....	21
Tabela 2 - Volume anual de consumo de carbamazepina (CBZ) em alguns países e estimativa do seu volume global.	23
Tabela 3 – Características e fabricantes dos materiais utilizados.....	58
Tabela 4 – Grau de pureza e fabricantes dos reagentes utilizados.....	58
Tabela 5 - Condições experimentais utilizadas na voltametria cíclica (escada).....	63
Tabela 6 - Condições experimentais utilizadas na voltametria de varrimento linear (LSV).	63
Tabela 7 - Condições experimentais utilizadas na voltametria de onda quadrada (SWV).	64
Tabela 8 - Condições experimentais utilizadas na voltametria de impulso diferencial (DPV)....	64
Tabela 9 - Influência de potenciais interferentes na resposta voltamétrica de 0.4 µM de CBZ, para uma razão molar 1:1.	107
Tabela 10 – Determinação da CBZ no fármaco Tegretol® e em amostras de águas residuais dopadas.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Via metabólica conhecida da CBZ (adaptado de Reith <i>et al.</i> , 2000).	22
Figura 2 - Voltamograma típico para um processo reversível $R \leftrightarrow O + n\bar{e}$	31
Figura 3 - Voltamograma cíclico para um sistema irreversível $R \rightarrow O + n\bar{e}$	31
Figura 4 - Esquema de aplicação de potenciais em voltametria de onda quadrada.	33
Figura 5 - Representação esquemática das intensidades de corrente directa (I_d) e inversa (I_i) e o diferencial resultante (ΔI).....	34
Figura 6 - Perfil de aplicação de potenciais em voltametria de impulso diferencial: impulsos sobre (a) rampa (Wang, 2006) e (b) escada. Utilizando o gráfico (b) como referência: ① potencial inicial, E_i ; ② amplitude do(s) impulso(s), ΔE_p ; ③ duração do(s) impulso(s) (equivalente ao período de modulação, t_p); ④ incremento de potencial entre dois impulsos consecutivos (equivalente ao valor do degrau de potencial, ΔE_s); ⑤ intervalo de tempo entre a aplicação de dois impulsos consecutivos (equivalente à duração do degrau de potencial, t_s); ⑥ potencial final, E_f ; ⑦ e ⑧, instantes em que se faz a amostragem de corrente, i_1 e i_2 , respectivamente..	36
Figura 7 - Estrutura dos nanotubos de paredes simples (<i>single walled carbon nanotubes</i> , SWCNTs) (Hall, 2009).....	42
Figura 8 - Estrutura dos nanotubos de paredes múltiplas (<i>multi-walled carbon nanotubes</i> , MWCNTs) (Stanford University, 2006).	43
Figura 9 - Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT 20.	52
Figura 10 - Posto electroquímico, modelo 663 VA Stand.	53
Figura 11 - Interface IME 663.	53
Figura 12 - Célula electroquímica.....	53
Figura 13 - Conjunto de eléctrodo de referência e ponte salina, desmontado e montado.	54
Figura 14 - Eléctrodo auxiliar e respectivo suporte, separados e em conjunto.....	54
Figura 15 - <i>Multi-Mode Electrode</i> (MME) (à esquerda) e capilar de vidro (à direita). A parte C do capilar é introduzida na parte M, do MME.	55
Figura 16 - Eléctrodo de carbono vítreo.	56
Figura 17 - Eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma suspensão de MWCNTs-DHP (vista de topo).	56
Figura 18 - Voltamogramas cíclicos de 0.0 μM (linha tracejada a azul) e 6.0 μM (linha contínua a vermelho) de CBZ, no tampão fosfato 0.1 M pH ~ 7 , a $v = 0.100 \text{ V/s}$ e $E_i = -0.400 \text{ V}$	69
Figura 19 - Efeito da velocidade de varrimento nos voltamogramas cíclicos de 6.0 μM CBZ, obtidos com o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE), no tampão fosfato 0.1M pH ~ 7 , no intervalo de velocidade entre 0.005 e 0.500 V s^{-1}	70
Figura 20 - Intensidade da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento. Intervalo de velocidade considerado: 0.010 a 0.500 V s^{-1}	71
Figura 21 - Relação log-log entre a Intensidade da corrente de pico e a velocidade de varrimento. Intervalo de velocidade considerado: 0.010 a 0.500 V s^{-1}	71
Figura 22 - Potencial de pico em função do logaritmo da velocidade de varrimento. Intervalo de velocidade considerado: 0.010 a 0.500 V s^{-1}	72
Figura 23 - Voltamogramas de SWV de (a) 0.40 μM de CBZ no tampão fosfato 0.1 M pH ~ 7 e (b) do próprio tampão, obtidos a uma frequência de 25 Hz, a um $t_{\text{dep}} = 0 \text{ seg}$ e a um $t_{\text{eq}} = 15$	

seg. As curvas (a _d) e (a _i) representam, respectivamente, as componentes directa e inversa de corrente do voltamograma (a).....	74
Figura 24 - Intensidade da corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada em função do pH do meio. E _i = -0.400 V; t _{dep} = 0 s; t _{eq} = 15 s; Frequência = 25 Hz. [CBZ] = 0.40 μM.....	75
Figura 25 - Intensidade da corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada em função do potencial inicial. t _{dep} = 0 s; t _{eq} = 15 s; Frequência = 25 Hz. [CBZ] = 0.40 μM.	76
Figura 26 - Intensidade da corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada em função do tempo de deposição. E _i = -0.400 V; t _{eq} = 15 s; Frequência = 25 Hz. [CBZ] = 0.40 μM.	77
Figura 27 - Intensidade da corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada em função da frequência. E _i = -0.400 V; t _{dep} = 60 s; t _{eq} = 15 s; [CBZ] = 0.40 μM.	78
Figura 28 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos a uma frequência de 100 Hz. [CBZ] / μM: 0.020 - 2.13. O voltamograma (a) representa a resposta do electrólito de suporte.....	79
Figura 29 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos a uma frequência de 200 Hz. [CBZ] / μM: 0.020 - 2.13. O voltamograma (a) representa a resposta do electrólito de suporte.....	79
Figura 30 - Curvas de calibração da CBZ, a duas frequências: 100 e 200 Hz.	81
Figura 31 - Voltamogramas de DPV de (a) 0.40 μM de CBZ no tampão fosfato 0.1M pH ~ 7 e (b) do próprio tampão, obtidos com uma amplitude de impulso de 0.020 V, uma velocidade de varrimento efectiva de 4.8 mV s ⁻¹ , t _{dep} = 0 s e t _{eq} = 15 s. E _i = -0.400 V.....	82
Figura 32 - Voltamogramas cíclicos de 6.0 μM CBZ num (a) eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 8 μL de suspensão MWCNTs-DHP e (c) num eléctrodo de carbono vítreo não modificado, no tampão fosfato 0.1M pH 7. Os voltamogramas (b) e (d) representam os voltamogramas do electrólito de suporte, nos respectivos eléctrodos. E _i = -0.700 V; v = 0.100 V/s.	85
Figura 33 – Voltamogramas obtidos em três voltametrias cíclicas de ciclo simples sucessivas.	87
Figura 34 - Três voltamogramas cíclicos sucessivos, com um tempo de espera de 180 s, entre medições, a uma velocidade de rotação de 1000 a 1500 rot min ⁻¹	88
Figura 35 - Voltamogramas de onda quadrada da CBZ, obtidos com um eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 10 μL de suspensão MWCNTs-DHP, no tampão fosfato 0.1 M pH 7. [CBZ]: (a) 0, (b) 0.667, (c) 1.333 e (d) 2.667 μM. Os voltamogramas (d _{dir}) e (d _{inv}) representam as respectivas componentes directa e a inversa do voltamograma (d). E _i = -0.700 V; f = 100 Hz; ΔE _p = 19.95 mV; ΔE _s = 1.2 mV; t _{eq} = 15 s.	89
Figura 36 - Voltamogramas de impulso diferencial da CBZ, obtidos com um eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 10 μL de suspensão MWCNTs-DHP, no tampão fosfato 0.1 M pH 7. [CBZ]: (a) 0, (b) 0.667, (c) 1.333 e (d) 2.667 μM. Os voltamogramas (d _{dir}) e (d _{inv}) representam as respectivas componentes directa e a inversa do voltamograma (d). E _i = -0.700 V; t _p = 50 ms; t _s = 250 ms ΔE _p = 30 mV; ΔE _s = 1.2 mV; t _{eq} = 15 s.	91
Figura 37 - Voltamogramas cíclicos de 6.0 μM CBZ num eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 8 μL de suspensão de (a) MWCNTs-DHP e (c) DHP, no tampão fosfato 0.1 M pH ~ 7. Os voltamogramas (b) e (d) representam os voltamogramas do electrólito de suporte, nos respectivos eléctrodos. E _i = -0.700 V; v = 0.100 V s ⁻¹	92
Figura 38 - Efeito da velocidade de varrimento, no intervalo de velocidades entre 0.025 e 0.300 V s ⁻¹ , nos voltamogramas cíclicos de 6.0 μM CBZ, obtidos com o eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 8 μL de suspensão MWCNTs-DHP, no tampão fosfato 0.1 M pH 7.	93

Figura 39 - Intensidade de corrente do pico anódico P ₅ da CBZ, em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento. Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 38.....	94
Figura 40 - Relação log-log da intensidade de corrente do pico anódico P ₅ da CBZ, em função da velocidade de varrimento. Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 38.....	95
Figura 41 - Relação semi-log do potencial do pico anódico P ₅ da CBZ, em função da velocidade de varrimento. Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 38.....	96
Figura 42 - Estudo do efeito do tempo de equilíbrio na intensidade da corrente de pico P ₅ da carbamazepina. E _i = -0.700 V; v = 0.100 V s ⁻¹	97
Figura 43 - Estudo do efeito do potencial inicial na intensidade da corrente de pico P ₅ da carbamazepina. t _{eq} = 15 s; v = 0.100 V s ⁻¹	98
Figura 44 - Efeito do pH da solução de electrólito de suporte no comportamento electroquímico da CBZ, num eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 8 µL de suspensão MWCNTs-DHP. [CBZ] = 6.0 µM. pH: (a) 3.01, (b) 6.89, e (c) 11.27.....	99
Figura 45 - Efeito do pH na intensidade de corrente de pico (i _p) e no potencial do pico de oxidação (E _p) de CBZ. Condições experimentais idênticas às da Figura 44, para todos os valores de pH estudados.....	100
Figura 46 - Intensidades de corrente do pico P ₅ , em função do volume de suspensão MWCNTs-DHP: 2, 4, 6, 8, 10 e 12 µL, a três velocidades de varrimento: (a) 0.025, (b) 0.100, e (c) 0.300 V s ⁻¹ . [CBZ] = 6.0 µM.	101
Figura 47 - Voltamogramas cíclicos de 6.0 µM CBZ, obtidos com o eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 10 µL de suspensão MWCNTs-DHP, no tampão fosfato 0.1M pH 7. E _i = -0,700 V; v / V s ⁻¹ : (a) 0.025, (b) 0.100, e (c) 0.300.	102
Figura 48 - Relações entre a intensidade de corrente do pico mais anódico da CBZ e a concentração desta, obtidas em 3 electrólitos de suporte: tampão fosfato 0.1 M pH 7; tampão acetato 0.1 M pH 4.7; tampão amónio 0.1M pH 11. Usou-se uma gota de 10 µL de suspensão de MWCNTs-DHP e v=0.100 Vs ⁻¹	104
Figura 49 - Voltamogramas de varrimento linear, obtidos com soluções de CBZ com concentração diferente (µM), no tampão fosfato 0.1 M pH 7, a v = 0.100 V s ⁻¹	109
Figura 50 - Curva de calibração da CBZ, no intervalo de concentração 0.13 - 1.60 µM (30.7 - 378 µg L ⁻¹).....	110
Figura 51 - Curva de adição padrão, obtida na determinação da CBZ no fármaco Tegretol®. A figura inserida ilustra cinco picos de oxidação P ₅ da CBZ, corrigidos para a linha de base, dos voltamogramas correspondentemente obtidos com as soluções de Tegretol® (sem e com quatro adições padrão).	112
Figura 52 - Curva de adição padrão, obtida na determinação da CBZ numa amostra de água da torneira dopada.	113
Figura 53 - Determinação da CBZ em dois efluentes dopados com 0.212 µM, um no seu estado bruto e o outro passado previamente por SPE, através do método da adição padrão.....	115

INTRODUÇÃO

O elevado consumo de fármacos tem vindo a tornar-se um problema ambiental relevante. Um grande volume de substâncias farmacêuticas é usado na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças em humanos e animais. A média mundial *per capita* de consumo de fármacos, por ano, está estimada em cerca de 15 g, sendo que nos países industrializados este valor encontra-se entre 50 e 150 g (Batt *et al.*, 2006). Uma grande parte dos fármacos não é completamente degradada após a sua aplicação. Como resultado, os metabolitos dos fármacos e algumas formas inalteradas são excretadas através das fezes e urina, entrando subsequentemente no ecossistema (Lin *et al.*, 2009).

As estações de tratamento de águas residuais actuam como principal porta de entrada de fármacos de uso humano nos cursos de água, enquanto os de uso animal são normalmente descarregados directamente no ecossistema. Num primeiro estudo sobre a presença de fármacos e seus resíduos em águas, 80% de 32 fármacos seleccionados foram detectados pelo menos numa estação de tratamento de águas residuais, enquanto 20 fármacos diferentes e 4 metabolitos correspondentes foram detectados em rios e lagos (Ternes, 1998; Wick *et al.*, 2009). Por exemplo, a carbamazepina foi detectada em águas subterrâneas a uma concentração de 610 ngL^{-1} , o ácido clofíbrico e o diclofenac de sódio foram encontrados em águas superficiais numa concentração entre 10 e 165 ng L^{-1} e 10 ng L^{-1} , respectivamente (Drewes *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2008).

Na última década, os investigadores tem então detectado uma grande variedade de fármacos no ambiente aquático. Esta detecção tem sido feita utilizando as técnicas analíticas mais avançadas, tornando possível detectar contaminantes ao nível do nanograma por litro (Kolpin *et al.*, 2003; Till, 2003). Até agora, os métodos analíticos mais reportados na literatura têm sido: a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), geralmente combinadas com a espectrometria de massa (GC-MS, LC-MS); a electroforese capilar - espectrometria de massa e a cromatografia líquida de alta eficiência - fluorimetria fotoquimicamente induzida (LC-PIF) (La Farre *et al.*, 2001; Ahrer *et al.*, 2001; Gonzalez-Barreiro *et al.*,

2003; Andreozzi *et al.*, 2002). No entanto, estes métodos requerem equipamentos sofisticados, reagentes dispendiosos e vários passos de manipulação das amostras, tornando-se assim necessário procurar métodos analíticos alternativos.

Os métodos electroquímicos, tais como as voltametrias, apresentam-se como uma alternativa viável, dado que proporcionam uma série de vantagens práticas e económicas. Especialmente, quando a selectividade, sensibilidade e rapidez da determinação podem ser melhoradas, usando estratégias de transdução específicas e simples.

Entre as vantagens analíticas das técnicas voltamétricas incluem-se uma excelente sensibilidade, com um intervalo de concentração linear muito alargado, tanto para espécies inorgânicas como para orgânicas (10^{-12} a 10^{-1} M), o uso de um elevado número de solventes e electrólitos num intervalo de temperatura extenso, um tempo de análise muito reduzido (da ordem dos segundos), a determinação simultânea de vários analitos, a habilidade de determinar parâmetros cinéticos e mecanísticos, uma teoria bem desenvolvida que permite estimar de uma forma razoável valores de parâmetros desconhecidos, e a forma como correntes muito pequenas conseguem ser medidas.

Um dos principais desafios deste trabalho foi a preparação e caracterização de um eléctrodo quimicamente modificado, para ser usado na determinação electroquímica do fármaco carbamazepina em amostras de água contaminadas, uma vez que este fármaco é um dos que tem vindo a ser mais frequentemente detectados em cursos de água (Zhang *et al.*, 2008).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. 1. CARBAMAZEPINA

A carbamazepina (CBZ) pertence a um grupo de fármacos denominados antiepilépticos, utilizado no tratamento de determinados tipos de crises convulsivas (epilepsia). Devido ao seu modo de acção, pode também ser utilizado no tratamento de outras doenças, tais como doenças neurológicas (neuralgia do trigémeo), assim como no tratamento de certas situações psiquiátricas (tais como uma situação caracterizada por episódios de mania nas perturbações de humor bipolares e um certo tipo de depressão).

A epilepsia é uma perturbação que se caracteriza por duas ou mais crises convulsivas (ataques). As crises convulsivas ocorrem quando as informações do cérebro para os músculos não se processam devidamente, através das vias nervosas do organismo. A CBZ ajuda a controlar o processamento dessas informações. Também regula as funções dos nervos nas outras doenças acima mencionadas. A CBZ está igualmente indicada na síndrome da abstinência alcoólica, na neuropatia diabética dolorosa e na diabetes insípida central (Adams *et al.*, 2009).

A CBZ foi descoberta em 1954 pelo químico *Walter Schindler*, na *J.R. Geigy* (farmacêutica multinacional agora conhecida por Novartis) em *Basel* na Suíça (Schindler e Hafliger, 1954). *Schindler* sintetizou este fármaco em 1960, antes das suas propriedades antiepilépticas terem sido descobertas. Em 1962, este fármaco começou por ser utilizado para tratar a neuralgia do trigémeo. Como anticonvulsionante tem sido usado no Reino Unido desde 1965 e encontra-se aprovado nos EUA desde 1974.

A carbamazepina tem sido comercializada sob vários nomes: Tegretol®, Biston®, Calepsin®, Carbatrol®, Epitol®, Equetro®, Finlepsin®, Sirtal®, Stazepine®, Telesmin®, Teril®, Timonil®, Trimonil®, Epimaz®, Carbama®/Carbamaze® (Nova Zelândia), Amizepin® (Polónia), Hermolepsin® (Suécia) e Degranol® (África do Sul) (Zhang *et al.*, 2008).

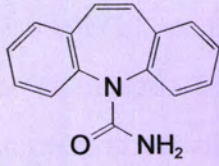
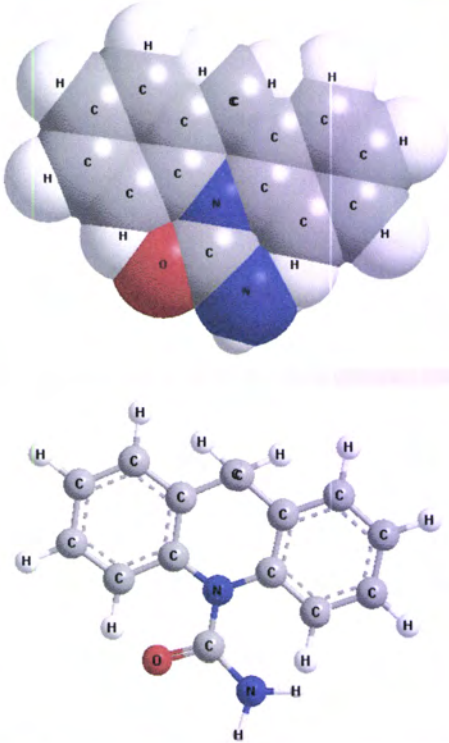
Este fármaco possui vários efeitos adversos que incluem: cefaleias, náuseas, alterações da percepção da visão, rigidez muscular, dores intestinais, redução da

eficácia da contracepção oral nas mulheres férteis e letargia. Adicionalmente, a CBZ pode exacerbar casos de hipotireoidismo já existentes (Adams *et al.*, 2009).

Do ponto de vista químico, a carbamazepina (5H-dibenzo[*b,f*]azepina-5-carboxamida) é um derivado tricíclico do iminostibeno (ver Tabela 1). A sua absorção é lenta e variável, porém, é absorvido quase na totalidade no tracto gastrointestinal. Aproximadamente 72% da administração oral deste fármaco é absorvida no tracto intestinal, enquanto 28% se mantém inalterado e subseqüentemente é excretado através das fezes. Após a sua absorção, é fortemente metabolizada no fígado, apenas 1% da dosagem deixa o corpo na forma inalterada. O tempo de meia-vida de eliminação da carbamazepina é dependente da dose, mas normalmente encontra-se entre 25-65h pós-administração. Já foram identificados trinta e três metabolitos deste fármaco na urina humana e de ratos (Reith *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2008).

Os metabolitos mais importantes são o 10,11-dihidro-10,11-epoxicarbamazepina (CBZ-epóxido) e o *trans*-10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina (CBZ-diol). Estes compostos são tão activos como o fármaco de onde derivam. O CBZ-diol corresponde a cerca de 30% da dosagem oral, em comparação com a porção total de carbamazepina inalterada (28% em fezes mais 1% na urina). Além do mais, o CBZ-diol é também um metabolito da oxocarbamazepina que é um derivado da carbamazepina, com um átomo de oxigénio extra no anel dibenzazepina. Assim sendo, torna-se expectável encontrar uma concentração elevada de CBZ-diol em cursos de água. Miao e Metcalfe (2003) e Miao *et al.* (2005) investigaram a ocorrência de metabolitos da carbamazepina em estações de tratamento de águas residuais e em águas superficiais. Estes observaram que a concentração de CBZ-diol é aproximadamente três vezes superior à concentração da carbamazepina (Miao *et al.*, 2005; Miao e Metcalfe, 2003).

Tabela 1 – Propriedades físicas, químicas e farmacológicas da carbamazepina (CBZ).

Carbamazepina (CBZ)	
Estrutura química	
Estrutura 3D	
Nome sistemático da IUPAC	5H-dibenzo[b,f]azepina-5-carboxamida
Fórmula química	$C_{15}H_{12}N_2O$
Massa molecular	$236.27 \text{ g mol}^{-1}$
Uso terapêutico	Antiepiléptico
Solubilidade na água	17.7 mg L^{-1} (25°C)
Log P (octanol - água)	2.45
Constante da Lei de Henry's	$1.09 \times 10^{-5} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$ (25°C)
pKa	Neutro
Tempo de meia-vida de eliminação	25 - 65h
Excreção	72% da dosagem oral é excretada na urina e 28% nas fezes
Metabólitos na urina	CBZ, CBZ-epóxido, CBZ-diol, CBZ-acridan, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ
Dosagem	800 - 1200 mg por dia

A via metabólica mais conhecida da CBZ é a da sua oxidação a CBZ-10,11-epóxido (CBZ-epóxido), seguida de hidratação a CBZ-10,11-trans-diol (CBZ-diol) e posterior conjugação do CBZ-diol a glucuronídeo (ver Figura 1). O metabolismo da CBZ para dar origem a CBZ-epóxido parece ser catalisado pelos enzimas CYP3A4 e CYP2C8. Outras vias são a da oxidação para dar 2-hidroxi-CBZ (CBZ-2-OH) e 3-hidroxi-CBZ (CBZ-3-OH), que parecem ser catalisadas por CYP1A2. A formação do CBZ-acridan (CBZ-acr) ocorre por uma via ainda desconhecida. A hidrólise da CBZ-epóxido, para dar origem ao CBZ-diol, é catalisada pela hidrolase epóxido microsossomal. Os metabolitos da CBZ, CBZ-diol e hidroxifenol, formam ambos glucuronídeos. Já foram identificados metabolitos N-glucuronídeo da CBZ e do CBZ-epóxido (Reith *et al.*, 2000).

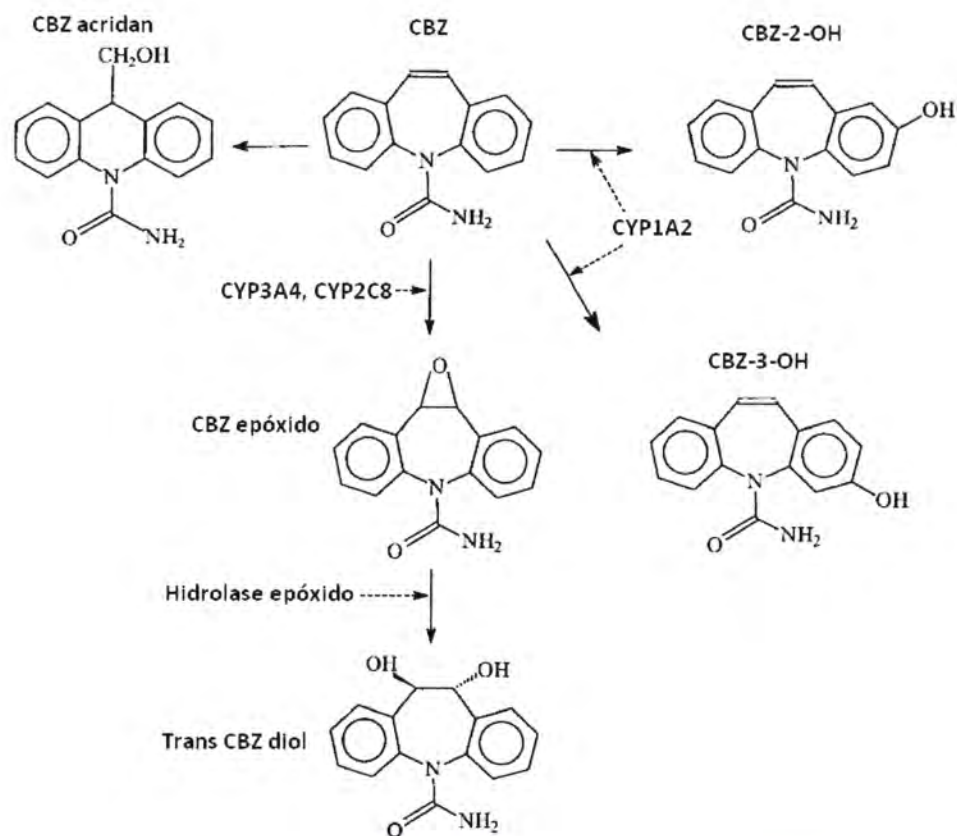


Figura 1 – Via metabólica conhecida da CBZ (adaptado de Reith *et al.*, 2000).

A quantidade de fármacos consumidos, numa região ou num país, permite estimar a sua ocorrência e a sua influência no ecossistema aquático. A carbamazepina

é um fármaco com um longo historial de uso clínico, sendo assim das drogas mais frequentemente encontradas no ambiente. A Tabela 2 apresenta o volume de consumo anual da CBZ em alguns países (Zhang *et al.*, 2008).

Tabela 2 - Volume anual de consumo de carbamazepina (CBZ) em alguns países e estimativa do seu volume global.

País	Consumo anual de CBZ (Toneladas)	População 10 ⁶	DPC (mg)	Referências
Austrália	10	19	526	(Khan e Ongerth, 2004)
Áustria	6 em 1997	8	750	(Strenn <i>et al.</i> , 2004)
Canadá	28 em 2001	31	903	(Miao <i>et al.</i> , 2005)
Finlândia	4.6 em 2005	5	920	(Vieno <i>et al.</i> , 2007)
França	40	59	678	(Ferrari <i>et al.</i> , 2003)
Alemanha	87 em 1999	82	1061	(BLAC, 2003)
Inglaterra	40 em 2000	49	816	(Jones <i>et al.</i> , 2002)
EUA	43 em 2000, 35 em 2003	284	151	(Thacker, 2005)

DPC – dose *per capita*; População de Inglaterra – UK; Estatísticas Nacionais (2001); População EU – Europa (2006); outras populações – UN (2005)

Até à data, foram realizados vários estudos para determinar a eficiência de remoção da CBZ e dos seus metabolitos, nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR's). Os resultados destes estudos demonstraram que a carbamazepina é persistente e a sua percentagem de remoção encontra-se muitas vezes abaixo dos 10% (Zhang *et al.*, 2008). A taxa de remoção baixa da CBZ pode ser explicada pelas suas propriedades. Primeiro, é resistente à biodegradação em concentrações baixas. Segundo, muito dificilmente se liga fortemente à lama espessa e gordurosa. O coeficiente de distribuição entre a água e a lama secundária (K_d) é de $1.2 \text{ L Kg}_{ss}^{-1}$ (Ternes *et al.*, 2004), valor este que se encontra longe do valor de $500 \text{ L Kg}_{ss}^{-1}$ requerido para haver uma adsorção significativa na lama. Assim, a CBZ encontra-se associada à fase aquosa (Zhang *et al.*, 2008).

Recentemente foram desenvolvidos estudos de remoção da CBZ utilizando sistemas de tratamento com leitos construídos de macrófitas, tendo-se obtido resultados bastante satisfatórios (Dordio *et al.*, 2009).

A concentração de CBZ encontrada em efluentes tratados é da ordem de grandeza dos ng L^{-1} (Strenn *et al.*, 2004). Por exemplo, num estudo exaustivo em que foi avaliada a presença de 106 contaminantes orgânicos persistentes em águas residuais, que sofreram um tratamento convencional, os resultados mostraram a presença de 17 dos contaminantes seleccionados, de entre os quais, a carbamazepina ($0.258 \mu\text{g L}^{-1}$) (Barceló e Petrovic, 2008). A CBZ tem sido encontrada em efluentes de estações de tratamento de águas residuais de várias partes do mundo: Europa, EUA, Canadá, Japão e Coreia do sul. Prevê-se que esta lista continue a crescer no futuro (Zhang *et al.*, 2008).

Em águas superficiais, as concentrações de CBZ encontradas são relativamente baixas e também divergem de país para país. A concentração de CBZ mais elevada em águas superficiais foi encontrada em Berlim: 1075 ng L^{-1} (Heberer *et al.*, 2002). Também já foi detectada em água do mar, no entanto a uma concentração muito baixa, 2 ng L^{-1} (Weigel *et al.*, 2001).

O impacto deste fármaco nos ecossistemas em que está presente já foi alvo de vários estudos (Andreozzi *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2003). Ferrari *et al.* estudou os efeitos tóxicos da CBZ em bactérias, algas, micro-crustáceos e peixes. Estes investigadores chegaram à conclusão que este fármaco possuía uma toxicidade aguda para os organismos teste.

A literatura apresenta poucas referências sobre o comportamento e determinação electroquímica da carbamazepina. Em especial, o que diz respeito ao seu comportamento anódico.

Turk *et al.*, em 1985, publicaram um trabalho em que foi desenvolvido um eléctrodo à base de polycarbazol e politiofeno preparado sobre um suporte de carbono vítreo reticulado. Este eléctrodo foi utilizado para o estudo electroquímico de algumas drogas tricíclicas. Foram observadas respostas electroquímicas para amitriptilina, nortriptina e protriptilina, anteriormente descritas como electroquimicamente inactivas. Observou-se a mesma resposta electroquímica para a carbamazepina, tanto

para um eléctrodo de carbono vítreo convencional, quanto para o eléctrodo modificado. Foram apresentadas as vantagens do eléctrodo modificado com um polímero em relação ao eléctrodo de carbono convencional (Turk *et al.*, 1985).

Duennbier e Jugelt, em 1991, publicaram um trabalho sobre o comportamento electroquímico da carbamazepina e sua hidrogenação sobre eléctrodos de amálgama de amónio (Dunnbier e Jugelt, 1991). Os autores sugerem que a conversão electroquímica a 10,11-dihidrocarbamazepina deve-se à hidrogenação indirecta da dupla ligação C-C, provocada pela amálgama e que esta reacção pode ser usada na determinação da carbamazepina.

Moses et al., em 1993 apresentaram um trabalho sobre a investigação electroquímica da carbamazepina por voltametria cíclica, voltametria de impulso diferencial e coulometria. Segundo os autores, a CBZ passa por um processo de redução quasi-reversível envolvendo dois electrões do anel heterocíclico (Moses *et al.*, 1995).

Mais recentemente, *Campanella et al.*, em 2006, determinaram a CBZ usando várias técnicas voltamétricas e polarográficas: voltametria de impulso diferencial (DPV), polarografia de impulso diferencial (DPP) e voltametria cíclica (CV), em que usaram o eléctrodo de mercúrio gotejante (DME) como eléctrodo de trabalho (Campanella *et al.*, 2006).

1. 2. ALGUNS FUNDAMENTOS DE ELECTROQUÍMICA NA INTERFACE ELÉCTRODO/SOLUÇÃO

A electroquímica na interface eléctrodo/solução está associada aos fenómenos químicos que envolvem a separação de carga eléctrica (Brett e Oliveira-Brett, 1993). Numa célula electroquímica, com dois eléctrodos diferentes imersos numa solução, esta separação pode conduzir à transferência de carga electrónica, na superfície de cada um dos eléctrodos. Designadas de reacções de transferência de carga heterogéneas, porque a transferência de electrões ocorre entre fases diferentes, estas



reações dão-se em cada um dos eléctrodos em direcções opostas, de modo a assegurar a electroneutralidade da solução.

A transferência de electrões (e^-) entre espécies de um dado par redox O/R na superfície de um eléctrodo, em que O e R representam respectivamente a forma oxidada e reduzida do par, no caso mais simples é representada por $O + ne^- \leftrightarrow R$. Entretanto, o sentido em que se dá favoravelmente a transferência electrónica, depende da energia livre relativa do par O/R no sistema electroquímico em consideração.

Nos métodos electroquímicos interfaciais dinâmicos a potencial controlado, a energia livre do par O/R e o sentido em que ocorre a reacção redox podem estar relacionadas com o potencial eléctrico (energia relativa dos electrões) do eléctrodo. Neste, aceita-se que os electrões possuem um máximo de energia, distribuído em torno de um nível médio, o nível de *Fermi* (E_F). Quando o potencial do eléctrodo varia, o valor de E_F também varia, sendo que a energia dos electrões será tanto maior (menor) quanto mais negativo (positivo) for o potencial do eléctrodo. Assim, se o potencial de um eléctrodo for suficientemente negativo, em relação ao potencial ($-\Delta G/nF$) do par O/R, os electrões transferir-se-ão do eléctrodo (onde possuem maior energia) para a espécie O (onde existem orbitais desocupadas de menor energia) - *reacção de redução*; Correspondentemente, num eléctrodo com um potencial suficientemente positivo, em relação ao potencial do par O/R, ter-se-á a *reacção de oxidação*, com os electrões a serem transferidos da espécie R (onde existem orbitais ocupadas de maior energia) para o eléctrodo (onde a energia electrónica é menor) (Bard, 2001).

Nos casos actualmente mais comuns, a célula electroquímica é constituída por três eléctrodos: o eléctrodo de trabalho, onde ocorre a reacção electroquímica em estudo e cujo potencial é controlado, com a ajuda de um potencióstato, relativamente a um eléctrodo de referência; um terceiro eléctrodo, designado de eléctrodo auxiliar ou de contra-eléctrodo, completa o circuito eléctrico, com o eléctrodo de trabalho e a solução electrolítica, por onde flui a corrente eléctrica resultante. O eléctrodo de referência utilizado deve possuir uma impedância suficientemente elevada, para que por ele não passe corrente e o seu potencial se mantenha constante. Em sistemas de

dois eléctrodos, o eléctrodo de referência e o contra-eléctrodo são o mesmo. Em qualquer dos casos, a condução eléctrica entre os eléctrodos é estabelecida, no interior da célula electroquímica, através do transporte de iões do electrólito de suporte e no exterior, através do transporte de electrões nos fios condutores.

Numa reacção electroquímica, ao ser aplicado um potencial bem definido ao eléctrodo de trabalho, as espécies electricamente carregadas vão ser atraídas electrostaticamente para a superfície do eléctrodo. Outras espécies presentes em solução podem também interagir com a superfície do eléctrodo de trabalho, através da adsorção ou de outro fenómeno. Pelo que para descrever um processo de eléctrodo é necessário considerar, não só o transporte de espécies para a superfície do eléctrodo, mas também vários processos superficiais que podem acompanhar a própria reacção de eléctrodo.

O movimento das espécies químicas numa célula electroquímica, designado por transporte de massa, pode ser devido a efeitos de difusão, devido a um gradiente de concentração, de convecção (com origem no movimento mecânico do fluido e/ou no movimento térmico de espécies neutras e carregadas em solução), e de migração (movimento devido à interacção com campo eléctrico de partículas carregadas). A utilização de um electrólito de suporte em grande quantidade (aprox. cem vezes superior à quantidade da espécie em estudo) permite negligenciar os efeitos da migração. O efeito da convecção, nas técnicas não hidrodinâmicas, é minimizado evitando qualquer movimento relativo entre o eléctrodo e a solução, ou gradiente térmico.

A região interfacial situada entre o eléctrodo e a solução, onde ocorrem as reacções de eléctrodo, designa-se por dupla camada eléctrica. Esta região é a que apresenta a maior diferença de potencial no circuito eléctrico. A designação de “dupla camada” reflecte os primeiros modelos desenvolvidos para descrever esta região. O conceito básico consistia num ordenamento de cargas positivas ou negativas na superfície do eléctrodo e num ordenamento em quantidade igual e de carga oposta na solução, para neutralizar a carga do eléctrodo. A constante de proporcionalidade entre o potencial aplicado ao eléctrodo e a carga eléctrica, devida às espécies ordenadas na região interfacial, é a capacidade de dupla camada.

Os efeitos da dupla camada eléctrica, na cinética das reacções de eléctrodo, podem ser minimizados através do uso de uma quantidade razoável de electrólito de suporte inerte (*ca.* 0.01 a 1 M) sendo as concentrações das espécies electroactivas muito mais baixas (< 5 mM) (Bard e Faulkner, 2001; Wang, 2006).

Actualmente, nas determinações electroquímicas, é aceite que quando o eléctrodo de trabalho funciona como receptor de electrões, durante uma reacção de oxidação, a corrente eléctrica, denominada de corrente anódica, i_a , tem um valor positivo. No caso da reacção de redução, em que o eléctrodo de trabalho actua como dador de electrões, aceita-se que a corrente, denominada de corrente catódica, i_c , tem um valor negativo. Em algumas referências, a convenção de sinais das duas correntes é oposta (Bard e Faulkner, 2001; Zosky, 2007).

1. 3. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

Entre os métodos electroquímicos conhecidos, a voltametria é um dos métodos mais versáteis e importantes. Genericamente, uma voltametria consiste na medição da corrente que flui através de um eléctrodo de trabalho, cujo potencial varia de um modo bem definido no tempo. A aplicação deste potencial ao eléctrodo de trabalho origina duas fracções de corrente: uma directamente relacionada com a transferência de carga, corrente faradaica, i_f , e outra necessária para organizar as moléculas e iões presentes na dupla camada eléctrica, a corrente capacitiva i_c . A corrente total registada é: $i_T = i_f + i_c$.

No decorrer de uma determinação voltamétrica, como o potencial aplicado varia no tempo, a corrente é medida em função do tempo. O registo temporal da corrente em função de potencial $i = f(E)$ denomina-se de voltamograma.

Neste trabalho utilizaram-se quatro técnicas voltamétricas. Duas técnicas que se baseiam no varrimento linear (escada) de potencial, nomeadamente a voltametria cíclica (CV) e a voltametria de varrimento linear (LSV), e duas técnicas que se baseiam em impulsos de potencial, tais como a voltametria de onda quadrada (SWV) e a voltametria de impulso diferencial (DPV). A seguir, são descritas sucintamente.

1. 3. 1. VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica é uma técnica muito utilizada, para obter informação electroquímica acerca de um dado sistema químico. Entre esta informação inclui-se, a identificação e caracterização de espécies electroactivas, estudo e diagnóstico de mecanismos de reacções electroquímicas e químicas, análise semi-quantitativa da cinética das reacções, entre outras. Na verdade, quando se recorre ao estudo electroanalítico de um novo sistema, é muita das vezes a primeira técnica a ser aplicada, dada a quantidade de informação que permite obter, num tempo relativamente curto.

Na voltametria cíclica, o potencial do eléctrodo de trabalho varia entre dois valores e nos dois sentidos, a uma velocidade constante ($v = dE/dt$). O potencial varia linearmente ou em pequenos degraus, desde um valor inicial (E_i) até um valor onde o sentido do varrimento é invertido, o potencial de inversão (E_{inv}). A voltametria termina a um valor, E_f , que pode ser idêntico ou não ao valor de E_i .

Durante esta variação de potencial ocorrem ou não, na superfície do eléctrodo de trabalho, reacções de oxidação/redução das espécies electroactivas (reacções faradáicas), adsorção de espécies e outros fenómenos de superfície, enquanto passa uma corrente capacitiva, associada à carga da dupla camada eléctrica.

No estudo de reacções redox, os dados experimentais mais importantes a ter em conta na CV são os potenciais de pico anódico e catódico (E_{pa} , E_{pc}) e a intensidade de corrente dos respectivos picos (i_a , i_c). A condição mais importante é a velocidade de varrimento (v).

O efeito da variação da velocidade de varrimento, no perfil do voltamograma, é comumente estudado para se obter parâmetros cinéticos e de reversibilidade do sistema electroquímico, determinar o(s) processo(s) de superfície ou não, que controla(m) a transferência electrónica e identificar e estudar reacções químicas homogéneas acopladas.

Considere-se uma solução com uma espécie electroactiva R, susceptível de ser oxidada reversivelmente num dado eléctrodo, de acordo com o esquema $R \leftrightarrow O + n\bar{e}$. Iniciando o varrimento de potencial, a um valor em que não há reacções faradáicas, a

corrente medida será mínima (Figura 2). Quando o potencial do eléctrodo de trabalho começar a variar no sentido de potenciais mais positivos, criam-se condições para que este se aproxime e ultrapasse o valor do potencial formal, E_f° , do par O/R. Num primeiro instante, a reacção de oxidação começar-se-á a dar a uma taxa reduzida, aumentando progressivamente à medida que o potencial aumenta. Neste período, cria-se um gradiente de concentração das espécies R, entre a superfície do eléctrodo e a região adjacente da solução (a camada de difusão), que obriga R a difundir para junto do eléctrodo. A difusão de mais espécies R para junto do eléctrodo e a cinética de transferência electrónica favorável (do sistema reversível considerado) determinam o aumento da corrente anódica, até esta atingir um máximo. A partir deste instante e devido ao consumo continuado de espécies electroactivas R na camada de difusão, esta aumenta de espessura, diminuindo o gradiente de concentração e o fluxo destas espécies. Em consequência, a intensidade de corrente diminui, seguindo um perfil proporcional à raiz quadrada do tempo, $t^{1/2}$, semelhante ao que ocorre após a aplicação de um impulso de potencial, em cronoamperometria. Depois de ultrapassar esta região de potencial, o sentido do varrimento é invertido a um dado valor de potencial, E_{inv} . No início desta inversão de potencial, a oxidação continua a progredir a uma taxa muito reduzida, mas à medida que o potencial do eléctrodo de trabalho assume valores menos positivos e próximos do valor de E_f° , as espécies O formadas até então começam a ser reduzidas. De um modo análogo ao que acontece no varrimento anódico, neste varrimento de potencial no sentido de valores menos positivos (ou mais negativos, como se queira), resulta um pico de corrente, designado de catódico, que está associado a redução das espécies O.

Com o aumento da velocidade de varrimento do potencial, o tempo para atingir o equilíbrio na superfície do eléctrodo é menor, pelo que as reacções que aparecem como reversíveis (i.e., controladas pela difusão e/ou adsorção, com cinética de transferência electrónica elevada) para velocidades de varrimento menores, podem ser quasi-reversíveis para velocidades de varrimento elevadas. Este é um procedimento comum, utilizado para caracterizar a reversibilidade de sistemas electroquímicos.

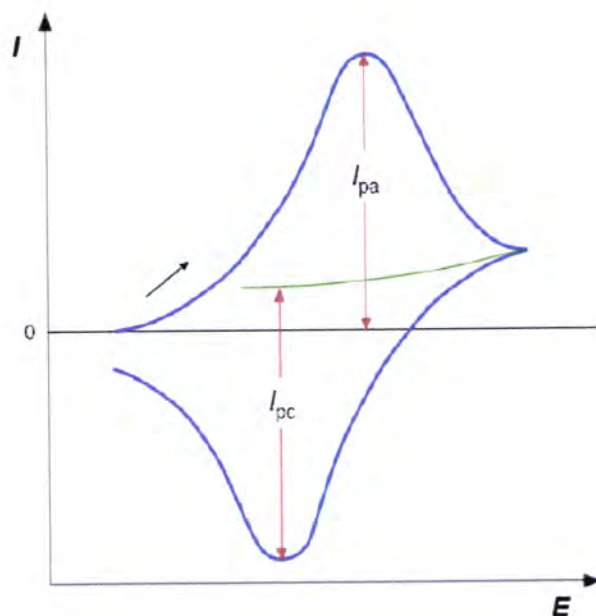


Figura 2 - Voltamograma típico para um processo reversível $R \leftrightarrow O + n\bar{e}$.

No caso de uma reacção irreversível do tipo $R \rightarrow O + n\bar{e}$, a voltametria cíclica conduz ao perfil voltamétrico descrito na Figura 3, no qual não aparece nenhum pico inverso, ao inverter o sentido do varrimento, obtendo-se apenas a continuação do decaimento da corrente (----) (Brett e Oliveira-Brett, 1993; Wang, 2006).

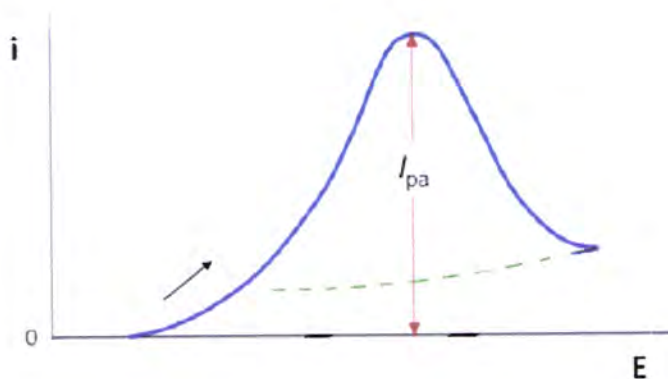


Figura 3 - Voltamograma cíclico para um sistema irreversível $R \rightarrow O + n\bar{e}$.

1. 3. 2. VOLTAMETRIA DE VARRIMENTO LINEAR

A voltametria simples de varrimento linear (LSV) é uma técnica simplificada da voltametria cíclica. Nestas técnicas o potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho varia linearmente com o tempo. Na voltametria cíclica a variação de potencial é efectuada nos dois sentidos, enquanto na voltametria de varrimento linear aplica-se unicamente num dos sentidos (Wang, 2006).

Os parâmetros experimentais a ter em conta nesta técnica são o potencial inicial, E_i , o potencial final, E_f , e a velocidade de varrimento, v . O potencial aplicado em cada instante é função da velocidade de varrimento e do tempo (t) como é apresentado na seguinte expressão: $E(t) = E_i \pm vt$ (sinal + quando o varrimento é realizado no sentido de potenciais mais positivos e sinal - quando o varrimento é realizado no sentido de potenciais mais negativos).

1. 3. 3. TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS POR IMPULSOS

As técnicas voltamétricas por impulsos baseiam-se na medida da corrente ao longo do tempo, após a aplicação de impulsos (ou pulsos) de potencial. A corrente não é medida de forma contínua, mas em intervalos de tempo predefinidos. Estas técnicas foram desenvolvidas inicialmente para eléctrodos de gota de mercúrio, já que sincronizando o crescimento da gota com os impulsos iria reduzir-se a contribuição da corrente capacitiva, por amostragem da corrente no fim de vida da gota. Após a aplicação do impulso de potencial, a corrente capacitiva extingue-se mais rapidamente do que a faradáica. Este tipo de amostragem tem a vantagem de aumentar a sensibilidade da técnica. Em eléctrodos sólidos, há uma vantagem adicional de discriminação contra o bloqueamento da reacção de eléctrodo por adsorção (Brett e Oliveira-Brett, 1993; Wang, 2006). Entre as diferentes técnicas de voltametria de impulso, a principal diferença reside na forma como os impulsos são aplicados e no modo como se faz a amostragem da corrente.

1.3.3.1. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

A voltametria de onda quadrada (SWV), desenvolvida por Barker, no início dos anos 50, e aperfeiçoada mais tarde por Ramalay e Krause (1969) e Osteryoung *et al.* (1977) caracteriza-se pela aplicação de um perfil de potencial com impulsos periódicos alternados em torno de um valor médio, que varia temporalmente (Souza *et al.*, 2003). Mais concretamente, o perfil de potencial da voltametria de onda quadrada (SWV) combina uma escada de potencial, com degraus de amplitude pequena ΔE_s (unidade a dezena de mV) e duração t_s , com uma onda quadrada de amplitude elevada ΔE_p (dezena a centena de mV) e período τ (centena a décimas de ms) ou frequência $f = 1/\tau$ (10 a 2000 Hz), de tal modo que $t_s = \tau$ (Figura 4) (Wang, 2006). Em alguns instrumentos menos recentes, utiliza-se uma rampa de potencial, em vez de uma escada.

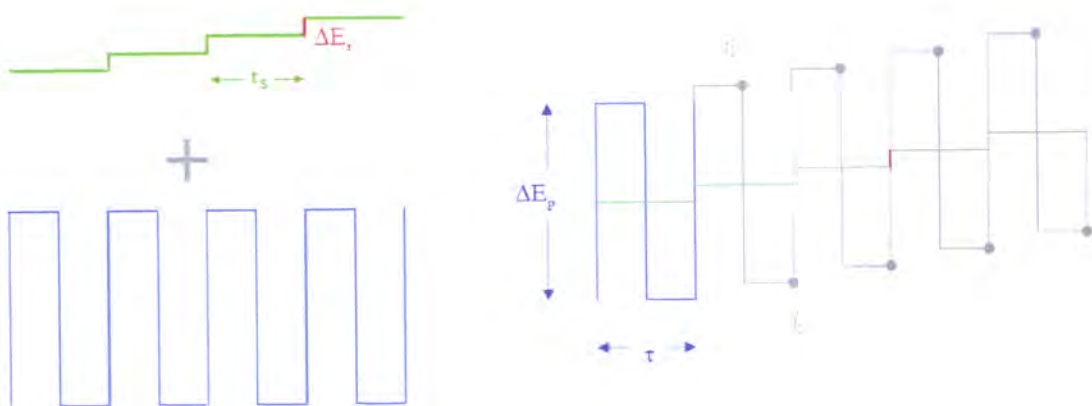


Figura 4 - Esquema de aplicação de potenciais em voltametria de onda quadrada.

No decurso deste programa de potencial, a amostragem da corrente é efectuada imediatamente antes do final dos impulsos, directo e inverso. Ou seja, mede-se a intensidade de corrente no ponto 1, i_1 , e no ponto 2, i_2 , respectivamente (Figura 4). A intensidade de corrente total medida, Δi , corresponde à diferença entre a intensidade de corrente medida no final do impulso directo, i_d , e a intensidade de corrente medida no final do impulso inverso, i_i (Hefnawey *et al.*, 2004). Para um sistema redox que apresenta alguma reversibilidade electroquímica, em que a redução e oxidação ocorrem com relativa facilidade numa dada região de potencial, i_i e i_d aumentam mas com sinais contrários. Em consequência, forma-se um pico no

voltamograma, em que $(\Delta i)_p = i_d - i_i$ é maior que qualquer uma das componentes (Figura 5). No caso de um sistema totalmente irreversível, uma das componentes é nula, e por isso Δi no pico do voltamograma é igual à componente de corrente não nula. Dependendo do sistema em análise, podem encontrar-se as mais variadas respostas. Em qualquer dos casos, a observação dos picos de corrente total, directa e inversa, as suas posições relativas no eixo de potencial e análise dos respectivos valores de Δi , i_d e i_i , ajudam a perceber a natureza da reacção electroquímica. Em electroanálise espera-se a obtenção de um pico, cuja altura $(\Delta i)_p$ seja proporcional à concentração da analito electroactivo, no seio da solução.

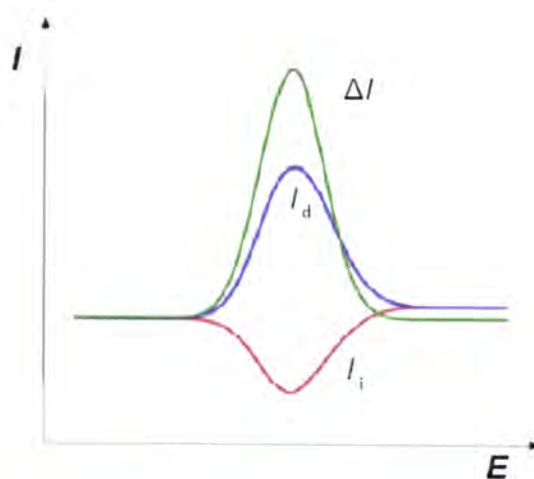


Figura 5 - Representação esquemática das intensidades de corrente directa (i_d) e inversa (i_i) e o diferencial resultante (Δi).

Devido à forma rápida e diferencial com que a intensidade de corrente é medida, a SWV apresenta uma série de vantagens em relação a outras técnicas voltamétricas. Estas vantagens estão relacionadas com o facto de se conseguir, na medição da intensidade de corrente, discriminar eficazmente a corrente de fundo (um somatório da corrente capacitiva e residual, também denominado ruído electroquímico) da corrente faradáica (o sinal de interesse, devido ao analito electroactivo). No processo subtractivo das correntes directa e inversa, salvo raras excepções, só a corrente de fundo é eliminada. Neste caso, podem realizar-se medições voltamétricas com uma velocidade muito maior, sem que a corrente de fundo afecte a medição da corrente faradáica, como acontece nas voltametrias de

varrimento linear ou cíclica. Devido à rapidez das medições e cinética de transferência electrónica reduzida de interferentes importantes, como o oxigénio dissolvido é a potenciais catódicos, é possível com a SWV realizar medições em sistemas, de onde este não pode ser removido (por exemplo, sistemas aeróbicos como os biológicos).

Por outro lado, mesmo que a concentração de espécies electroactivas seja muito baixa e as intensidades de corrente directa e inversa sejam diminutas, a subtração de valores com sinal contrário, pode traduzir-se num sinal mensurável. Por outras palavras, a SWV alia uma sensibilidade muito elevada a uma gama de concentrações que se estende a valores vestigiários (μM a nM).

Casos excepcionais, que inibem o uso da SWV, prendem-se com o facto dos picos de corrente directa e inversa serem aproximadamente iguais, em módulo e sentido de variação da corrente (por exemplo, no caso de um par redox totalmente irreversível, em que uma das formas químicas mantém a troca de electrões com o eléctrodo, mesmo quando o potencial varia com alguma amplitude, ΔE_p). Neste caso não se observa qualquer pico no voltamograma de corrente total, o que torna inválido o uso da SWV para fins analíticos de quantificação química.

Em qualquer dos casos, a versatilidade e rapidez da SWV fazem com que seja hoje em dia, uma técnica muito utilizada quer em estudos analíticos quer em mecanísticos (Souza *et al.*, 2004).

1. 3. 3. 2. VOLTAMETRIA DE IMPULSO DIFERENCIAL

A voltametria de impulso diferencial, DPV, tal como a SWV, é uma técnica muito útil na medição de concentrações vestigiais de espécies orgânicas e inorgânicas. Nesta técnica os impulsos de potencial de amplitude fixa (10-100 mV), ΔE , são sobrepostos a uma rampa (ou a uma escada) de potencial, que varia de forma linear (ou regular) com o tempo (Figura 6). A corrente é medida imediatamente antes, ponto 1, da aplicação e no final do impulso, ponto 2 (Figura 6(a)). O potenciostato mede a diferença de intensidade de corrente, $\Delta i = i_2 - i_1$, em cada impulso, como função do potencial aplicado. Sendo a DPV uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à

primeira derivada de um voltamograma de impulso normal, isto é um pico, em que a altura deve ser directamente proporcional à concentração do analito em estudo (Wang, 2006).

O perfil apresentado no esquema (b) da figura 6, é actualmente mais usado que o perfil correspondente ao esquema (a) da mesma figura. Com a instrumentação digital moderna e com a utilização mais frequente de eléctrodos de trabalho diferentes do DME, pode utilizar-se um valor de tempo mais pequeno que 0.5 s, conforme é apresentado no esquema (a) da Figura 6.

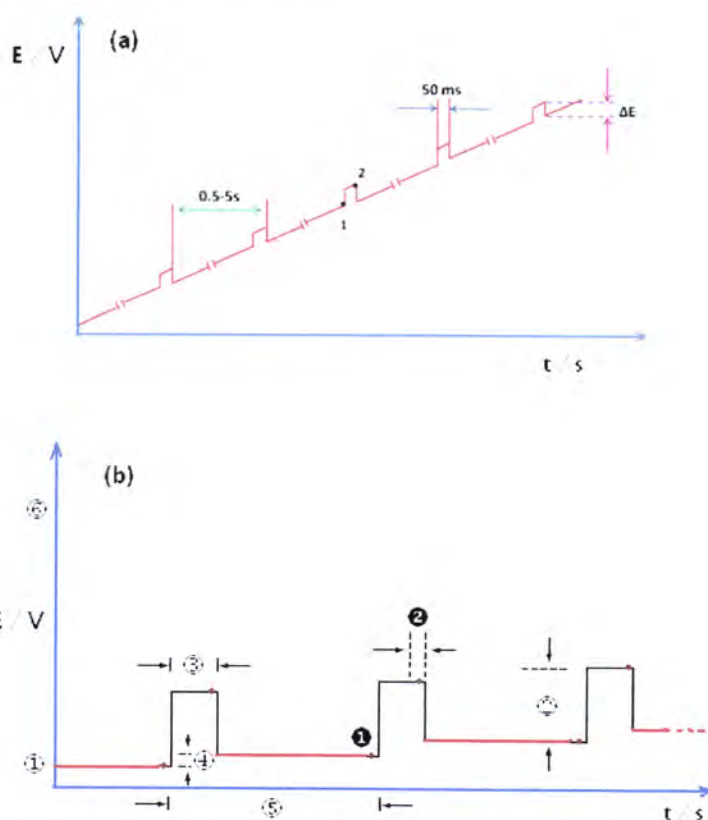


Figura 6 - Perfil de aplicação de potenciais em voltametria de impulso diferencial: impulsos sobre (a) rampa (Wang, 2006) e (b) escada. Utilizando o gráfico (b) como referência: ① potencial inicial, E_i ; ② amplitude do(s) impulso(s), ΔE_p ; ③ duração do(s) impulso(s) (equivalente ao período de modulação, t_p); ④ incremento de potencial entre dois impulsos consecutivos (equivalente ao valor do degrau de potencial, ΔE_s); ⑤ intervalo de tempo entre a aplicação de dois impulsos consecutivos (equivalente à duração do degrau de potencial, t_s); ⑥ potencial final, E_f ; ① e ②, instantes em que se faz a amostragem de corrente, i_1 e i_2 , respectivamente.

1. 4. ELÉCTRODOS DE TRABALHO

A implementação e eficácia dos métodos electroanalíticos, tais como as voltametrias, dependem em grande parte de aspectos materiais do eléctrodo de trabalho. Entre estes aspectos incluem-se as propriedades químicas e físicas (*e.g.*, a condutividade) do próprio material de eléctrodo, a sua susceptibilidade para ser oxidado, a sua capacidade para catalisar reacções redox e para adsorver espécies da solução, bem como a dimensão, morfologia e configuração da sua superfície activa. A facilidade com que a superfície do material de eléctrodo pode ser modificada, de modo a aumentar a performance do eléctrodo, é outro aspecto importante a ter em consideração.

O eléctrodo de trabalho pode actuar como fonte na transferência de electrões para a espécie electroactiva localizada na região interfacial, ou como sorvedouro na transferência de electrões desta espécie para o próprio eléctrodo. Em qualquer dos casos, tanto a geometria como a composição do material do eléctrodo de trabalho devem ser consideradas uma vez que ambas influenciam a transferência electrónica e a correspondente informação que se obtém a partir do método voltamétrico.

Genericamente, os principais pré-requisitos que devem ser cumpridos por um bom material de eléctrodo de trabalho são: condutividade eléctrica elevada (Uslu e Ozkan, 2007), estabilidade química nas condições usadas, corrente de fundo muito pequena e constante, num intervalo de potencial o mais extenso possível, cinética de transferência electrónica rápida, para uma gama vasta de sistemas redox, e produção/construção fáceis, custo reduzido e seguro para o ambiente, tanto quanto possível.

Uma grande variedade de materiais pode ser usada como eléctrodo de trabalho, em electroanálise (Wang, 2006). Os mais populares e clássicos envolvem o mercúrio (na forma de gota ou filme), metais nobres, particularmente platina e ouro, e uma grande variedade de formas de carbono. Mais recentemente, encontram-se outros metais como o bismuto, e uma série vasta de novos eléctrodos – os eléctrodos quimicamente modificados.

1. 4. 1. ELÉCTRODO DE MERCÚRIO DE GOTA SUSPensa

O mercúrio, como se sabe há muito, é a opção mais conveniente para material de eléctrodo, quando se pretende trabalhar num intervalo de potencial catódico alargado. Dependendo do pH do meio e do electrólito de suporte usado, o limite catódico pode ir até -2.0 V, dado que a redução do ião hidrogénio ou da água na superfície do mercúrio, não são processos cineticamente favoráveis. No entanto, o limite anódico em que pode ser usado é mais pequeno, devido à susceptibilidade do próprio mercúrio sofrer oxidação. Este problema é ultrapassado utilizando eléctrodos sólidos de platina, ouro ou baseados em carbono, em que o intervalo anódico pode ser alargado até +2.0 V.

Existem vários tipos de eléctrodos de mercúrio, de entre os quais se destacam actualmente: o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE) e o eléctrodo de filme de mercúrio (MFE). O eléctrodo de mercúrio gotejante (DME), que já foi o eléctrodo mais usado, caiu entretanto em desuso.

Neste trabalho foi usado o HMDE para estudar a redução da carbamazepina, num intervalo de potencial catódico. Este eléctrodo apresenta a vantagem de poder ser utilizado repetidamente, dado que a superfície do eléctrodo é rapidamente regenerada, através da formação de uma nova gota. A formação e controlo do HMDE são realizados por intermédio de um sistema electromecânico comercial apropriado, o que assegura a reprodutibilidade e estabilidade do eléctrodo (Wang, 2006).

1. 4. 2. ELÉCTRODO DE CARBONO VÍTREO

O carbono é o material de eléctrodo indicado, particularmente quando é necessário lidar com densidades de correntes elevadas e com uma gama de potencial de trabalho alargada, sem comprometer a estabilidade física e química do material ao longo do tempo. Os eléctrodos de carbono podem ser classificados em dois grupos, os homogéneos (carbono vítreo, grafite, tinta em ecrã impresso, fulerenos, nanotubos de carbono e diamante) e o grupo dos heterogéneos (pasta de carbono não modificada e modificada) (Uslu e Ozkan, 2007).

O carbono vítreo é muito usado como material de eléctrodo, devido às suas excelentes propriedades eléctricas e mecânicas, janela de potencial alargada, natureza quimicamente inerte e impermeabilidade a gases. Exibe uma porosidade extremamente baixa, condutividade eléctrica elevada, e contém quantidades vestigiárias de gases e outras impurezas. É facilmente montado, polido e compatível com todos os solventes mais comuns. Também demonstra um desempenho relativamente reproduzível. Normalmente, um pequeno disco de carbono vítreo é usado na forma encapsulada, em *Teflon* ou *Kel-F*.

Quase todos os eléctrodos de carbono vítreo são usualmente polidos, com pequenas partículas de alumina ($\pm 0.05 \mu\text{m}$) numa superfície de polimento suave. O desempenho do eléctrodo de carbono vítreo depende do material de polimento e do procedimento adoptado. Este inclui em regra, polimentos sucessivos da superfície do carbono vítreo, até apresentar um aspecto espelhado. Um polimento inadequado pode traduzir-se em respostas erráticas do eléctrodo, durante as medições. O polimento tem como pressuposto a activação da superfície do carbono vítreo, referindo-se esta activação a um aumento da reactividade relativa da transferência de electrões da própria superfície. A activação térmica é outra maneira de aumentar a velocidade de transferência de electrões. Foi demonstrado que aquecendo o carbono vítreo, através de vários métodos, aumenta a velocidade de transferência de electrões e a adsorção. Tratamentos térmicos no vácuo produzem superfícies de carbono vítreo com um desempenho excelente, mas este procedimento é impraticável para um uso rápido e repetido. O pré-tratamento electroquímico constitui outra alternativa importante, na activação da superfície do carbono vítreo. Geralmente, consiste na polarização alternada e contínua do carbono vítreo, entre um limite suficientemente anódico e um limite catódico (Wang, 2006; Kissinger e Heineman, 1996). Usando esta técnica de pré-tratamento, a selectividade e sensibilidade do eléctrodo pode ser melhorada consideravelmente. Mais ainda, a relação entre o pré-tratamento electroquímico, que induz modificações na superfície, e a reactividade electroquímica pode ser compreendida. Os eléctrodos de carbono vítreo são os eléctrodos de carbono mais utilizados no uso corrente. Estes possuem aplicações em várias áreas,

nomeadamente na determinação de fármacos em amostras de dosagem farmacêutica ou em amostras biológicas (Uslu e Ozkan, 2007).

1. 4. 3. ELÉCTRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

A denominação de eléctrodo quimicamente modificado (*chemically modified electrode*, CME) foi introduzida na química electroanalítica por Murray e colaboradores em 1975, para designar eléctrodos com espécies quimicamente activas imobilizadas na superfície desses dispositivos. O objectivo desta modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eléctrodo/solução, alterando a reactividade e selectividade do eléctrodo base, permitindo o desenvolvimento de eléctrodos com vista a diversas aplicações (Durst *et al.*, 1997; Kutner *et al.*, 1998).

Num eléctrodo modificado, a superfície do eléctrodo pode ser convenientemente alterada por adsorção irreversível directa, por ligação covalente a grupos funcionais específicos da superfície do eléctrodo, por recobrimento com filmes poliméricos, ou ainda na preparação de eléctrodos à base de materiais de carbono, em que se utiliza um modificador pouco solúvel em água, que é adsorvido neste tipo de substrato (Labuda, 1992). Os compostos modificadores são seleccionados de acordo com o analito que se pretende determinar, bloqueando o acesso directo e/ou inibindo determinados processos de eléctrodo, ao mesmo tempo que promovem outros, permitindo deste modo uma maior selectividade nas análises.

Como eléctrodos de trabalho, os eléctrodos quimicamente modificados devem preencher entre outros, os seguintes requisitos: boa estabilidade mecânica e química, correntes de fundo o mais pequenas possíveis e facilidade na sua preparação, com uniformidade de um eléctrodo para o outro (Baldwin e Thomsen, 1991).

Neste trabalho, um eléctrodo de carbono vítreo foi quimicamente modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (*multi-walled carbon nanotubes*, MWCNTs), com o objectivo de melhorar a resposta electroquímica do fármaco CBZ.

1. 4. 3. 1. NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS

Nestas últimas décadas, a investigação na área das nanopartículas tem vindo a suscitar um enorme interesse. As propriedades únicas dos nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*, CNTs) conduziram às mais variadas aplicações em muitos campos como a electrónica, medicina, indústria aeroespacial, entre outros. No campo da química analítica e electroquímica, inúmeros trabalhos de investigação dedicados aos nanotubos de carbono têm sido recentemente publicados (Agui *et al.*, 2008).

Os nanotubos de carbono podem comportar-se como metais ou como semicondutores, dependendo da sua estrutura atómica, a qual é determinada pelo diâmetro e helicidade dos nanotubos (Lambin *et al.*, 2000). As suas propriedades electrónicas sugerem que os nanotubos de carbono têm a capacidade de mediar as reacções de transferência de electrões com espécies electroactivas, quando usados como material de eléctrodo (Huang *et al.*, 2008; Laschi *et al.*, 2008). A elevada sensibilidade, que os CNT fornecem à superfície de um eléctrodo, permite o seu uso como sensores extremamente sensíveis ao nível da nanoescala (Yang *et al.*, 2008).

Sensores electroquímicos baseados nos nanotubos de carbono representam uma alternativa interessante, para a quantificação de vários analitos. Desde a descoberta dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), por *Iijima* em 1991, e dos nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNT), em 1993 por *Iijima* e *Ichihashi*, que estes materiais suscitaram muito interesse devido às suas propriedades estruturais, mecânicas e electrónicas. Algumas destas propriedades incluem, estabilidade química e térmica elevada, elasticidade elevada, área de superfície específica elevada, elevadas propriedades adsortivas, fornecendo mais centros activos onde pode ocorrer reacção, e em algumas circunstâncias, condutividade metálica (Shahrokhian *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008).

Vários estudos já demonstraram que o uso destes eléctrodos modificados, quando comparado com o uso de eléctrodos não modificados, permite a obtenção de uma resposta electroquímica melhorada de variadas espécies com interesse bioquímico, tais como, neurotransmissores de catecolamina, citocromo c, ácido

ascórbico, NADH, compostos de hidrazina (Huang *et al.*, 2008), ácido oxálico, dopamina, triptofano e de alcalóides β -carbolinos (Zheng *et al.*, 2009).

No estudo e determinação de vários fármacos, tais como, a amoxicilina (Rezaei e Damiri, 2009), cinarizina (Hegde *et al.*, 2009a), trazodona (Hegde *et al.*, 2009b), acetaminofeno (Duan *et al.*, 2007), diclofenac de sódio (Yang *et al.*, 2008), metrodinazole (Lu *et al.*, 2004), tioridazina (Shahrokhian *et al.*, 2009) e do aciclovir (Wang *et al.*, 2006), os eléctrodos modificados com MWCNTs também têm sido utilizados com sucesso.

Os nanotubos de carbono são formados por arranjos hexagonais de carbono, que originam pequenos cilindros, usualmente com diâmetro de poucos Å a algumas dezenas de nm, enquanto o comprimento pode variar de várias centenas de nm a vários μm . De um ponto de vista estrutural, os CNT podem ser classificados em nanotubos de paredes simples (*single walled carbon nanotubes*, SWCNT) e de paredes múltiplas (*multi-walled carbon nanotubes*, MWCNT) (Burstein *et al.*, 2008). Os SWCNT são constituídos apenas por uma folha de grafeno enrolada sobre si mesma, formando um tubo cilíndrico de diâmetro na ordem dos 0.2 nm a 2.0 nm (Figura 7), enquanto os MWCNT envolvem múltiplas folhas de grafeno enroladas de forma concêntrica, cujo diâmetro coaxial varia entre 2 nm e 100 nm, com uma distância entre camadas entre 0.34 e 0.36 nm (Figura 8) (Katz e Willner, 2004; Jorio *et al.*, 2008).

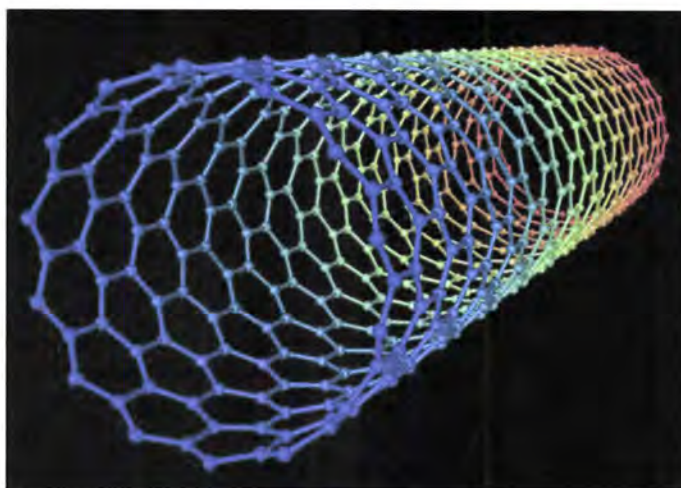


Figura 7 - Estrutura dos nanotubos de paredes simples (*single walled carbon nanotubes*, SWCNTs) (Hall, 2009).

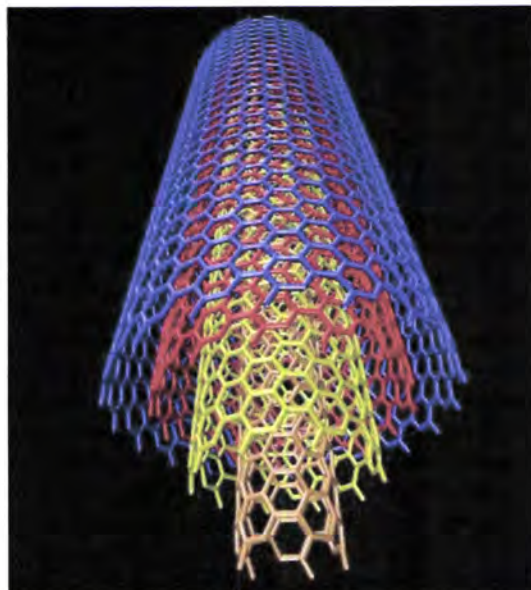


Figura 8 - Estrutura dos nanotubos de paredes múltiplas (*multi-walled carbon nanotubes*, MWCNTs) (Stanford University, 2006).

Em estudos prévios demonstrou-se que os MWCNT podem originar uma actividade electrocatalítica mais forte, ao mesmo tempo que minimizam incrustações na superfície do equipamento electroquímico. Medições de espectroscopia de túnel de varrimento (*scanning tunneling spectroscopy*, STS) indicam que os MWCNTs têm uma condutividade eléctrica relativa mais elevada, do que os SWCNTs (Lin e Chen, 2006).

Um dos maiores problemas que surgem na preparação de sensores com CNTs é a sua fraca solubilidade nos solventes comuns, o que diminui a uniformidade e reprodutibilidade do filme de CNTs na superfície do eléctrodo modificado. Na sequência deste facto, várias estratégias tem sido propostas para imobilizar os CNTs nos transdutores electroquímicos. Algumas destas baseiam-se na dispersão dos CNTs em solventes especiais, polielectrólitos, Nafion® e surfactantes (Shahrokhian *et al.*, 2009).

Na presença de um surfactante hidrofóbico, tal como por exemplo o dihexadecilhidrogenofosfato (DHP), os nanotubos de carbono de paredes múltiplas são mais facilmente dispersos na água. Obtém-se assim uma suspensão de MWCNTs estável e homogénea que permite revestir o eléctrodo de carbono com um filme de MWCNTs uniforme e reprodutível (Lu *et al.*, 2004).

1. 5. PREPARAÇÃO DE AMOSTRA: EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA

Actualmente, a extracção em fase sólida, SPE, é uma técnica vulgarmente utilizada para extracção e pré-concentração de analitos com interesse em diversos tipos de matrizes. Além disso, é utilizada com o propósito de minimizar o efeito de eventuais interferentes, presentes na matriz da amostra. O manuseamento desta técnica consiste num conjunto de passos, que normalmente tem início na escolha do formato e capacidade do dispositivo para SPE. Esta escolha está relacionada com o volume da amostra e com selecção e quantidade (50-1000 mg) do enchimento adequado, à natureza do meio e à retenção completa dos analitos em estudo. Um factor determinante na selecção e quantidade do enchimento, durante a preparação das amostras, é o volume de retenção específico, o qual pode ser afectado pela ineficiente retenção dos analitos ou com fenómenos de saturação do enchimento quando são eluídos grandes volumes de amostra. Um volume de retenção específico inadequado resulta no prejuízo das respectivas recuperações do analito. Um segundo passo, consiste no condicionamento do enchimento com a finalidade de o activar, sendo determinado pela natureza do analito, aplicando-se o princípio de "polar dissolve polar". No caso da presença de analitos polares, podem ser utilizados cartuchos contendo enchimentos com características de fase normal e no caso de analitos apolares, seleccionam-se enchimentos com características de fase reversa. A título de exemplo, para analitos apolares podem ser seleccionados enchimentos constituídos por octadecilsilica, sendo genericamente utilizado metanol/água para o correspondente condicionamento. Num terceiro passo, a amostra cujo volume pode ser de alguns mililitros até algumas centenas de mililitros, é adicionada ao dispositivo de SPE, podendo ainda ser vantajoso o controlo do pH ou da força iónica para a retenção mais efectiva do(s) analito(s) alvo no enchimento seleccionado. No caso de volumes significativos, a aplicação de vácuo torna-se numa ferramenta indispensável, sendo necessário controlar a velocidade do fluxo, uma vez a mesma poder influenciar o fenómeno de retenção associado. Um quarto passo é implementado para limpeza do enchimento, com recurso a solventes adequados, no sentido de remover potenciais interferentes indesejáveis. Após secagem, um quinto e último passo é implementado

com o intuito de eluir ou remover os compostos alvo retidos no enchimento, sendo seleccionado um solvente com polaridade adequada, cujo volume pode ir de algumas centenas de microlitros a alguns mililitros, consoante o teor e as características de polaridade do(s) analito(s) envolvido(s). Para uma melhor e mais eficiente eluição, é recomendado que o solvente eleito interaja com o enchimento durante um tempo mínimo necessário.

A SPE é uma técnica analítica muito poderosa, quer do ponto de vista da selectividade quer mesmo da sensibilidade, muito versátil combinando extracção com limpeza e concentração, relativamente rápida, pouco onerosa e possibilita automatização *on-line* com instrumentação cromatográfica. O domínio de aplicação da SPE é actualmente muito diversificado, incluindo amostras ambientais, alimentares, biológicas, químicas, bioquímicas, petroquímicas, farmacêuticas, forenses e biomédicas (Fritz, 1999).

1. 6. QUANTIFICAÇÃO

A aquisição e tratamento de dados em voltametria, para fins de análise quantitativa, consistem normalmente na medição das intensidades de corrente de pico, i_p , dos voltamogramas. As correntes de pico obtidas são então relacionadas com as concentrações de soluções padrão da espécie electroactiva e com a concentração dessa espécie na amostra de interesse. As maneiras mais comuns de se fazer esta análise são: o método da curva de calibração ou o método da adição padrão.

No método de curva de calibração, depois de medir o valor de i_p em cada voltamograma de solução padrão de concentração diferente, da substância em estudo (analito), os valores de i_p são representados graficamente em função dos respectivos valores de concentração. Espera-se que a curva obtida apresente um comportamento linear, na região de concentração de interesse, passando pela origem no caso das técnicas clássicas e menos sensíveis. No caso de técnicas mais sensíveis, a curva normalmente não passa pela origem, o que não afecta o uso do método. A concentração do analito na amostra analisada é entretanto obtida, interpolando o

valor de i_p correspondentemente medido na curva padrão. Em alternativa a i_p , pode representar-se no eixo das ordenadas a área de pico, A_p quando se julgar conveniente. O método da curva de calibração é o mais comum em química analítica. No entanto, quando se trabalha com matrizes complexas, frequentemente ocorre o chamado efeito de matriz. Neste caso, a determinação da concentração por interpolação na curva padrão conduz a resultados errados, porque os valores de i_p medidos para a amostra são obtidos numa solução com uma composição física e química muito diferente da dos padrões. No caso de se verificar que o método não pode ser utilizado, deve usar-se o método da adição padrão.

O método da adição padrão é principalmente usado com o objectivo de minimizar o problema de efeito de matriz. Mas em medições voltamétricas, como será referido adiante, apresenta uma vantagem adicional em relação ao método da curva de calibração.

Relativamente ao efeito de matriz, quando esta é complexa geralmente existe o problema da presença de espécies que afectam fortemente as propriedades da substância a ser determinada ou o sinal eléctrico que se mede (por exemplo, a presença de espécies complexantes pode alterar o comportamento electroquímico do analito, ou a presença de uma substância interferente pode produzir um pico de corrente no voltamograma, muito próximo do sinal do analito) o objectivo é realizar todas as medições experimentais, com soluções que não diferem na matriz e para as quais o nível de interferentes é o mesmo.

Neste procedimento, a amostra é adicionada à célula electroquímica juntamente com o electrólito de suporte. Para esta amostra de trabalho, mede-se e regista-se posteriormente a intensidade de corrente de pico, referente à espécie de interesse (analito). A seguir, adiciona-se sobre a solução da amostra uma alíquota de alguns microlitros da solução padrão do analito, de tal modo que a variação do volume total seja desprezável. Por exemplo, tendo a amostra de trabalho um volume de 15 mL, pode começar-se por adicionar uma alíquota do padrão de 15 μ L. Após a adição do padrão, lê-se o valor de i_p referente à solução *amostra+alíquota*. Usualmente adicionam-se pelo menos três alíquotas da solução padrão, registando-se o valor de i_p após cada adição. O volume adicionado é escolhido de tal forma a não ocorrer diluição

apreciável da amostra, o que alteraria as suas condições originais, que aqui só são alteradas praticamente pela variação da concentração do analito. Como todas as medidas são feitas com a mesma quantidade de amostra, as condições mantêm-se muito idênticas, de tal modo que o efeito de matriz é significativamente minimizado. As interferências que afectam as medidas da corrente referente ao analito presente na amostra de trabalho afectarão da mesma maneira, as medidas das correntes referentes às várias soluções *amostra+alíquota*.

Com os valores de i_p obtidos constrói-se uma curva i_p vs. Concentração relativa ao padrão adicionado. O valor de i_p da amostra sozinha é colocado no eixo y para o valor zero do eixo x (como não se adicionou qualquer alíquota, a concentração do analito é considerada nula). Entretanto, os outros valores de i_p , obtidos com as várias soluções *amostra+alíquota*, são colocados no eixo y e as respectivas concentrações (em padrão adicionado) no eixo x . O gráfico resultante deve ser uma recta. Essa recta é extrapolada até cortar o eixo da concentração (eixo x) no lado negativo das coordenadas. O módulo do valor negativo obtido é o valor da concentração do analito na amostra de trabalho. Sabendo-se o volume total da solução na célula e o volume da amostra original adicionado, calcula-se então a concentração do analito na solução da amostra original (Miller e Miller, 2000).

1. 7. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) é uma técnica analítica amplamente usada na separação, identificação e quantificação de vários tipos de analitos (Kazakevich e Lobrutto, 2007). Esta técnica baseia-se num processo físico de separação, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: uma fase estacionária, quimicamente ligada a um suporte sólido com grande área superficial e uma fase móvel líquida. A fase móvel líquida passa sobre a fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura até um detector.

A técnica de HPLC de fase reversa (*reversed-phase HPLC*, RP-HPLC) é um método empregue regularmente pela indústria farmacêutica para atestar a qualidade dos fármacos antes de serem comercializados (Sadek, 2002). Nesta técnica a fase estacionária é constituída por sílica substituída, geralmente com grupos C₁₈. Neste tipo de colunas, o tempo de retenção é maior para as moléculas mais apolares, enquanto as mais polares eluem rapidamente.

A detecção de fármacos por HPLC pode ser realizada com um detector de ultravioleta-visível (UV/Vis), pois a maioria destes compostos possuem duplas ligações conjugadas ou sistemas aromáticos, que absorvem radiação desta região do espectro electromagnético (Teixeira, 2006). Outro dos detectores frequentemente usados em HPLC é o detector de *diode-array* (DAD). Este tipo de detector permite, não só obter as características de retenção, como os espectros UV de cada um dos compostos. Em HPLC-DAD pode-se obter o espectro UV à medida que o eluente cromatográfico chega ao detector. Os espectros de cada pico, obtidos *on-line*, são gravados e podem depois ser comparados com bibliotecas de espectros. Este tipo de detector permite também a gravação simultânea dos cromatogramas a comprimentos de onda (c.d.o.) diferentes, permitindo assim, a detecção selectiva de diferentes grupos de compostos nos seus c.d.o. máximos de absorvância (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

No entanto, para obter uma elucidação estrutural completa dos compostos é necessário recorrer a outras técnicas tal como a espectrometria de massa (MS, *Mass Spectrometry*). A espectrometria de massa é uma técnica muito útil na identificação de compostos, cuja vantagem principal é a quantidade mínima de composto que é necessária para a análise. O desenvolvimento das interfaces de ionização à pressão atmosférica (*API*, *Atmospheric pressure ionization*) possibilitaram enormes avanços na análise dos compostos, uma vez que permitiram incorporar a utilização da detecção por espectrometria de massa, com a separação por HPLC. A combinação da capacidade de separação da cromatografia líquida, que permite a introdução de compostos “puros” no espectrómetro de massa, com a capacidade de identificação da espectrometria de massa, é muito vantajosa, particularmente porque compostos com tempos de retenção iguais ou semelhantes têm normalmente espectros de massa muito diferentes e podem assim ser diferenciados. A combinação destas duas técnicas

permite portanto, uma identificação mais definitiva e a determinação quantitativa de compostos, que não se encontram completamente resolvidos cromatograficamente.

As duas interfaces mais utilizadas na análise de compostos por LC-MS (*Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*) são APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e ESI (*Electrospray Ionization*). Apesar de não existir uma divisão inequívoca, a ionização por ESI é mais utilizada para compostos iónicos ou polares, e a ionização por APCI para compostos não iónicos e menos polares. Em ambos os tipos de ionização os espectros de massa podem ser obtidos em modo positivo ou negativo.

Na interface de ESI, o eluente, proveniente do HPLC, entra num capilar mantido à pressão atmosférica e a elevada voltagem. Devido ao campo eléctrico gerado pela diferença de potencial, o líquido é transformado num *spray* de gotas carregadas, que são dessolvatadas, à medida que passam na região de pressão atmosférica da fonte, em direcção ao contra eléctrodo. A dessolvatação é assistida por um fluxo de um gás de secagem, normalmente azoto, que passa em contínuo na região do *spray*. Os iões carregados dos analitos são conduzidos para o espectrómetro de massa, através da passagem por duas zonas de pressão cada vez menor.

Existem vários tipos de analisadores de massa mas os mais utilizados em LS-MS são os analisadores de quadrupólo, de armadilha de iões (*ion trap*), de sector de dupla focagem e de tempo de voo (*Time of flight, TOF*).

O processamento dos resultados em LC-MS pode ser realizado em vários modos, mas os mais comuns são o cromatograma de corrente iónica total (TIC, *Total ion current*), a monitorização do ião seleccionado (SIM, *Single ion monitoring*) e a monitorização da reacção seleccionada (SRM, *Selected reaction monitoring*).

O cromatograma de TIC representa graficamente a corrente iónica total em função do tempo e, portanto, são detectados compostos de todos os valores de m/z dentro de uma determinada gama, o que torna a identificação e quantificação do composto de interesse por vezes difícil. Em SIM é seleccionada uma gama muito restrita de valores m/z , normalmente até um único valor, e são apenas detectados os compostos correspondentes àquele valor de m/z . A monitorização por reacção seleccionada (SRM) é provavelmente o método mais utilizado em análise quantitativa por LC-MS porque permite a produção de um único fragmento, que pode ser

quantificado com elevada sensibilidade, mesmo a partir de uma matriz muito complicada. Neste tipo de monitorização é especificado o ião precursor do composto, para a posterior fragmentação por MS-MS, e é detectado um único fragmento resultante do primeiro (Teixeira, 2006).

Chelberg *et al.*, em 1988, e Martens e Bandit, em 1993, publicaram na literatura métodos analíticos para a determinação da CBZ, que consistiam na extracção líquido-líquido seguida da análise por HPLC com detecção UV. Liu *et al.*, em 1993, descreveu um método de precipitação com acetonitrilo para a quantificação da CBZ em soro com detecção *diode-array* a 200 nm, enquanto Romannyshyn *et al.*, em 1994, descreveu um método de extracção líquido-líquido seguido de análise por HPLC, num modo isocrático, com detecção UV a 210 nm, para um intervalo de concentração da CBZ entre 0.5 e 20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em 1993, Yukimitsu e Chiyoji publicaram um método de extracção em fase sólida da CBZ de soro, seguida da análise por HPLC com detecção UV a 240 nm. Os tempos de análise indicados foram entre 10 e 27 minutos. Em 2002, van Rooyen *et al.*, publicaram um método de LC-MS-MS para a determinação da CBZ em plasma humano, em que era possível injectar as amostras com intervalos de 4 minutos. O limite de quantificação (LOQ) mais baixo (com elevada precisão) era, até essa altura, de 1 mg mL^{-1} . Estes autores conseguiram um LOQ de 0.722 ng mL^{-1} (van Rooyen *et al.*, 2002).

Mais recentemente, em 2006, foi desenvolvido um método analítico que foi validado para a análise de vários fármacos em águas residuais, águas subterrâneas e em águas superficiais. Este método permitiu a detecção simultânea de quatro beta-bloqueadores (acebutolol, atenolol, metoprolol e sotalol), um antiepiléptico (carbamazepina) e três antibióticos fluoroquinolone (ciprofloxacina, ofloxacina e norfloxacina) recorrendo apenas a um pré-tratamento da amostra e ao uso da técnica cromatográfica. Este método incluía o passo de isolamento e concentração recorrendo à extracção em fase sólida, o passo de separação usando a cromatografia líquida de alta eficiência e o passo da detecção através da espectrometria de massa de triplo quadrupólo, realizada no modo de *multiple reaction monitoring* (MRM). Os limites de quantificação obtidos foram de 1 ng L^{-1} para águas subterrâneas e de 3.5 ng L^{-1} para águas residuais (Vieno *et al.*, 2006).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. EQUIPAMENTO

As determinações voltamétricas foram realizadas utilizando um Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT 20 (Eco Chemie) (Figura 9), acoplado a um computador e controlado por um programa GPES (*General Purpose Electrochemical System*), versão 4.9.

O posto electroquímico utilizado, no qual foram montados a célula electroquímica e um sistema de três eléctrodos, foi um aparelho da marca METROHM, modelo 663 VA Stand. Uma interface electrónica IME 663 (Eco Chemie), ligada entre o posto electroquímico e o potenciostato, permite a formação e controlo dos eléctrodos de gota de mercúrio, bem como o controlo do desarejamento e agitação da solução da célula. No caso de eléctrodos sólidos, permite controlar a velocidade de rotação dos mesmos. O posto electroquímico e a interface encontram-se representados na Figura 10 e 11, respectivamente.



Figura 9 - Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT 20.



Figura 10 - Posto electroquímico, modelo 663 VA Stand.



Figura 11 - Interface IME 663.

2. 1. 1. CÉLULA ELECTROQUÍMICA

Todas as determinações electroquímicas foram realizadas numa célula de vidro da marca METROHM (Figura 12), com a capacidade total de 25 mL, onde é introduzida a solução, um pequeno tubo para o seu desarejamento e o sistema de três eléctrodos (eléctrodo de referência, auxiliar e de trabalho), que se liga ao potenciostato por um cabo eléctrico.



Figura 12 - Célula electroquímica.

2. 1. 2. ELÉCTRODO DE REFERÊNCIA

As determinações voltamétricas foram realizadas utilizando um eléctrodo de referência Ag/AgCl da marca METROHM, com electrólito interno de KCl 3M. O eléctrodo foi montado num vaso que, contendo 5 mL de electrólito de suporte, serviu de ponte salina, também da marca METROHM (Figura 13). O conjunto do eléctrodo de referência e ponte salina foi montado no posto electroquímico.



Figura 13 - Conjunto de eléctrodo de referência e ponte salina, desmontado e montado.

2. 1. 3. ELÉCTRODO AUXILIAR

O eléctrodo auxiliar utilizado nas medições voltamétricas foi uma vareta de carbono vítreo, de 65 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro, montada num suporte, ambos da marca METROHM (Figura 14).

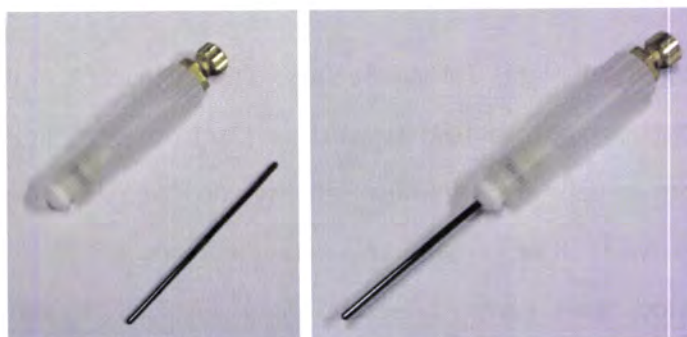


Figura 14 - Eléctrodo auxiliar e respectivo suporte, separados e em conjunto.

2. 1. 4. ELÉCTRODOS DE TRABALHO

2. 1. 4. 1. ELÉCTRODO DE MERCÚRIO DE GOTA SUSPensa

O eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, HMDE, foi formado através do uso de um dispositivo designado por *Multi-Mode Electrode*, MME (METROHM) e que complementa o aparelho 663 VA Stand. Neste dispositivo existe um reservatório para o mercúrio e uma parte onde é acondicionado o capilar de vidro, também da marca METROHM (Figura 15). O MME está ligado à garrafa de azoto de modo que, a uma pressão controlada do gás (aprox., 1 bar), é possível a formação da gota de mercúrio na extremidade livre do capilar.



Figura 15 - *Multi-Mode Electrode* (MME) (à esquerda) e capilar de vidro (à direita). A parte C do capilar é introduzida na parte M, do MME.

2. 1. 4. 2. ELÉCTRODO DE CARBONO VÍTREO

Uma parte significativa das determinações voltamétricas foi realizada utilizando um eléctrodo de carbono vítreo (*Glassy Carbon Electrode*, GCE), de 52.5 mm de comprimento e 7 mm de diâmetro (diâmetro efectivo do disco de carbono vítreo: 2.0 ± 0.1 mm), da marca METROHM (Figura 16). Este eléctrodo foi utilizado quer como sensor electroquímico, quer como substrato electrónico do eléctrodo modificado utilizado.



Figura 16 - Eléctrodo de carbono vítreo.

2. 1. 4. 3. ELÉCTRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO

Como foi anteriormente referido, o eléctrodo de carbono vítreo (GCE) descrito acima foi utilizado como substrato electrónico para preparar o eléctrodo de nanotubos de carbono (CNTs). Para o efeito, colocou-se uma gota (2 - 12 μL) de suspensão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas - dihexadecilhidrogenofosfato (MWCNTs-DHP), previamente preparada (ver Ponto 2. 4.).

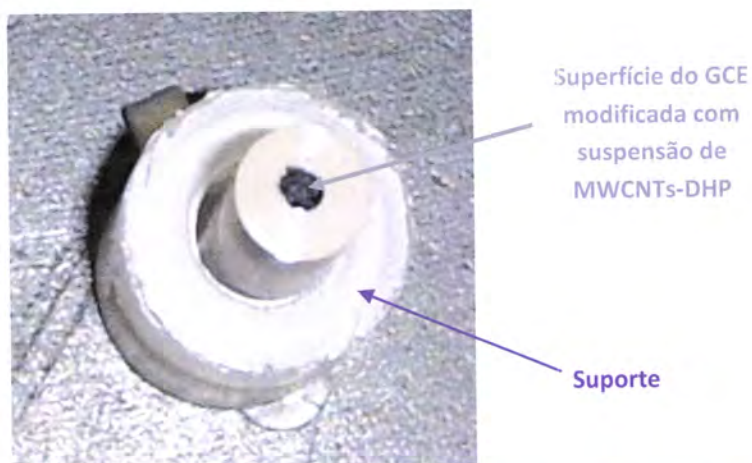


Figura 17 - Eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma suspensão de MWCNTs-DHP (vista de topo).

2.1.5. HPLC-UV/Vis

As análises por HPLC foram realizadas num aparelho *Elite LaChrom (Hitachi, Japan)* equipado com um detector de espectrometria UV/Vis. A coluna analítica utilizada foi uma coluna de fase reversa *Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (Agilent Technologies, Alemanha)* com um tamanho de partícula 5 µm e dimensões 250 × 4.6 mm. A pré-coluna analítica foi igualmente *Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (Agilent Technologies, Alemanha)* com um tamanho de partícula 5 µm e dimensões 12.5 × 4.6 mm.

2.1.6. LC-ESI-MS/MS

A análise de amostras por LC-ESI-MS/MS foi realizada num espectrómetro de massa *LCQ Advantage ThermoFinnigan* equipado com uma fonte de ionização *electrospray (ESI)* e um analisador de massa de armadilha de iões (*ion trap*). O espectrómetro de massa estava acoplado a um sistema de HPLC com amostrador automático (*Surveyor ThermoFinnigan*). A coluna analítica utilizada foi uma coluna de fase reversa *Thermo Hypersil Gold C₁₈*, com um tamanho de partícula 5 µm e dimensões 150 × 2.1 mm.

2.1.7. EQUIPAMENTO AUXILIAR

A água Milli-Q utilizada na preparação das soluções aquosas foi obtida num sistema *Simplicity® UV, Millipore Corp., France*.

As amostras foram secas a vácuo utilizando um evaporador rotativo *Büchi R-200*, um banho termostaticado *Büchi B-490* e uma bomba de vácuo *Büchi vac V'500*.

O pH foi controlado por um aparelho *Metrohm pH/mV, Modelo 632*, com um eléctrodo de pH de vidro.

A suspensão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas – dihexadecilhidrogenofosfato (MWCNTs-DHP) foi homogeneizada num banho de ultrasounds *Transsonic T660/H Elma®*.

2.2. MATERIAIS E REAGENTES

As características, grau de pureza e os fabricantes dos materiais e reagentes utilizados neste trabalho são apresentados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 – Características e fabricantes dos materiais utilizados.

Material	Características	Fabricante
Cartuchos de SPE	Lichrolut RP C ₁₈ , 3 mL, 500 mg	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Filtros de amostra Chromafil PTFE	0.45 µm de diâmetro dos poros, 25 mm de diâmetro do filtro	Macherey-Nagel (Düren, Alemanha)
MWCNTs (nanotubos de carbono de paredes múltiplas)	> 95%, O.D. × I.D. × comprimento: 7 - 15 nm × 3 - 6 nm × 0.5 - 200 µm	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)

Tabela 4 – Grau de pureza e fabricantes dos reagentes utilizados

Reagente	Grau de pureza	Fabricante
Metanol	HPLC gradiente	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Acetonitrilo	HPLC gradiente	SDS (Peypin, França)
Ácido Fórmico	98%	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Dihidrogenofosfato de potássio	p.a	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Hidrogenofosfato de sódio	p.a	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Acetato de sódio	p.a	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Ácido acético glacial	99.7%	Panreac Química S.A. [®] (Barcelona, Espanha)
Amónia	25%	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Ácido clorídrico	37%	Panreac Química S.A. [®] (Barcelona, Espanha)
Hidróxido de sódio	p.a	Panreac Química S.A. [®] (Barcelona, Espanha)
Carbamazepina (5H-dibenzo[b,f]azepina-5-carboxamida)	>99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)
Oxcarbazepina (10,11-Dihidro-10-oxo-5H-dibenzo[b,f]azepina-5-carboxamida)	Tegretol [®] 200	Novartis [®]
Ácido clofíbrico (ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropanóico)	Proaxen [®] 300	Pentafarma/Grünenthal S.A. [®]
Ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil)propanóico)	97%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)
Atenolol (2-(4-(2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi)fenil)acetamida)	99.8%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)
Diclofenac de sódio (acetato de 2-(2-(2,6-diclorofenilamino)fenil) sódio)	≥98%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)
DHP (dihexadecilhidrogenofosfato)	98%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)
	97%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)

2. 3. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

O tampão fosfato 0.1 M pH 7 foi preparado dissolvendo 2.0873 g de dihidrogenofosfato de potássio e 1.7198 g de hidrogenofosfato de sódio em água Milli-Q, ajustando o volume final num balão volumétrico de 250 mL.

O tampão acetato 0.1 M pH 4.7 foi preparado dissolvendo 0.6804 g de acetato de sódio e 0.286 mL de ácido acético glacial em água, ajustando o volume final num balão volumétrico de 100 mL.

O tampão amónio 0.1 M pH 11 foi preparado dissolvendo 0.4 mL de amónia e 0.7 mL de ácido clorídrico em água, ajustando o volume final num balão volumétrico de 100 mL.

A solução de hidróxido de sódio 5 M foi preparada dissolvendo 10 g de NaOH em água, completando até um volume final de 50 mL, num balão volumétrico.

A solução de ácido clorídrico 4.7 M foi preparada diluindo 0.53 mL de HCl em água, completando até um volume final de 10 mL, num balão volumétrico.

A solução stock 1 mM dos fármacos carbamazepina, ácido clofíbrico, ibuprofeno, atenolol e diclofenac de sódio, foi preparada mensalmente, dissolvendo a quantidade adequada de cada fármaco, em 20 mL de metanol, ajustando o resto do volume com água Milli-Q num balão volumétrico de 50 mL.

A solução de trabalho de carbamazepina 20 μ M foi preparada diariamente, transferindo 200 μ L da solução stock 1 mM para um balão volumétrico de 10 mL, ajustando o resto do volume com água Milli-Q.

A solução de trabalho 200 μ M dos fármacos carbamazepina, ácido clofíbrico, ibuprofeno, atenolol e diclofenac de sódio foi preparada diariamente transferindo 2 mL da solução stock 1 mM dos vários fármacos, para um balão volumétrico de 10 mL, ajustando o resto do volume com água Milli-Q.

A solução de Tegretol 200 ppm (comprimidos Tegretol® com 200 mg de CBZ) foi preparada dissolvendo um comprimido de 200 mg em 200 mL de MeOH, ajustando o resto do volume com água Milli-Q num balão volumétrico de 1000 mL.

A solução de oxcarbazepina 600 ppm (comprimidos Proaxen® com 300 mg de oxcarbazepina) foi preparada dissolvendo um comprimido de 300 mg em 20 mL de

MeOH, ajustando o resto do volume com água Milli-Q num balão volumétrico de 500 mL.

A solução de trabalho de oxcarbazepina 200 μ M foi preparada, transferindo 2.1 mL da solução stock 600 ppm para um balão volumétrico de 25 mL, ajustando o resto do volume com água Milli-Q.

2. 4. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS

A suspensão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas-dihexadecilhidrogenofosfato (MWCNTs-DHP) foi preparada dissolvendo 1 mg de MWCNTs e 1 mg de DHP (armazenado a -20°C) em 1 mL de H_2O Milli-Q. De seguida, a suspensão resultante foi colocada num banho de ultra-sons durante 45 minutos. Antes da colocação da gota de suspensão, no eléctrodo de carbono vítreo (GCE), a suspensão de MWCNTs-DHP foi sempre submetida a homogeneização no banho de ultra-sons, durante 15 minutos. A superfície do GCE foi previamente polida e limpa.

Uma solução de DHP, sem MWCNTs, foi igualmente preparada dissolvendo 1 mg de DHP em 1 mL de H_2O . Esta solução também foi colocada num banho de ultra-sons durante 45 minutos.

2. 5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE EFLUENTE

As amostras de água residual foram recolhidas à saída de uma estação de tratamento de águas residuais (ETAR) que serve uma comunidade com cerca de 400 habitantes em Évora. Estas foram filtradas e de seguida foram conservadas num frigorífico a 4°C .

Para fazer a quantificação da carbamazepina num efluente, revelou-se ser necessário executar um passo de preparação de amostra, usando a técnica de extracção em fase sólida (SPE).

Procedeu-se em primeiro lugar ao acondicionamento da coluna de SPE passando 10 mL de metanol seguidos de 10 mL de água Milli-Q. De seguida colocaram-se 10 mL de efluente, passaram-se 5 mL de água e deixou-se secar a coluna durante 15 minutos. Eluiu-se a amostra com 5 mL de metanol e levou-se a evaporar até à *secura* num rotavapor. Por último dissolveu-se a amostra em 4 mL de metanol e 6 mL de água, para posterior análise.

2. 6. TESTES DE DOPAGEM E RECUPERAÇÃO

Efectuaram-se testes de dopagem e recuperação usando amostras de efluente, de água da torneira e do fármaco Tegretol®.

As amostras de efluente foram dopadas com uma solução de carbamazepina: 20 mL de efluente foram dopados com 42.4 µL da solução stock de CBZ 1 mM, ficando o efluente com uma concentração de CBZ de 2.12 µM (0.500 µg mL⁻¹). Desta solução foram retirados 1.5 mL e adicionados aos 13.5 mL de tampão fosfato 0.1 M pH 7 que se encontravam na célula electroquímica, ficando na célula uma concentração de CBZ de 0.212 µM (0.050 µg mL⁻¹).

No que diz respeito à dopagem da água da torneira, doparam-se 2 mL de água da torneira com 35 µL da solução stock de CBZ de 1 mM. Desta solução, retiraram-se 250 µL e foram adicionados aos 15 mL de tampão fosfato 0.1 M que se encontravam na célula electroquímica, ficando na célula uma concentração de CBZ de 0.29 µM (0.069 µg mL⁻¹).

Em relação aos testes de recuperação em que se usou uma solução de Tegretol® de 200 ppm, retiraram-se 15 µL desta solução sendo de seguida adicionados aos 15 mL de tampão fosfato 0.1 M que se encontravam na célula electroquímica, ficando na célula uma concentração de CBZ de 200 ppb.

2. 7. MEDIÇÕES VOLTAMÉTRICAS

Todas as determinações voltamétricas foram realizadas de acordo com o seguinte procedimento experimental. Foram colocados 15 mL de electrólito de suporte na célula electroquímica. Após o acondicionamento da célula, do eléctrodo auxiliar e do eléctrodo de referência montado na ponte salina, no posto electroquímico, procedeu-se ao desarejamento da solução em estudo com azoto purificado (tipo C-50 da marca Gasin, com pureza de 99.995% e $O_2 < 4$ ppm) durante 15 minutos. Durante o resto da operação manteve-se uma atmosfera de azoto sobre a solução, impedindo assim que o oxigénio dissolvido interfira, quer por poder ser reduzido electroquimicamente quer pelo poder oxidante que pode ter no sistema em estudo.

No decorrer deste trabalho foram utilizados três tipos de eléctrodos de trabalho: o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE), o eléctrodo de carbono vítreo (GCE) e o eléctrodo de carbono vítreo modificado com um filme de MWCNTs-DHP (MWCNTs-DHP/GCE).

No caso do HMDE, formou-se o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, aguardou-se cerca de 45 segundos e de imediato deu-se início à medição. Depois de a análise terminar dispensou-se esta gota. Entre cada medição, com a mesma solução, renovou-se o eléctrodo através da formação de uma nova gota de mercúrio.

No caso do eléctrodo de carbono vítreo (GCE), antes de este ser colocado no posto electroquímico, a sua superfície foi cuidadosamente acondicionada, através de polimento mecânico com alumina (Al_2O_3 , $0.3 \mu m$) e posterior lavagem com água Milli-Q.

No caso do MWCNTs-DHP/GCE, após o polimento da superfície do GCE com alumina, lavagem com água Milli-Q e cuidadosa secagem, colocou-se com a ajuda de uma micropipeta a gota de suspensão de MWCNTs-DHP sobre a sua superfície, deixando-se evaporar à temperatura ambiente durante 3 horas. Cada medição foi repetida três a cinco vezes. Entre cada medição houve um tempo de espera de três minutos, em circuito aberto e com rotação do eléctrodo (1000-1500 rot/min).

Todo o material de vidro, incluindo a célula, foi cuidadosamente lavado no final de cada experiência, seguindo sempre o mesmo procedimento. Após ser enxaguado

com água foi imerso durante 1 h em metanol e 12 h em acetona. Após este tratamento, o material foi enxaguado novamente com água Milli-Q (três vezes) e seco.

Para fazer a caracterização e determinação electroquímica da carbamazepina foram utilizadas várias técnicas voltamétricas: voltametria cíclica (CV), de varrimento linear (LSV), onda quadrada (SWV) e de impulso diferencial (DPV). As condições instrumentais utilizadas em cada uma das técnicas encontram-se descritas resumidamente nas tabelas de 5 a 8.

Tabela 5 - Condições experimentais utilizadas na voltametria cíclica (escada).

Parâmetro	Valor ou gama de valores
Tempo de equilíbrio (s)	1
Potencial de equilíbrio (V)	-0.400 ^a ; -0.700 ^b
Potencial inicial (V)	-0.700
Potencial de 1 ^a inversão (V)	1.300
Potencial final (V)	-0.700
Degrau de potencial (mV)	2.44
Velocidade de varrimento (mV s ⁻¹)	5 – 500

^a Com HMDE; ^b Com GCE, modificados e não modificado.

Tabela 6 - Condições experimentais utilizadas na voltametria de varrimento linear (LSV).

Parâmetro	Valor ou gama de valores
Tempo de equilíbrio (s)	1
Potencial de equilíbrio (V)	-0.700
Potencial inicial (V)	-0.700
Potencial final (V)	1.300
Degrau de potencial (mV)	2.44
Velocidade de varrimento (mV s ⁻¹)	10 - 500

Tabela 7 - Condições experimentais utilizadas na voltametria de onda quadrada (SWV).

Parâmetro	Valor ou gama de valores
Tempo de equilíbrio (s)	15
Tempo de deposição (s)	0 - 240
Potencial de equilíbrio (V)	-0.400 ^a ; -0.700 ^b
Potencial inicial (V)	-0.400 ^a ; -0.700 ^b
Potencial final (V)	-1.400 ^a ; 1.400 ^b
Amplitude de onda (mV)	19.95
Degrau de potencial (mV)	1.2
Frequência (Hz)	25 - 250
Velocidade de varrimento efectiva (mV s ⁻¹)	30 - 300

^a Com HMDE; ^b Com GCE, modificados e não modificado.

Tabela 8 - Condições experimentais utilizadas na voltametria de impulso diferencial (DPV).

Parâmetro	Valor ou gama de valores
Tempo de equilíbrio (s)	15
Potencial de equilíbrio (V)	-0.400 ^a ; -0.700 ^b
Potencial inicial (V)	-0.400 ^a ; -0.700 ^b
Potencial final (V)	-1.400 ^a ; 1.400 ^b
Amplitude do impulso (mV)	30
Degrau de potencial (mV)	1.2
Período de modulação (ms)	50
Duração do degrau (ms)	250
Velocidade de varrimento (mV s ⁻¹)	4.8

^a Com HMDE; ^b Com GCE, modificados e não modificado.

2. 8. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR UV/Vis. (HPLC-UV/Vis) E COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de espectrometria UV/Vis foi usada para quantificar a CBZ em formulações farmacêuticas e em amostras de águas residuais. A separação foi feita no modo isocrático, com uma fase móvel composta por 75:25 (% v/v) acetonitrilo: água (acidificada com ácido fosfórico 0.1 % v/v), a um fluxo de 1.0 mL min⁻¹. O comprimento de onda utilizado na detecção foi de 210 nm.

As condições experimentais utilizadas na análise de amostras por LC-ESI-MS/MS foram: temperatura do capilar de 275°C, voltagem da fonte de 5.0 KV, corrente da fonte de 100 µA e voltagem do capilar de 15.0 V no modo positivo. A quantificação da CBZ foi feita utilizando um programa isocrático, usando metanol como eluente A e água acidificada com 0.1 % (v/v) de ácido fórmico como eluente B. A fase móvel foi composta por 75 % de eluente A: 25 % de eluente B (v/v) a um fluxo de 0.3 mL min⁻¹. As análises por LC-ESI-MS/MS foram realizadas no modo SRM (*Selected Reaction Monitoring*), usando a transição mais intensa para a CBZ (237.0 → 193.9) (Vieno *et al.*, 2006). Foram injectadas cinco réplicas de 20 µL de cada amostra, previamente filtradas num filtro de 0.45 µm. As curvas de calibração foram construídas usando um conjunto de soluções padrão de CBZ, preparadas com metanol/água (20:80, v/v) ou água residual pré-tratada, com concentrações no intervalo entre 0.25 e 5.0 mg L⁻¹.

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A parte fundamental deste trabalho, a qual consiste na caracterização e determinação voltamétrica da CBZ, foi realizada recorrendo aos seguintes eléctrodos de trabalho: um clássico eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE) e um moderno e inovador eléctrodo de carbono vítreo (GCE), modificado com um filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) e dihexadecilhidrogenofosfato (DHP). O eléctrodo de mercúrio de gota suspensa é um eléctrodo muito sensível, produz baixas correntes de fundo, permitindo o estudo da redução da CBZ na região catódica. O eléctrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs-DHP foi utilizado com a intenção de estudar a oxidação da CBZ na região anódica e de obter uma resposta melhorada da CBZ, quando comparada com a resposta da CBZ no eléctrodo de carbono vítreo sem modificação.

Numa primeira fase, os resultados voltamétricos obtidos foram analisados no sentido de otimizar as condições experimentais necessárias à quantificação da CBZ, por esta via. Numa fase posterior e já mais avançada, a técnica voltamétrica desenvolvida foi aplicada a uma série de amostras diferentes, contendo CBZ. Numa parte final, compararam-se os resultados da técnica voltamétrica proposta para a determinação da CBZ, com os resultados experimentais paralelamente obtidos por técnicas cromatográficas vulgarmente utilizadas no domínio da análise de fármacos (como HPLC-UV/Vis e LC-MS).

3. 1. ESTUDO DO COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA CARBAMAZEPINA COM O ELÉCTRODO DE MERCÚRIO DE GOTA SUSPensa

3. 1. 1. VOLTAMETRIA CÍCLICA

O comportamento voltamétrico da carbamazepina foi estudado usando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa como eléctrodo de trabalho. Para obter informação preliminar e qualitativa acerca do comportamento da CBZ na zona de potenciais negativos usou-se a voltametria cíclica. Como electrólito de suporte foi

usado o tampão fosfato 0.1 M pH ~ 7. Na figura 18 apresentam-se os voltamogramas cíclicos, obtidos entre -0.400 V e -1.300 V, na ausência (linha tracejada a azul) e na presença de 6.0 μM CBZ (linha contínua a vermelho), a uma velocidade de varrimento de 0.100 V s^{-1} . Desde logo é possível observar no voltamograma da CBZ, um pico muito largo no sentido de potenciais mais negativos, que ocorre a um potencial de aproximadamente -1.074 V e para o qual não existe aparentemente qualquer pico correspondente, no sentido inverso do varrimento. O pequeno pico que se observa no sentido de potenciais mais positivos, é devido a uma espécie (à partida electroactiva) que existe na solução do electrólito de suporte. O pico muito largo, a cerca de -1.074 V, é muito possivelmente devido à redução da CBZ, conforme reportado em alguns trabalhos (Campanella *et al.*, 2006). Devido à ausência de um pico de corrente, no ramo do voltamograma obtido no sentido inverso, e de acordo com a pouca bibliografia existente, pode dizer-se que nas condições experimentais usadas a CBZ é reduzida irreversivelmente no HMDE. A natureza alargada do pico parece estar relacionada com os efeitos provocados pela constituição química do electrólito de suporte, que influencia o valor da corrente medida nesta região (ver voltamograma a tracejado e azul, da Figura 18).

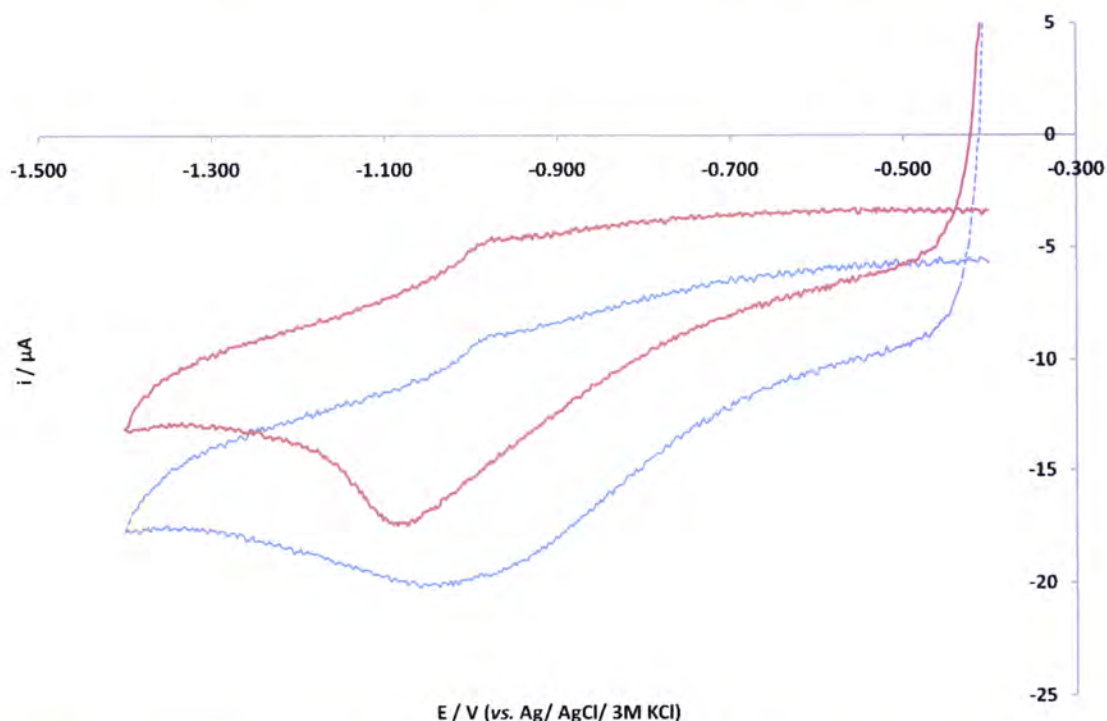


Figura 18 - Voltamogramas cíclicos de 0.0 μM (linha tracejada a azul) e 6.0 μM (linha contínua a vermelho) de CBZ, no tampão fosfato 0.1 M pH \sim 7, a $v = 0.100$ V/s e $E_i = -0.400$ V.

3. 1. 1. 1. ESTUDO DA VELOCIDADE DE VARRIMENTO

Para tentar obter mais alguma informação, acerca do processo de eléctrodo da CBZ no HMDE, o seu comportamento electroquímico foi estudado no intervalo de velocidades de varrimento entre 0.005 V s^{-1} e 0.500 V s^{-1} , usando a voltametria cíclica. Este estudo foi feito com 6.0 μM CBZ, usando-se como electrólito de suporte, o tampão fosfato 0.1 M pH \sim 7. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos na janela de potencial de -0.400 V a -1.400 V, com o primeiro varrimento realizado no sentido de potenciais mais catódicos (Figura 19).

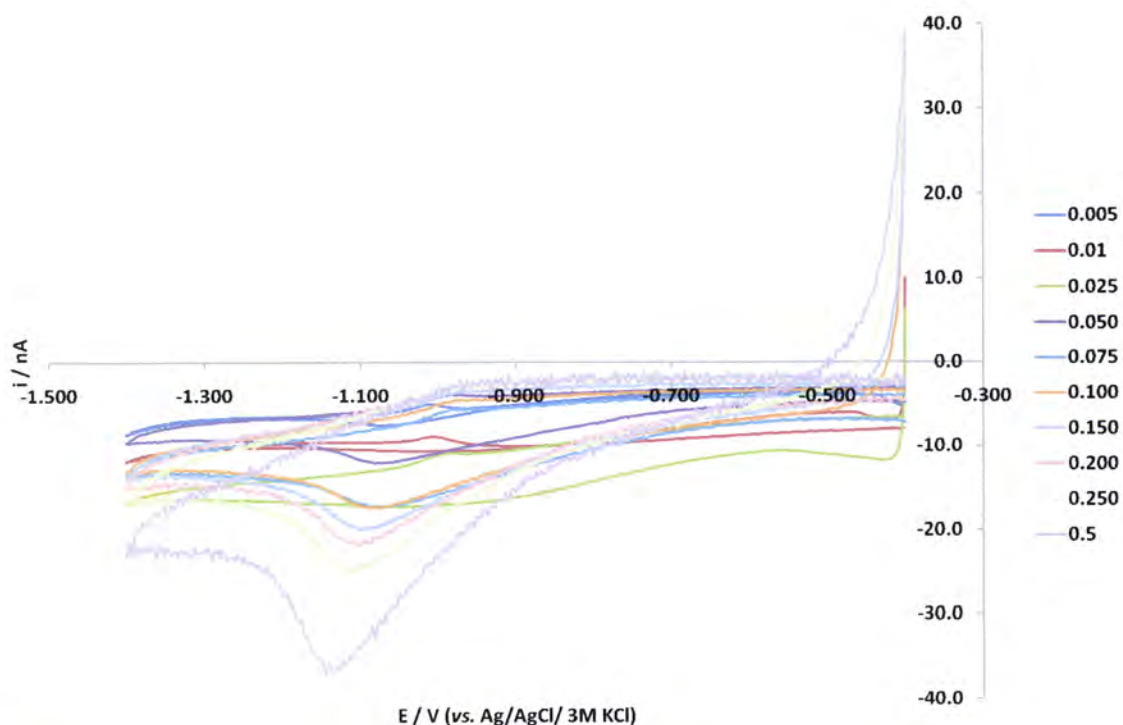


Figura 19 - Efeito da velocidade de varrimento nos voltamogramas cíclicos de $6.0 \mu\text{M}$ CBZ, obtidos com o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE), no tampão fosfato 0.1M $\text{pH} \sim 7$, no intervalo de velocidade entre 0.005 e 0.500 V s^{-1} .

Na figura 20 apresenta-se a dependência da intensidade de corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento, no intervalo 0.010 a 0.500 V s^{-1} . A relação de linearidade obtida entre estas duas grandezas, $i_p = - 24.88 v^{1/2} + 1.776$, sugere que a redução irreversível da CBZ é controlada pela sua difusão desde o seio da solução, para junto do eléctrodo. Porém, parece verificar-se que existe alguma influência da adsorção da CBZ no processo de eléctrodo, se tivermos em conta que a relação $\log i_p$ vs $\log v$ apresenta um valor de declive (Figura 21), intermédio entre 0.5 (controlo por difusão) e 1.0 (controlo por adsorção) (Gosser Jr., 1993; Southampton Electrochemistry Group, 1985).

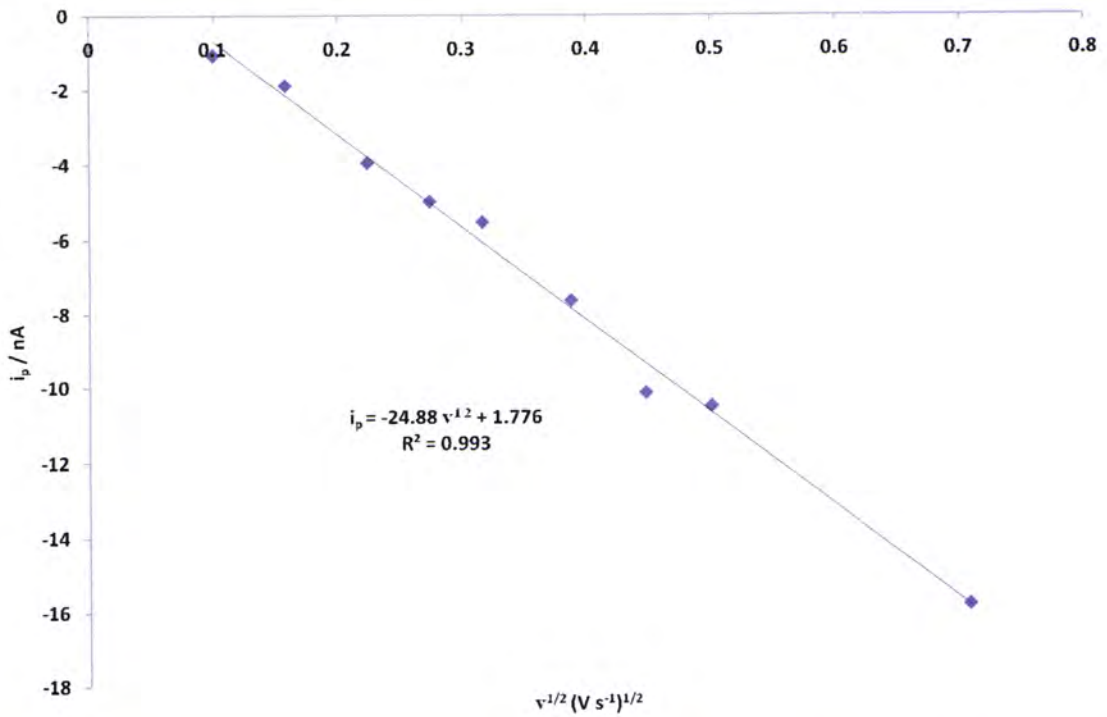


Figura 20 - Intensidade da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento. Intervalo de velocidade considerado: 0.010 a 0.500 V s⁻¹.

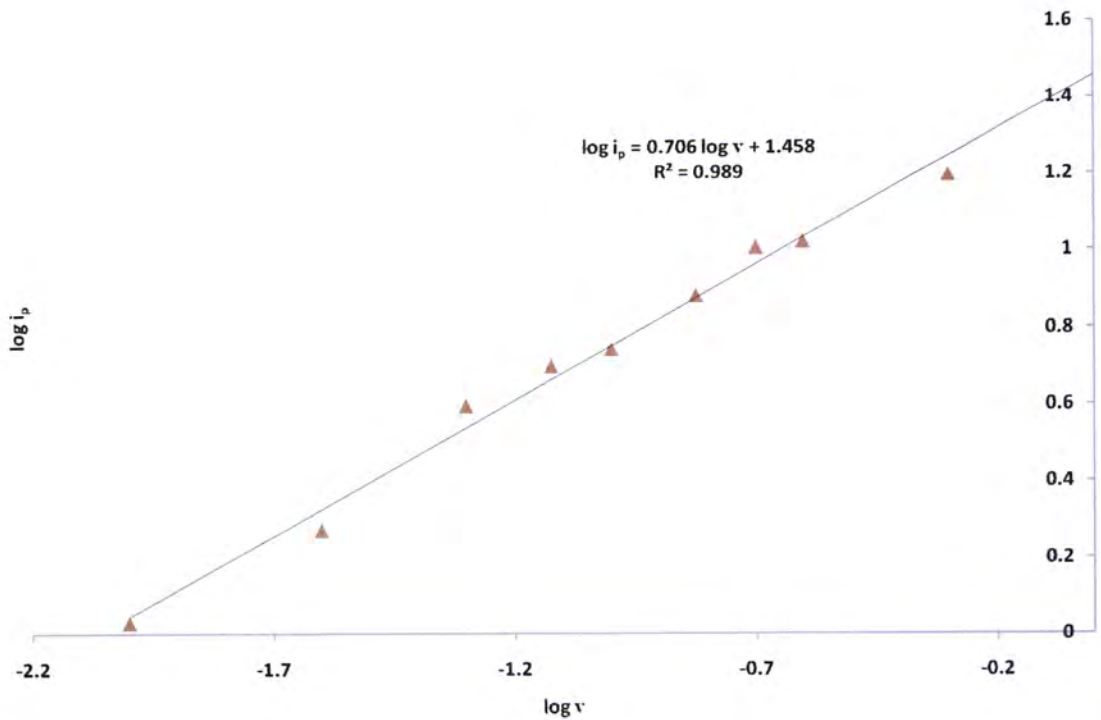


Figura 21 - Relação log-log entre a Intensidade da corrente de pico e a velocidade de varrimento. Intervalo de velocidade considerado: 0.010 a 0.500 V s⁻¹.

Quanto à dependência semi-logaritmica do potencial de pico, E_p , da velocidade de varrimento, observa-se (Figura 22) que o valor de E_p não varia a velocidades mais baixas (0.010 a 0.075 $V s^{-1}$). No entanto, a velocidades superiores (de 0.075 a 0.500 $V s^{-1}$) o potencial tende a deslocar-se no sentido de potenciais mais negativos, variando linearmente com o $\log v$, como é característico de processos de eléctrodo irreversíveis.

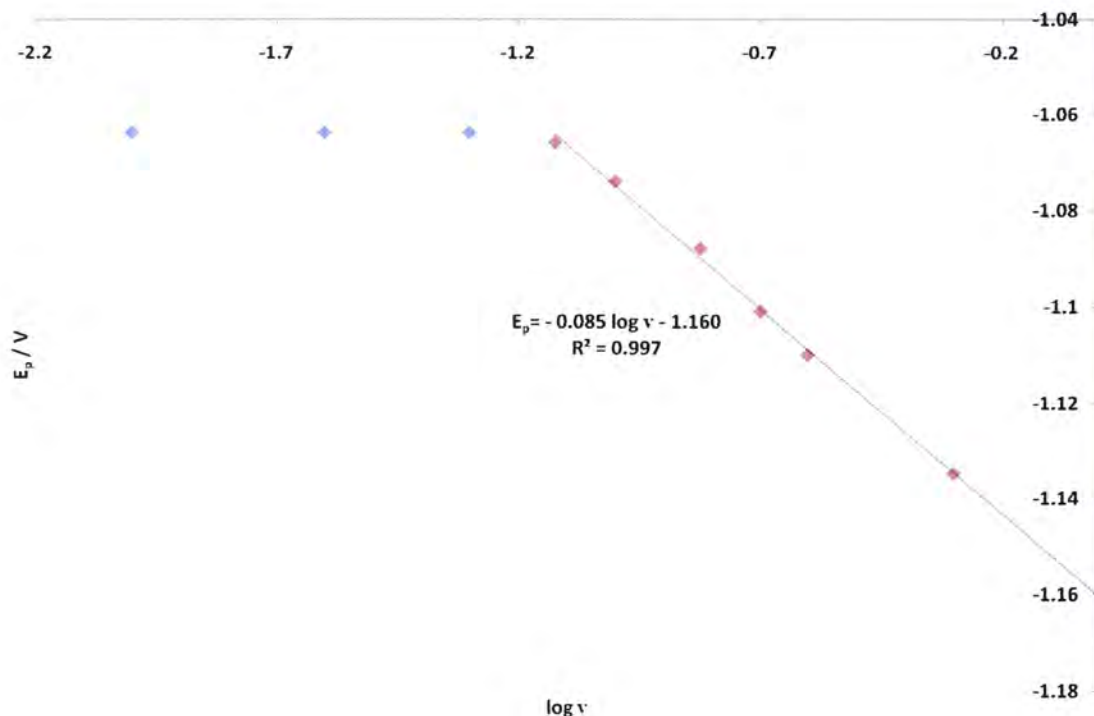


Figura 22 - Potencial de pico em função do logaritmo da velocidade de varrimento. Intervalo de velocidade considerado: 0.010 a 0.500 $V s^{-1}$.

No sentido de utilizar técnicas voltamétricas mais sensíveis e eficazes, na determinação de quantidades muito reduzidas de analitos, avançou-se nesta fase para o estudo electroquímico da CBZ, através das voltametrias de onda quadrada e de impulso diferencial.

3. 1. 2. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

O comportamento voltamétrico da carbamazepina foi estudado usando a voltametria de onda quadrada (SWV). Como electrólito de suporte foi usado o tampão fosfato 0.1 M pH ~ 7. O voltamograma correspondente à presença da CBZ (Curva a, da Figura 23), obtido entre -0.400 V e -1.400 V, a uma frequência de 25 Hz, com um tempo de equilíbrio de 15 segundos e um tempo de deposição nulo, mostra um pico que ocorre a um potencial de -1.074 V, resultante da redução de 0.40 μ M de CBZ existente na célula electroquímica. Observando atentamente a componente directa e inversa da corrente do voltamograma (a) (respectivas curvas a_d e a_i da Figura 23), surge um dado novo. A redução da carbamazepina nestas condições de potencial e de amostragem rápida da corrente, não parece ser um processo de eléctrodo totalmente irreversível. A componente de corrente inversa revela um pico de corrente pequeno, sugerindo haver nesta região uma pequena contribuição anódica para a corrente medida.

Nesta região de potencial, o próprio electrólito de suporte (Curva b, da Figura 23), também apresenta um sinal relativamente elevado (sem apresentar estes resultados na sua totalidade, apenas se observa a contribuição catódica para a corrente). Este deve ter origem em alguma impureza electroactiva do electrólito. Devido à sua grandeza verificou-se que este sinal constituía um problema na determinação voltamétrica da CBZ. Especialmente, para concentrações de CBZ mais reduzidas.

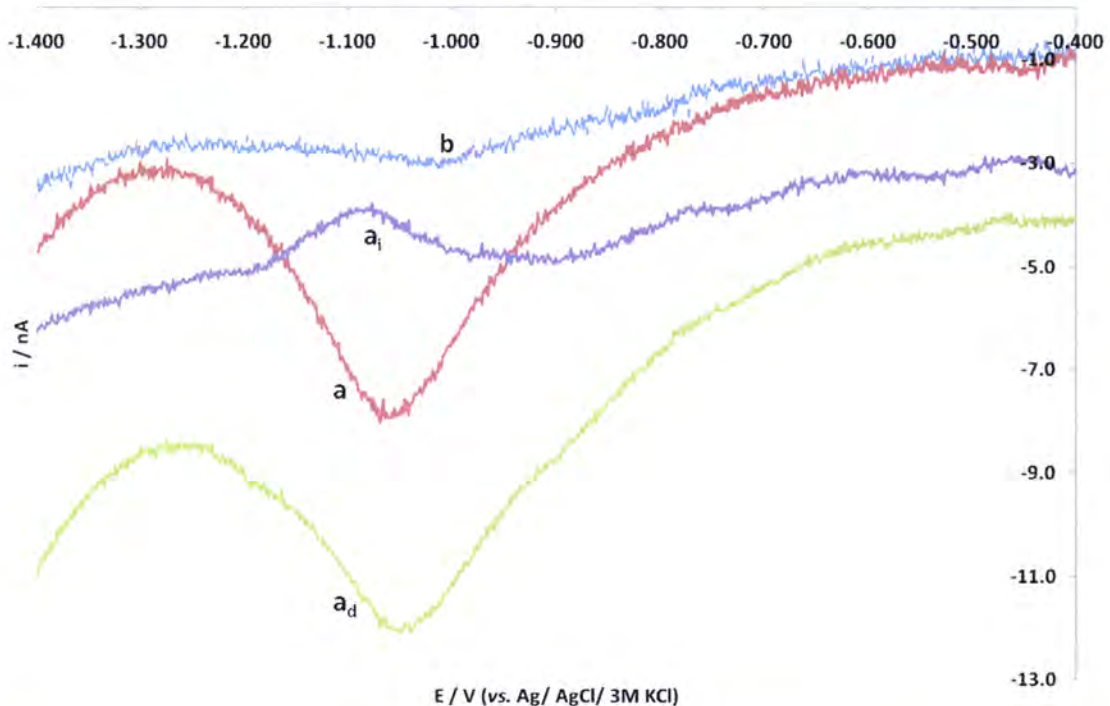


Figura 23 - Voltamogramas de SWV de (a) 0.40 μM de CBZ no tampão fosfato 0.1 M pH \sim 7 e (b) do próprio tampão, obtidos a uma frequência de 25 Hz, a um $t_{\text{dep}} = 0$ seg e a um $t_{\text{eq}} = 15$ seg. As curvas (a_d) e (a_i) representam, respectivamente, as componentes directa e inversa de corrente do voltamograma (a).

Sabe-se que na técnica de SWV, a resposta obtida e a intensidade de pico, é grandemente influenciada por variáveis como o tempo de deposição (t_{dep}), potencial inicial (E_{ini}), frequência (f) e pelo pH do meio. Por isso efectuou-se o estudo destas variáveis, de modo a otimizar as condições experimentais.

3. 1. 2. 1. EFEITO DO PH

O estudo da variação do pH do meio foi realizado no intervalo de pH entre 2.18 e 11.75. A figura 24 mostra a intensidade de corrente do pico de redução da CBZ em função dos vários pH estudados. Observa-se que a intensidade de corrente de pico é dependente do pH do meio, aumentando com o valor deste, até um valor de aproximadamente 7. O pH de trabalho seleccionado é o do tampão fosfato 0.1 M, com pH efectivo de 6.71, uma vez que a intensidade de corrente de pico é elevada a este pH, não se justificando fazer qualquer ajuste do pH do meio.

Como o objectivo do desenvolvimento deste método electroquímico é a sua aplicação na determinação da CBZ, em amostras de águas residuais reais, outra das razões que levou a esta escolha, é o facto de este pH se aproximar do pH natural das águas.

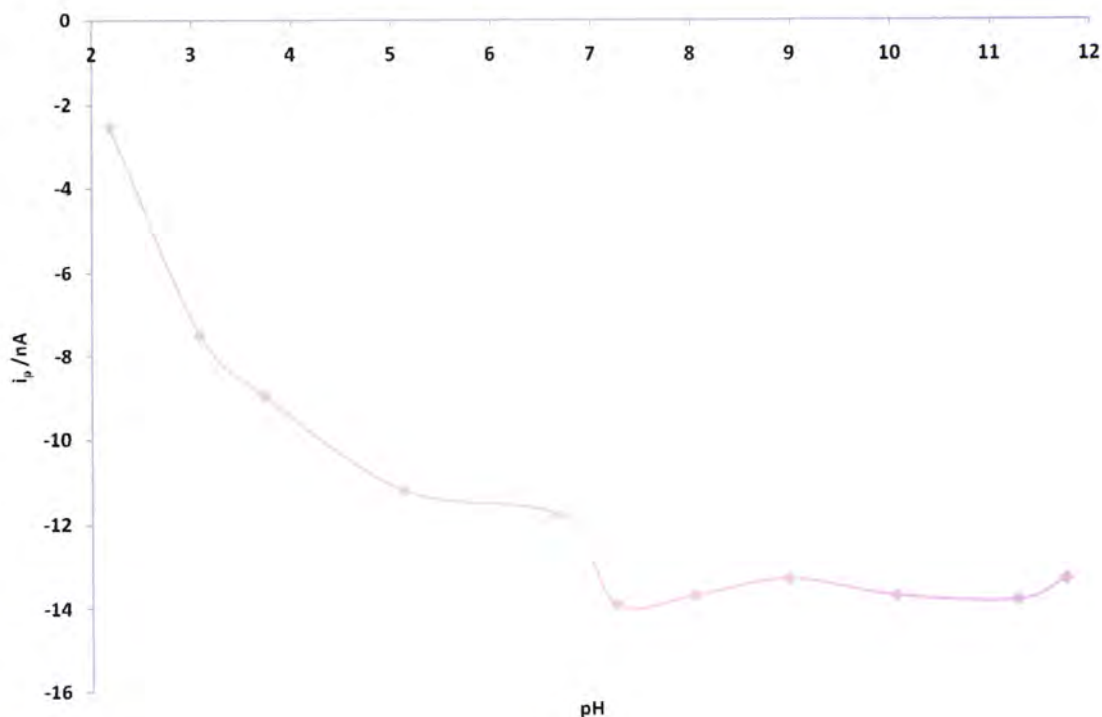


Figura 24 - Intensidade da corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada em função do pH do meio. $E_i = -0.400$ V; $t_{dep} = 0$ s; $t_{eq} = 15$ s; Frequência = 25 Hz. $[CBZ] = 0.40$ μ M.

3. 1. 2. 2. EFEITO DO POTENCIAL INICIAL

Efectuou-se o estudo da intensidade de corrente de pico em função do potencial inicial (E_{ini}), no intervalo de potencial entre -0.100 V e -0.600 V (Figura 25). Este estudo foi realizado com uma concentração de CBZ de 0.40 μ M, no tampão fosfato 0.1 M com pH efectivo de 6.71 . Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos a uma frequência de 25 Hz, utilizando um tempo de equilíbrio de 15 segundos e um tempo de deposição nulo.

O potencial inicial escolhido, igual ao potencial de deposição, foi de -0.400 V, uma vez que começando a análise a esse potencial, a intensidade de corrente de pico

tem um valor satisfatório e uma vez que não é recomendável começar a análise a um potencial muito próximo da zona em que vai ocorrer o pico de redução da CBZ.

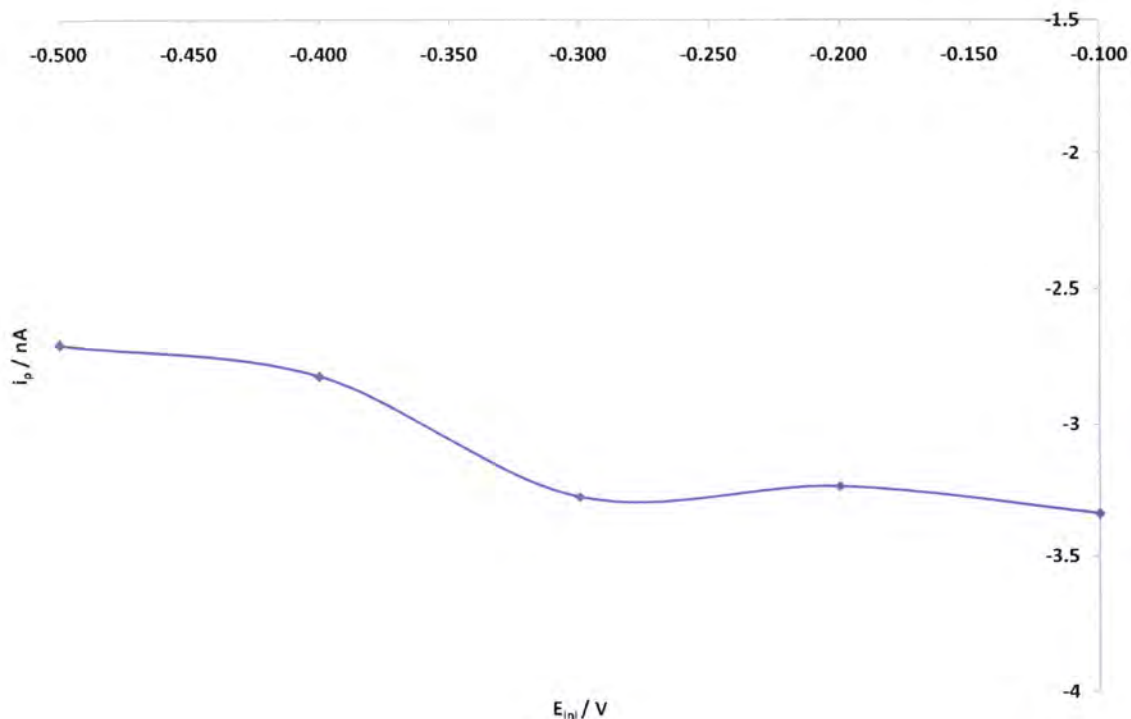


Figura 25 - Intensidade da corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada em função do potencial inicial. $t_{dep} = 0$ s; $t_{eq} = 15$ s; Frequência = 25 Hz. [CBZ] = 0,40 μ M.

3. 1. 2. 3. EFEITO DO TEMPO DE DEPOSIÇÃO

Foi também efectuado, o estudo da intensidade de corrente de pico em função do tempo de deposição (t_{dep}), no intervalo de tempo entre 0 e 330 segundos (Figura 26). Este estudo foi feito a uma concentração de CBZ de 0.40 μ M e com o mesmo electrólito de suporte. Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos a uma frequência de 25 Hz, utilizando um tempo de equilíbrio de 15 segundos e um valor de potencial inicial de -0.400 V.

Com base nos resultados descritos na figura 26, o tempo de deposição escolhido foi de 60 segundos. Esta escolha teve como base o compromisso entre o tempo de análise e a intensidade de corrente de pico. Escolhendo este tempo de deposição, o tempo de análise é aceitável e o valor da intensidade de corrente já é

bastante elevado. Períodos de deposição superiores traduzem-se num aumento pouco significativo da intensidade de corrente de pico, constituindo ao mesmo tempo um aumento considerável do tempo total de análise.

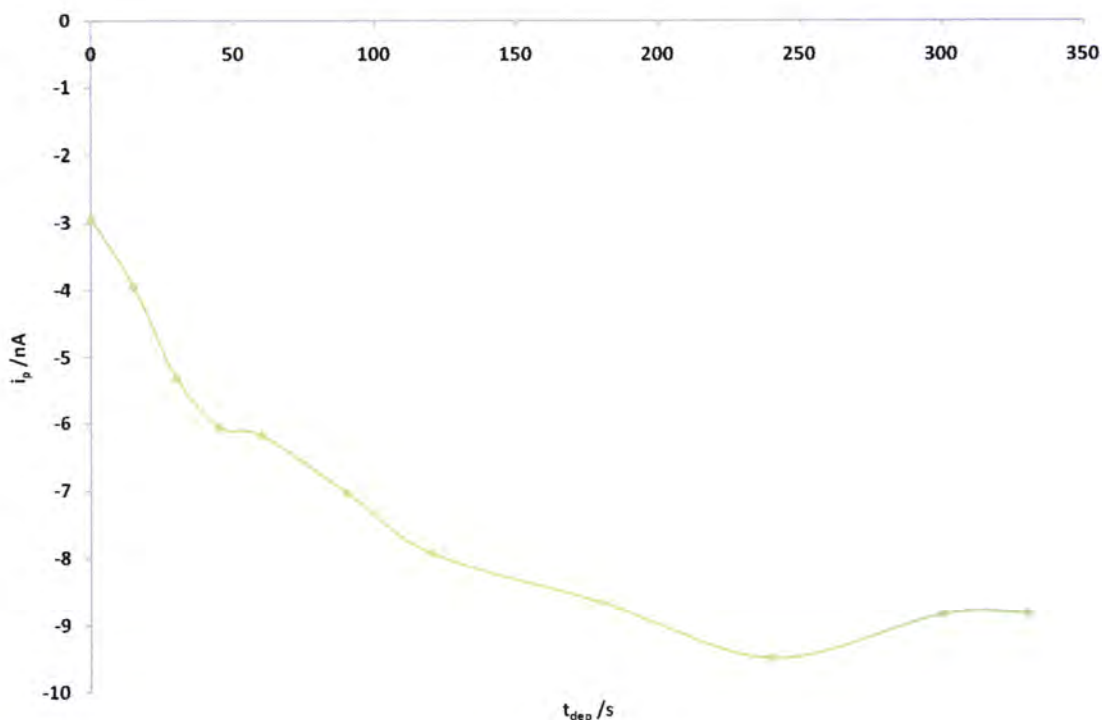


Figura 26 - Intensidade da corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada em função do tempo de deposição. $E_i = -0.400$ V; $t_{eq} = 15$ s; Frequência = 25 Hz. $[CBZ] = 0.40$ μ M.

3. 1. 2. 4. EFEITO DA FREQUÊNCIA

A frequência (f) é um dos parâmetros mais importantes na voltametria de onda quadrada, pois é o valor desta que determina fundamentalmente a intensidade do sinal analítico e, conseqüentemente, a sensibilidade do método.

O estudo da variação da frequência foi feito entre 25 e 250 Hz. Neste estudo foi usado o mesmo electrólito de suporte, o tampão fosfato 0.1 M. Os voltamogramas foram obtidos entre -0.400 V e -1.400 V, utilizando um tempo de equilíbrio de 15 segundos e um tempo de deposição de 60 segundos. A concentração de CBZ existente na célula electroquímica foi de 0.40 μ M. A figura 27 mostra a variação do valor da

intensidade de corrente do pico de redução da CBZ em função das várias frequências estudadas. Observa-se, que com o aumento da frequência, ocorre um aumento proporcional na intensidade de corrente de pico. Os valores de frequência de 100 e 200 Hz foram seleccionados para o trabalho posterior, por produzirem um sinal analítico elevado, repetível e com pouco ruído associado. Com valores superiores, como 250 Hz, o voltamograma de onda quadrada tende a apresentar mais ruído eléctrico.

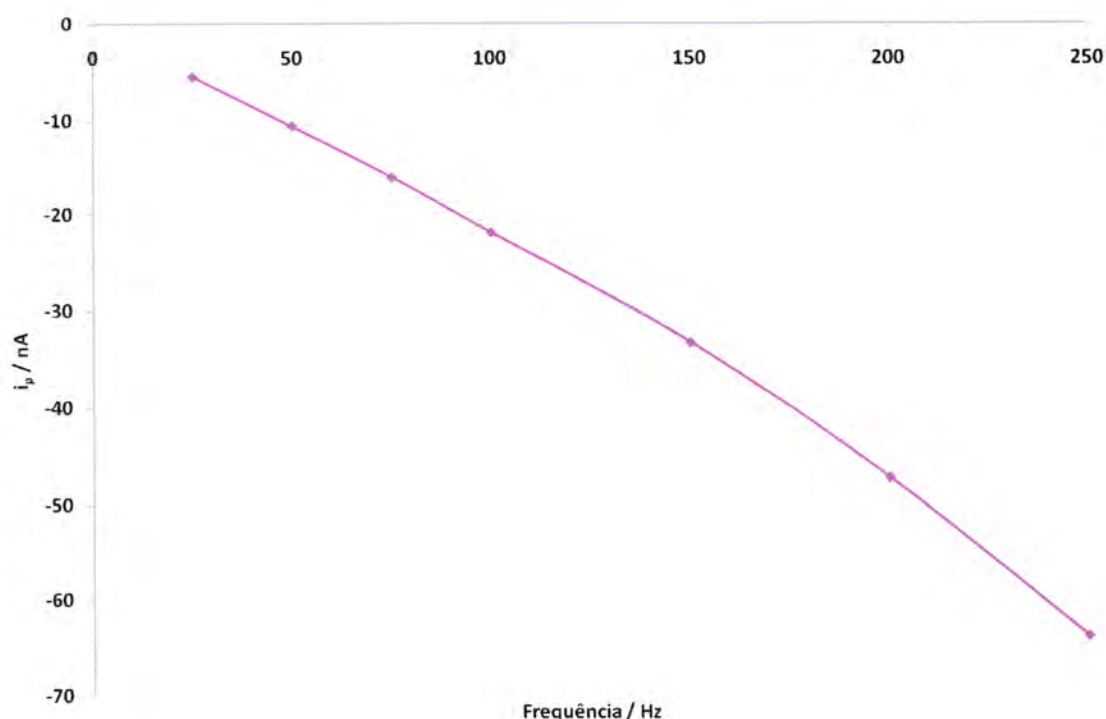


Figura 27 - Intensidade da corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada em função da frequência. $E_i = -0.400$ V; $t_{\text{dep}} = 60$ s; $t_{\text{eq}} = 15$ s; [CBZ] = 0.40 μ M.

3. 1. 2. 5. CURVA DE CALIBRAÇÃO

Após a optimização das variáveis experimentais mais relevantes na SWV, realizaram-se as medições voltamétricas no intervalo de concentração da CBZ entre 0.020 e 2.13 μ M, a fim de obter uma curva de calibração. Os voltamogramas obtidos entre -0.400 V e -1.400 V, com duas frequências diferentes, 100 e 200 Hz, apresentam-se nas figuras 28 e 29, respectivamente. Os períodos de deposição e equilíbrio foram 60 s e 15 s, respectivamente.

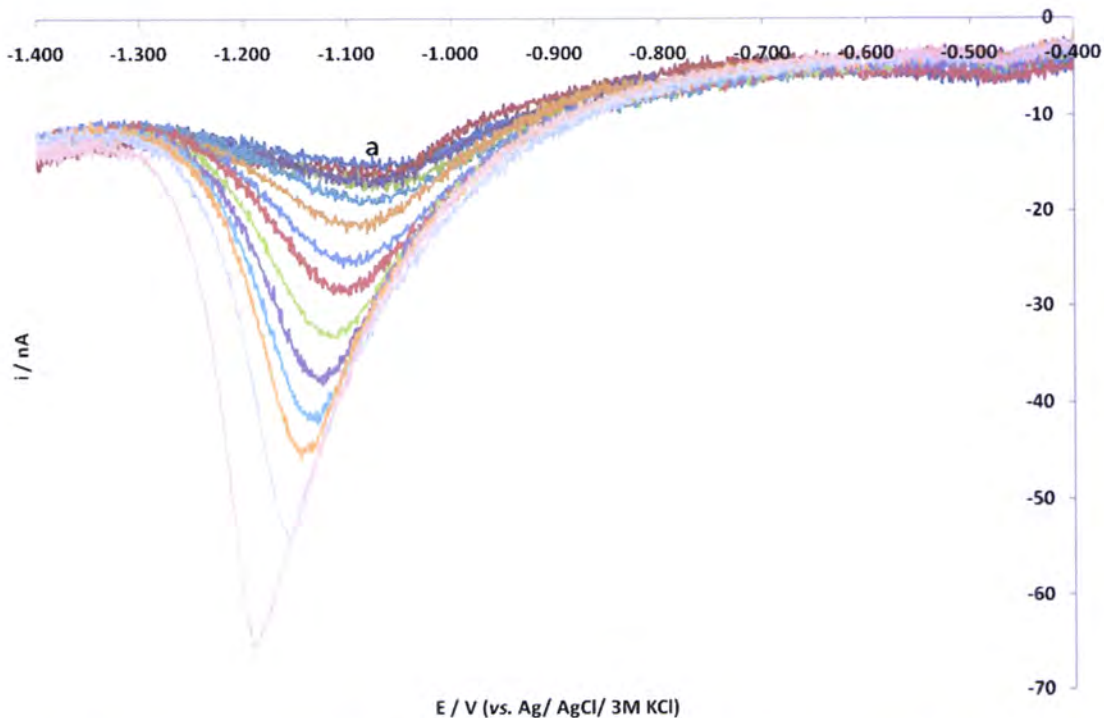


Figura 28 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos a uma frequência de 100 Hz. [CBZ] / μM : 0.020 - 2.13. O voltamograma (a) representa a resposta do electrólito de suporte.

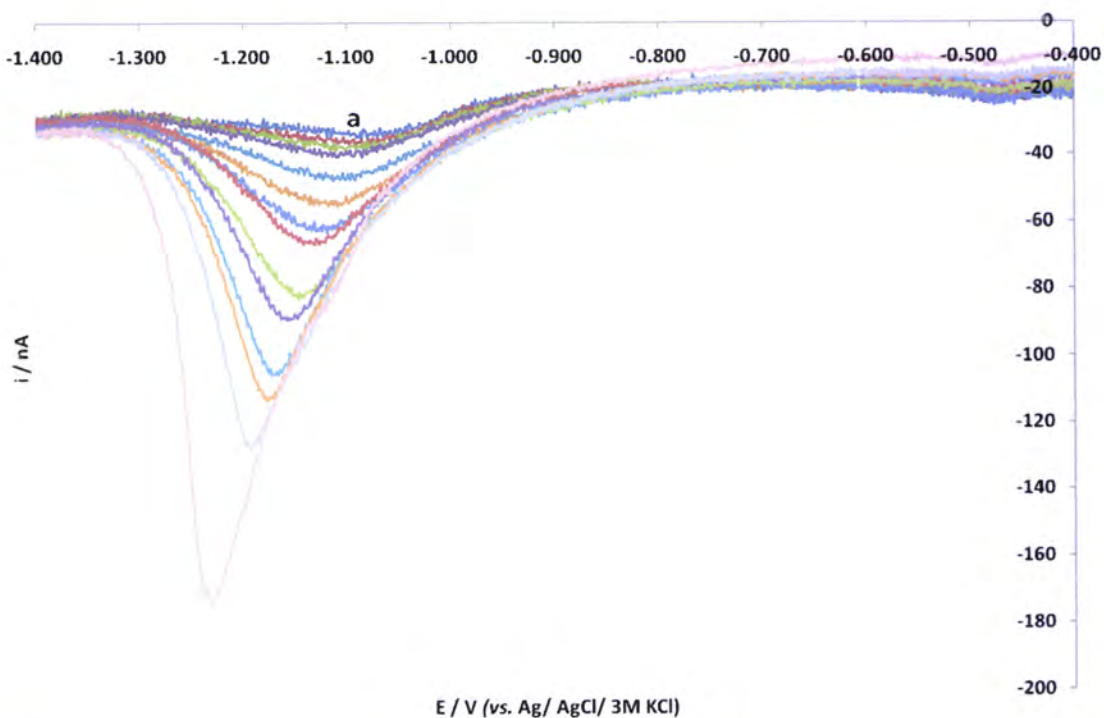


Figura 29 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos a uma frequência de 200 Hz. [CBZ] / μM : 0.020 - 2.13. O voltamograma (a) representa a resposta do electrólito de suporte.

Subtraindo, cada voltamograma da CBZ do voltamograma do electrólito de suporte, e determinando depois a intensidade de corrente de pico, i_p , do voltamograma resultante, observa-se uma relação linear entre i_p e [CBZ], no intervalo de concentração 0.02 - 1.33 μM , para as duas frequências (Figura 30). Para a frequência de 100 Hz, a relação entre a corrente de pico e a concentração da CBZ pode ser descrita pela equação de regressão linear: i_p (nA) = -36.93 [CBZ] (μM) - 1.396 com um $R^2 = 0.997$, e para a frequência de 200 Hz, pela equação: i_p (nA) = -93.13 [CBZ] (μM) - 3.241 com um $R^2 = 0.997$. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) respectivamente obtidos para cada frequência foram: $(\text{LOD})_{100 \text{ Hz}} = 0.03 \mu\text{M}$ e $(\text{LOQ})_{100 \text{ Hz}} = 0.09 \mu\text{M}$; $(\text{LOD})_{200 \text{ Hz}} = 0.03 \mu\text{M}$ e $(\text{LOQ})_{200 \text{ Hz}} = 0.10 \mu\text{M}$.

Com base neste comportamento linear, seria de esperar que, aplicando este método electroanalítico, com o HMDE como eléctrodo de trabalho, e após a optimização das variáveis mais relevantes na técnica de SWV, fosse possível efectuar a quantificação da CBZ em amostras reais de águas residuais dopadas, usando o método da adição padrão. Porém, tal não se verificou. Foram feitas várias tentativas nesse sentido, experimentou-se, inclusive, fazer a determinação da CBZ em amostras submetidas previamente a extracção em fase sólida (SPE), mas obtiveram-se sempre percentagens de recuperação muito superiores ao valor com que as amostras eram dopadas. Muito provavelmente, estes efeitos devem-se a substâncias existentes na matriz da amostra, que amplificam ou contribuem para o sinal analítico medido.

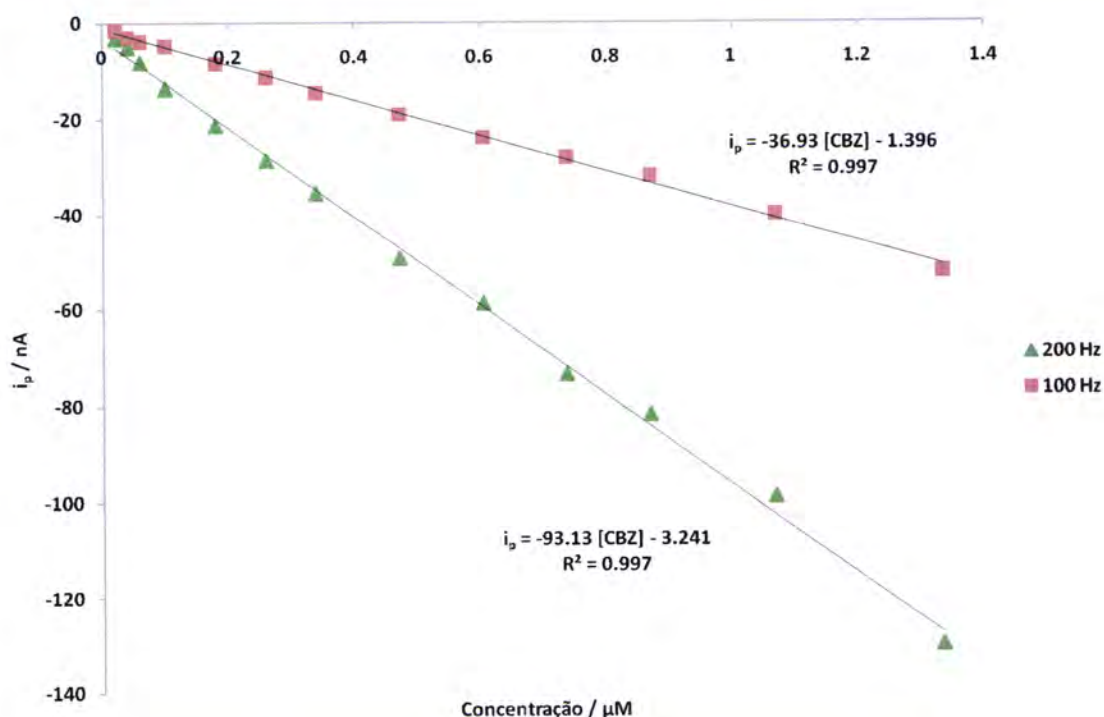


Figura 30 - Curvas de calibração da CBZ, a duas frequências: 100 e 200 Hz.

3. 1. 3. VOLTAMETRIA DE IMPULSO DIFERENCIAL

O comportamento voltamétrico da carbamazepina também foi estudado usando a voltametria de impulso diferencial (DPV). Como electrólito de suporte usou-se o tampão fosfato 0.1 M. O voltamograma, obtido entre -0.400 V e -1.400 V, com uma amplitude do impulso de 0.020 V, uma velocidade de varrimento efectiva de 4.8 mV s^{-1} , um tempo de equilíbrio de 15 segundos e um tempo de deposição nulo, mostra um pico bem definido a um potencial de -1.077 V, resultante da redução de $0.40 \mu\text{M}$ de CBZ existente na célula electroquímica (Curva a da Figura 31). A voltametria de impulso diferencial veio a corroborar também, que a redução da CBZ no HMDE não é totalmente irreversível. Entretanto, o voltamograma correspondente ao electrólito de suporte (Curva b da mesma figura), apresenta também um pequeno pico, que deve ter origem na redução de um interferente presente nos sais utilizados para preparar o próprio electrólito de suporte, como já tinha sido referido nos estudos de SWV.

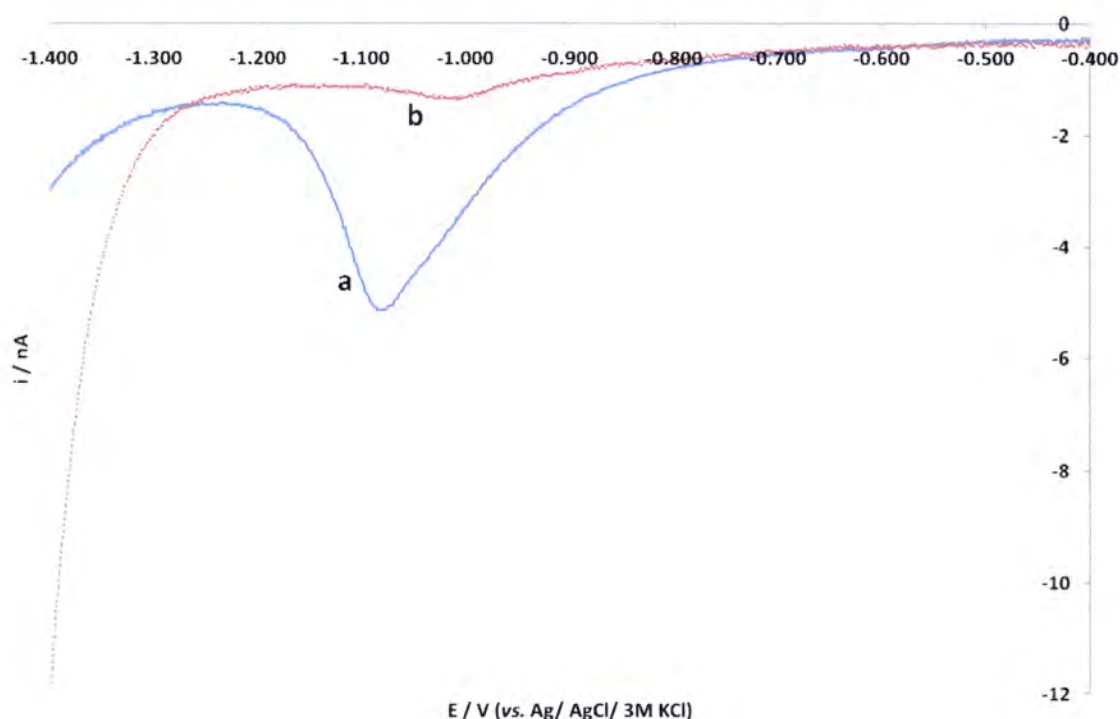


Figura 31 - Voltamogramas de DPV de (a) 0.40 μM de CBZ no tampão fosfato 0.1M pH \sim 7 e (b) do próprio tampão, obtidos com uma amplitude de impulso de 0.020 V, uma velocidade de varrimento efectiva de 4.8 mV s^{-1} , $t_{\text{dep}} = 0 \text{ s}$ e $t_{\text{eq}} = 15 \text{ s}$. $E_i = -0.400 \text{ V}$.

Nos estudos realizados numa fase seguinte, e que consistiram em variar algumas das condições voltamétricas que determinam a qualidade do sinal das DPV (e.g., amplitude de impulso e velocidade de varrimento efectiva), não foram alcançados melhoramentos significativos, que justificassem a tentativa de fazer a determinação quantitativa da CBZ por DPV. Por isso, deu-se por concluída esta parte do trabalho.

3. 2. ESTUDO DO COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA CARBAMAZEPINA USANDO UM ELÉCTRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO

Para se estudar o comportamento anódico da carbamazepina (CBZ), numa região de potencial relativamente extensa, utilizou-se o eléctrodo MWCNTs-DHP/GCE. Para o efeito, numa primeira fase foi realizado um estudo preliminar em que se recorreu à voltametria cíclica (VC) e a técnicas voltamétricas de impulso (SWV e DPV), à partida mais sensíveis que a VC. Neste estudo, dispôs-se de um eléctrodo de carbono vítreo, cuja superfície activa foi modificada com uma gota de suspensão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas - dihexadecilhidrogenofosfato (MWCNTs-DHP). Na maioria dos estudos de VC utilizou-se um volume de suspensão de 8 μL e nos estudos de SWV e DPV, um volume de 10 μL . Como electrólito de suporte foi usado um tampão fosfato 0.1 M pH 7, sendo que a concentração de CBZ na célula foi de 6.0 μM nos estudos de VC, e entre 0.667 e 2.667 μM nos estudos de SWV e DPV. Numa fase posterior, realizou-se um estudo sistemático acerca das principais variáveis que condicionam a resposta electroquímica da CBZ, no eléctrodo MWCNTs-DHP/GCE. Para o efeito, utilizou-se apenas a voltametria cíclica, pelos motivos que se explicam adiante.

3. 2. 1. ESTUDO PRELIMINAR

3. 2. 1. 1. VOLTAMETRIA CÍCLICA

Na Figura 32 apresentam-se os voltamogramas cíclicos da CBZ, obtidos com o eléctrodo modificado MWCNTs-DHP/GCE e com o GCE não modificado. Incluem-se os voltamogramas cíclicos das soluções de electrólito de suporte, sem CBZ, obtidos com ambos os eléctrodos. Comparando estes dois últimos voltamogramas, observa-se que a corrente de fundo no MWCNTs-DHP/GCE é superior à obtida com o GCE e que o limite de trabalho anódico, não é tão positivo quanto o deste eléctrodo não modificado. No entanto, da análise da Figura 32 sobressaem outros dois aspectos importantes: a resposta electroquímica da CBZ no eléctrodo modificado é mais

complexa e muito mais acentuada do que no eléctrodo de carbono vítreo não modificado. Em especial, a altura dos picos de corrente com este eléctrodo modificado é elevada e muito superior, o que justifica por si só a importância analítica deste eléctrodo, relativamente ao GCE clássico e simples. Esta amplificação do sinal electroquímico é normalmente interpretada como sendo devida às propriedades únicas do MWCNTs. Uma condutividade eléctrica e área superficial específicas elevadas e uma química e estrutura superficiais que fornecem centros activos, que potenciam as interacções com as espécies electroactivas, parecem ser as causas mais plausíveis para justificar o efeito amplificador dos MWCNTs nos processos redox da CBZ (Agui *et al.*, 2008). Alguns dos processos redox da CBZ, observados com o eléctrodo modificado, também parecem ser energeticamente favorecidos, em relação ao GCE simples (*e.g.*, no extremo mais anódico dos voltamogramas, o pico do voltamograma (a) ocorre a um potencial menos positivo, do que o pico do voltamograma (c)).

Relativamente à complexidade do comportamento electroquímico da CBZ, neste eléctrodo modificado, o voltamograma cíclico (a) (Figura 32), mostra uma série de pelo menos cinco picos (P_1 a P_5), que se estende desde a região de potencial inicial mais negativa, até à região de potencial mais positiva. No varrimento realizado no sentido inverso, são observáveis apenas três picos (P_1' a P_3'), a potenciais menos positivos. Nas condições utilizadas, apenas os fenómenos associados aos picos P_5 e P_1' do voltamograma (a) parecem ter correspondência no voltamograma (c).

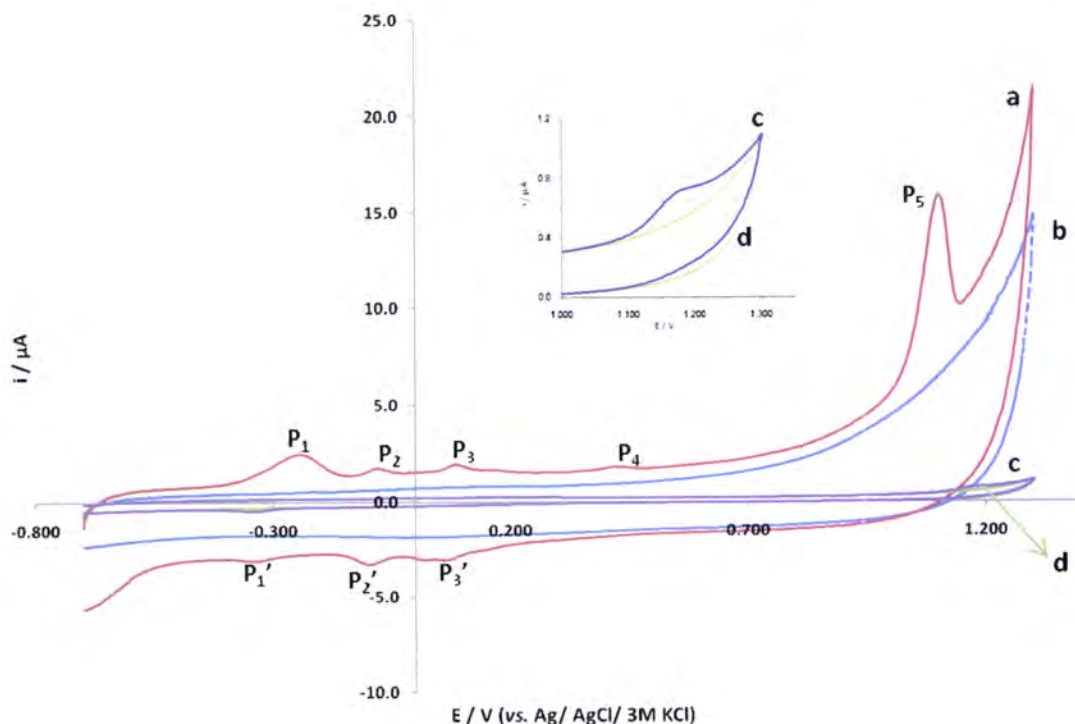


Figura 32 - Voltamogramas cíclicos de 6.0 μM CBZ num (a) eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 8 μL de suspensão MWCNTs-DHP e (c) num eléctrodo de carbono vítreo não modificado, no tampão fosfato 0.1M pH 7. Os voltamogramas (b) e (d) representam os voltamogramas do electrólito de suporte, nos respectivos eléctrodos. $E_i = -0.700$ V; $v = 0.100$ V/s.

A forma dos picos obtidos, em ambos os sentidos, parece indicar que estão todos relacionados com fenómenos faradáicos (transferência de carga electrónica). Os cinco picos obtidos no varrimento inicial positivo, corresponderão a fenómenos de oxidação da CBZ. Os três picos obtidos no sentido inverso, corresponderão a fenómenos de redução das formas mais oxidadas de CBZ, que se formaram no varrimento anterior. A ocorrência de cada um destes três fenómenos de redução, identificados pelos picos P_1' , P_2' e P_3' , parece estar relacionada com as correspondentes oxidações, que são denunciadas pelos picos P_1 , P_2 e P_3 . Na gama de potencial entre os -0.700 V e os 0.200 V, a CBZ parece assumir quatro formas redox diferentes CBZ1, CBZ2, CBZ3 e CBZ4, em que se podem considerar, de entre os seguintes pares (CBZ2/CBZ1, CBZ3/CBZ2, CBZ4/CBZ3, CBZ3/CBZ1, CBZ4/CBZ1 ou CBZ4/CBZ2) três pares redox. A verdadeira natureza química e estrutural destas formas redox de CBZ, não é conhecida na literatura da especialidade, e por isso só se pode especular acerca da natureza dos vários picos. O par, CBZ2/CBZ1, poderá ser o

responsável pelo par de picos P_1/P_1' , um dos pares, CBZ3/CBZ2 ou CBZ3/CBZ1, pelo par de picos P_2/P_2' , e um dos pares, CBZ4/CBZ3, CBZ4/CBZ2, ou CBZ4/CBZ1, pelo par de picos P_3/P_3' .

Entretanto, para o quarto pico de oxidação, P_4 , muito menos definido que os anteriores, e para o quinto pico, P_5 , o de maior altura, não existem picos de redução correspondentes no ramo catódico do voltamograma. Esta observação indicia que os processos de oxidação correspondentes, e que envolvem eventualmente outras formas da CBZ (no pico P_4 , oxidação de uma das formas anteriores, como CBZ4 a CBZ5, e no pico 5, oxidação de uma das formas anteriores, como CBZ5 a CBZ6), são processos de eléctrodo irreversíveis (ou as formas CBZ5 e CBZ6 não são redutíveis ou são espécies químicas muito instáveis). Em qualquer dos casos, a inércia electroquímica ou instabilidade química das espécies CBZ5 e CBZ6 não compromete os processos de redução, denunciados pelos picos P_1' , P_2' e P_3' .

Com base nestes resultados, pode concluir-se que o comportamento electroquímico da CBZ é muito complexo, desconhecendo-se qual a verdadeira natureza química e estrutural das formas redox de CBZ envolvidas, e os mecanismos reaccionais subjacentes. A este respeito, o estudo da CBZ merece ser aprofundado.

No que diz respeito a fins analíticos de quantificação da CBZ, é possível concluir que: o eléctrodo modificado com os MWCNTs é um sensor electroquímico superior ao GCE e que, com o eléctrodo modificado existem pelo menos dois picos de oxidação, P_1 e P_5 , que podem ser utilizados como sinal analítico. Naturalmente que a maior altura do pico P_5 , que se desenvolve a um potencial de 1.099 V, favorece a sua escolha. Por isso, o estudo que se segue centrar-se-á neste pico de oxidação da CBZ.

Ainda com respeito à importância e utilidade analítica do pico P_5 , e das medições voltamétricas como um todo, investigou-se também a sua repetibilidade. Fizeram-se medições voltamétricas sucessivas, realizando voltametrias cíclicas com ciclos múltiplos e voltametrias cíclicas de ciclo simples, mas seguidas (em intervalos de 15 s a 120 s), observando-se em qualquer dos casos, que a altura do pico P_5 diminuía logo a partir do 2º ciclo (Figura 33). Esta diminuição do sinal, eventualmente deve estar relacionada com o bloqueamento dos centros activos dos MWCNTs, por parte de

produtos resultantes dos varrimentos anteriores, e com a diminuição da concentração superficial da CBZ, nestes centros.

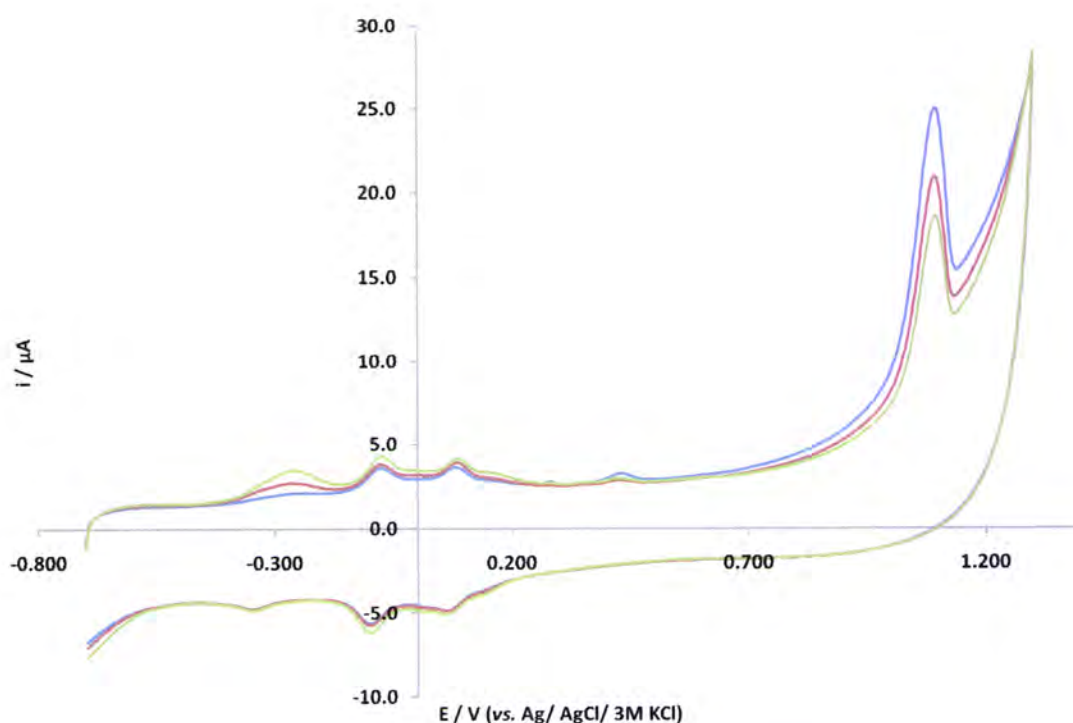


Figura 33 – Voltamogramas obtidos em três voltametrias cíclicas de ciclo simples sucessivas.

No sentido de resolver este problema, que como se sabe implica muitas dificuldades de ordem prática num trabalho analítico de rotina, foram experimentadas várias estratégias. Aumentou-se o tempo entre medições, mantendo-se o eléctrodo MWCNTs-DHP/GCE em potencial de circuito aberto (*open circuit potential*, ocp), e em rotação no seio da mesma solução. Foram testadas várias velocidades de rotação do eléctrodo, sem se chegar a transferir o eléctrodo para uma solução de limpeza. Fortuitamente descobriu-se que, com um tempo de espera de 180 s, entre medições, e com uma velocidade de rotação de 1000 a 1500 rot min⁻¹, os voltamogramas sucessivos eram totalmente coincidentes entre si (Figura 34). Provavelmente, durante esta etapa de espera criam-se condições para que os produtos resultantes, do varrimento de potencial precedente, sejam removidos da superfície do eléctrodo e que ao mesmo tempo, mais moléculas de CBZ interajam com os centros activos dos

MWCNTs. No final de cada uma destas etapas, atinge-se à partida uma condição idêntica ou muito semelhante, em que a concentração superficial de CBZ no filme de MWCNTs-DHP/GCE alcança um máximo, proporcional à concentração de CBZ na solução. Tempos superiores a 180 s só resultam num dispêndio de tempo, por isso este foi o período de tempo adoptado em toda a análise voltamétrica.

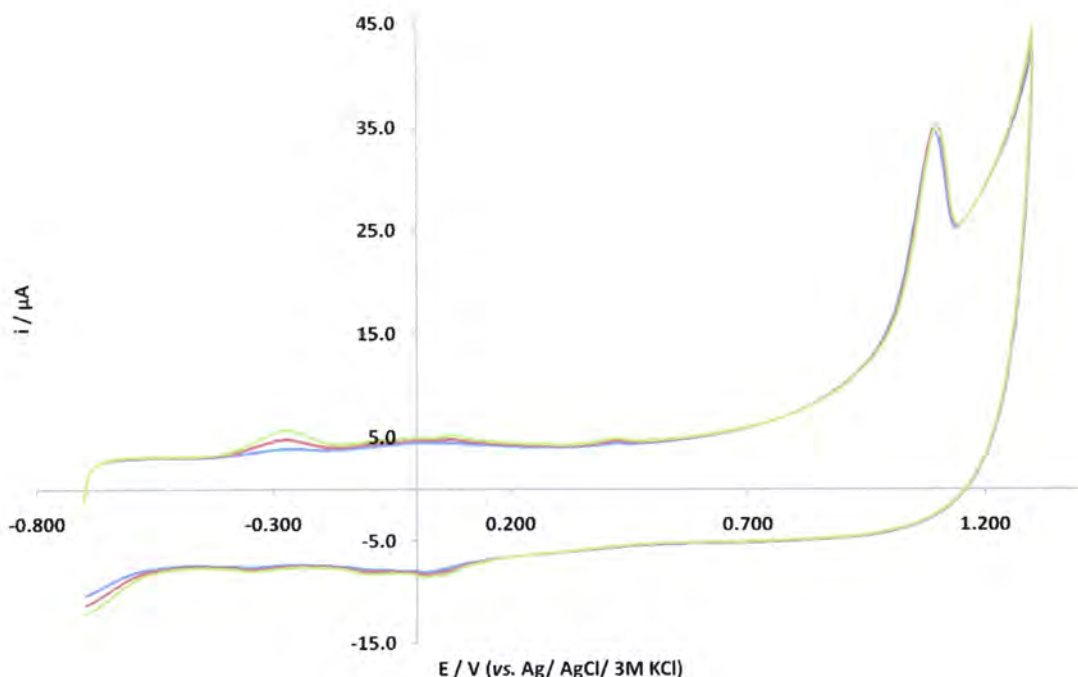


Figura 34 - Três voltamogramas cíclicos sucessivos, com um tempo de espera de 180 s, entre medições, a uma velocidade de rotação de 1000 a 1500 rot min⁻¹.

3. 2. 1. 2. VOLTAMETRIAS DE IMPULSO: VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA E VOLTAMETRIA DE IMPULSO DIFERENCIAL

Devido à elevada sensibilidade, que se associa à voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de impulso diferencial (DPV), estas duas técnicas também foram usadas para estudar o comportamento anódico da carbamazepina no eléctrodo de MWCNTs-DHP/GCE. Os principais resultados, obtidos através da SWV e DPV, são apresentados nas Figuras 35 e 36, respectivamente. Conforme se pode verificar nos

respectivos voltamogramas, o fenómeno de oxidação da CBZ, associado ao pico mais anódico (P_5) do voltamograma cíclico, não é observável nos voltamogramas de SWV, enquanto nos voltamogramas de DPV só é visível um pico bem definido, para concentrações mais elevadas.

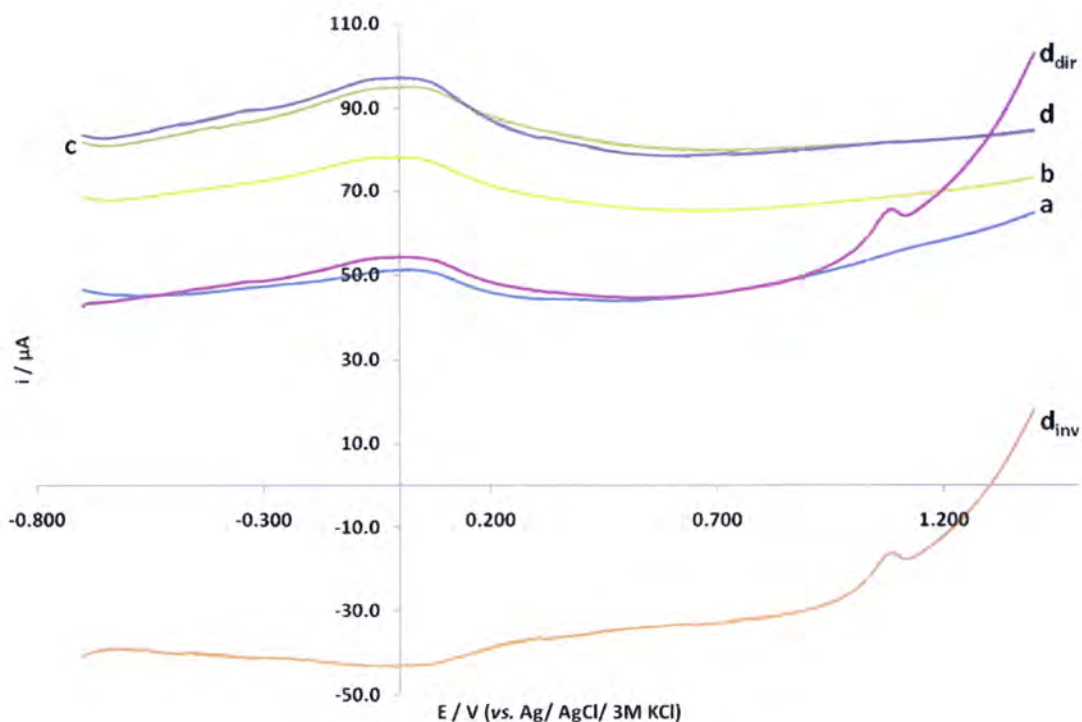


Figura 35 - Voltamogramas de onda quadrada da CBZ, obtidos com um eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 10 μL de suspensão MWCNTs-DHP, no tampão fosfato 0.1 M pH 7. [CBZ]: (a) 0, (b) 0.667, (c) 1.333 e (d) 2.667 μM . Os voltamogramas (d_{dir}) e (d_{inv}) representam as respectivas componentes directa e a inversa do voltamograma (d). $E_i = -0.700$ V; $f = 100$ Hz; $\Delta E_p = 19.95$ mV; $\Delta E_s = 1.2$ mV; $t_{\text{eq}} = 15$ s.

No caso particular da SWV, o facto de não se observar qualquer pico de oxidação no voltamograma de corrente total, não quer dizer que este processo não ocorre. Como se pode ver em detalhe na Figura 35, os voltamogramas que representam a componente directa e a respectiva componente inversa da intensidade de corrente, revelam ambas um pico ao mesmo valor de potencial. Estes possuem uma altura muito semelhante e variação de intensidade de corrente no sentido positivo. Neste caso, a diferença entre as duas componentes de corrente nesta região de potencial, ΔI , traduz-se num valor não nulo, mas constante. Por isso não se observa

um pico de corrente no voltamograma total. Considerando que as medições foram realizadas a uma frequência de 100 Hz, e que por isso o período de tempo entre a medição de corrente directa e inversa é de 10 ms, pode interpretar-se o aparecimento de um pico de corrente inversa idêntico ao pico de corrente directa, como sendo devido à oxidação irreversível e continuada da CBZ. Além de não haver qualquer redução a este valor de potencial, 10 ms após se dar a oxidação de CBZ continua a haver material oxidável junto do eléctrodo.

No caso particular da DPV, a observação de um pico pouco definido (Figura 36) deve-se ao facto da intensidade de corrente ser medida de um modo um pouco diferente e a uma velocidade mais baixa (4.8 mV s^{-1}). Sobretudo, devido ao facto do período de modulação (tempo entre medição de corrente no fim do impulso e medição antes do impulso) ser maior (50 ms), bem como o intervalo de tempo entre impulsos consecutivos (250 ms). Numa região de potencial em que o processo de oxidação da CBZ ocorre favoravelmente, e por isso há consumo de espécies junto do eléctrodo, implica que mais espécies tenham que difundir para junto do mesmo. Com os intervalos de tempo acima referidos, é admissível que a fracção de espécies oxidáveis nas regiões adjacentes ao eléctrodo seja menor, e por isso a taxa de transferência de carga electrónica (a intensidade de corrente) seja também mais pequena. Comparando a componente de corrente obtida após a aplicação do impulso com a componente de corrente obtida antes da aplicação do impulso (Figura 20), observa-se que os respectivos picos (em torno de 1.000 V) não são idênticos em altura, e por isso o seu diferencial não assume um valor constante. Daí o pico no voltamograma de corrente total.

Alterando as condições voltamétricas, em ambas as voltametrias, não se observa qualquer alteração significativa em relação aos resultados já reportados. Deste modo, foi considerado que estas duas voltametrias eram inviáveis para fins de análise quantitativa da CBZ, utilizando o eléctrodo de MWCNTs-DHP/GCE.

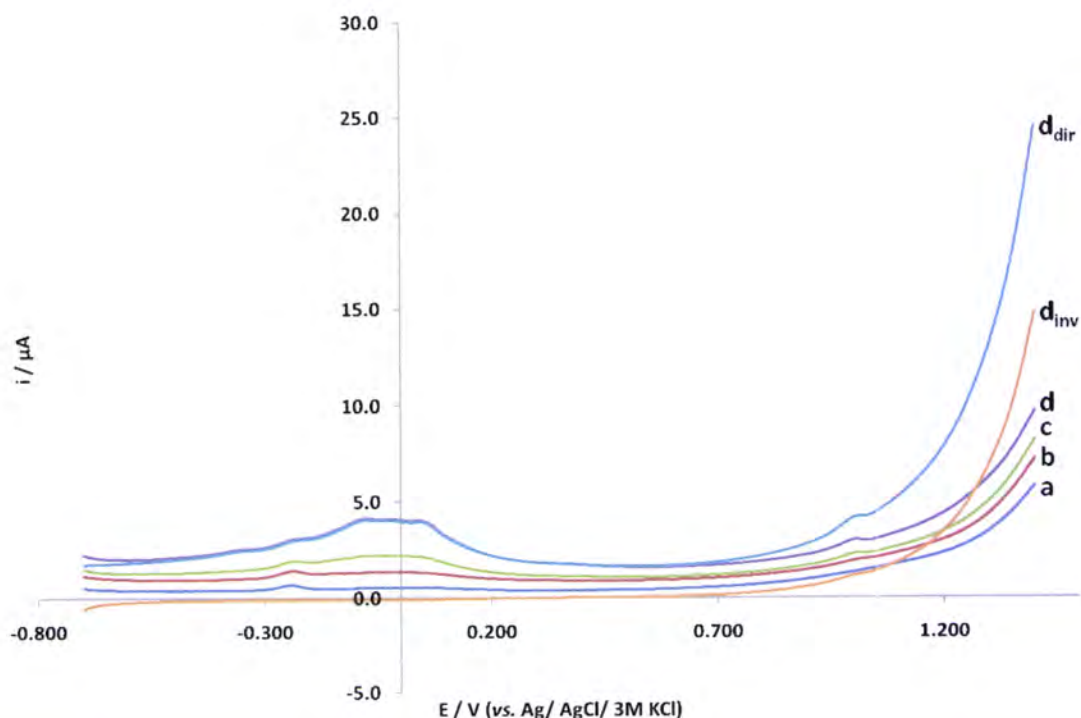


Figura 36 - Voltamogramas de impulso diferencial da CBZ, obtidos com um eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 10 μL de suspensão MWCNTs-DHP, no tampão fosfato 0.1 M pH 7. [CBZ]: (a) 0, (b) 0.667, (c) 1.333 e (d) 2.667 μM . Os voltamogramas (d_{dir}) e (d_{inv}) representam as respectivas componentes directa e a inversa do voltamograma (d). $E_i = -0.700$ V; $t_p = 50$ ms; $t_s = 250$ ms $\Delta E_p = 30$ mV; $\Delta E_s = 1.2$ mV; $t_{\text{eq}} = 15$ s.

3. 2. 2. ESTUDO DE VARIÁVEIS ELECTROANALÍTICAS QUE INFLUENCIAM A RESPOSTA DA CARBAMAZEPINA NO ELÉCTRODO MWCNTs-DHP/GCE

Neste estudo utilizou-se apenas a voltametria cíclica, dada a ineficácia da voltametria de onda quadrada e da voltametria de impulso diferencial.

3. 2 .2. 1. EFEITO DA PRESENÇA DO SOLVENTE HIDROFÓBICO DHP

De modo a averiguar como é que a resposta da CBZ, no eléctrodo de carbono vítreo modificado com um filme de MWCNTs-DHP, é afectada pela presença do solvente (DHP, dihexadecilhidrogenofosfato) utilizado para preparar a suspensão de MWCNTs, também se utilizou um eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma

gota de suspensão de apenas DHP. Os resultados experimentais encontram-se representados na Figura 37. As condições experimentais usadas foram as mesmas daquelas que se utilizaram com os MWCNTs. Conforme se pode observar na Figura 37, o pico de oxidação da CBZ praticamente desaparece, no eléctrodo de carbono modificado com um filme de DHP. Isto deve-se ao facto de o DHP bloquear a transferência de massa e de electrões da CBZ com a superfície do GCE. Para suspensões preparadas com quantidades inferiores de DHP, a resposta anódica da CBZ não é tão afectada, mas pode comprometer as propriedades físico-químicas da suspensão de MWCNTs que se queira preparar. A suspensão com as partículas dos MWCNTs não é tão fácil de homogeneizar, fazendo com que os filmes formados na superfície do GCE sejam pouco consistentes e reprodutíveis.

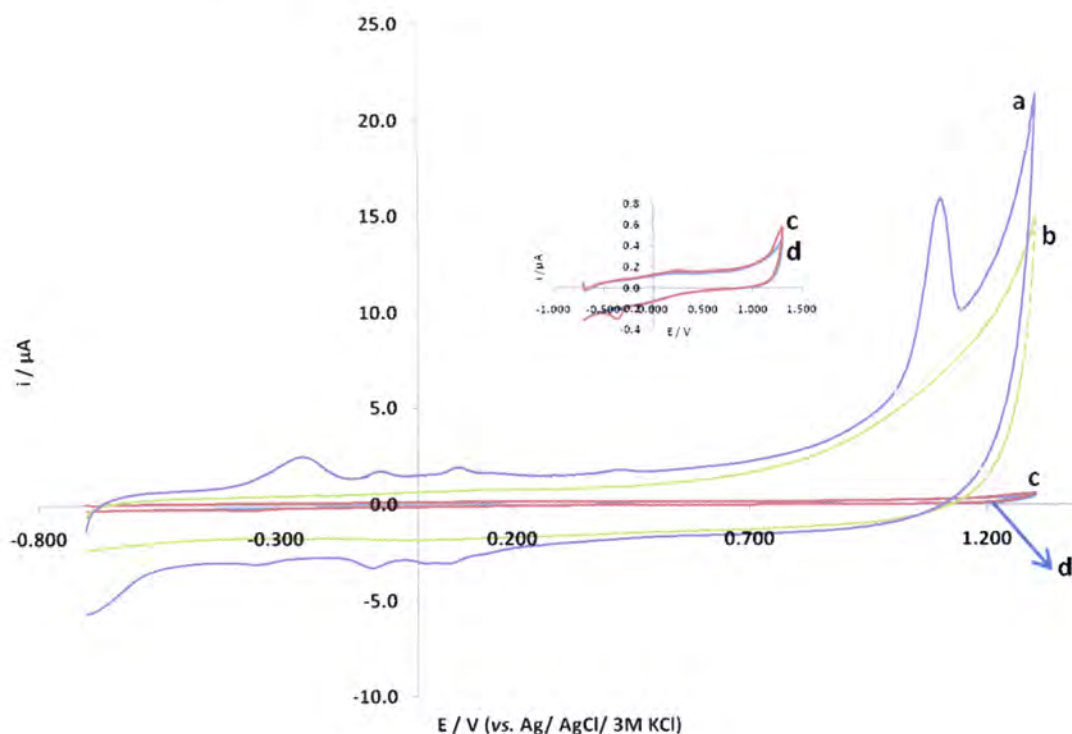


Figura 37 - Voltamogramas cíclicos de 6.0 μM CBZ num eléctrodo de carbono vitreo modificado com uma gota de 8 μL de suspensão de (a) MWCNTs-DHP e (c) DHP, no tampão fosfato 0.1 M pH \sim 7. Os voltamogramas (b) e (d) representam os voltamogramas do electrólito de suporte, nos respectivos eléctrodos. $E_i = -0.700$ V; $v = 0.100$ V s^{-1} .

3. 2. 2. 2. EFEITO DA VELOCIDADE DE VARRIMENTO

A relação entre a velocidade de varrimento e a intensidade da corrente de pico pode fornecer informações muito importantes acerca do mecanismo electroquímico, subjacente ao processo em estudo. Assim sendo, efectuou-se o estudo do comportamento electroquímico da CBZ no intervalo de velocidades de varrimento entre 0.025 V s^{-1} e 0.300 V s^{-1} (Figura 38) Este estudo foi feito a uma concentração de CBZ de $6.0 \mu\text{M}$, usando como electrólito de suporte, o tampão fosfato 0.1 M $\text{pH} \sim 7$.

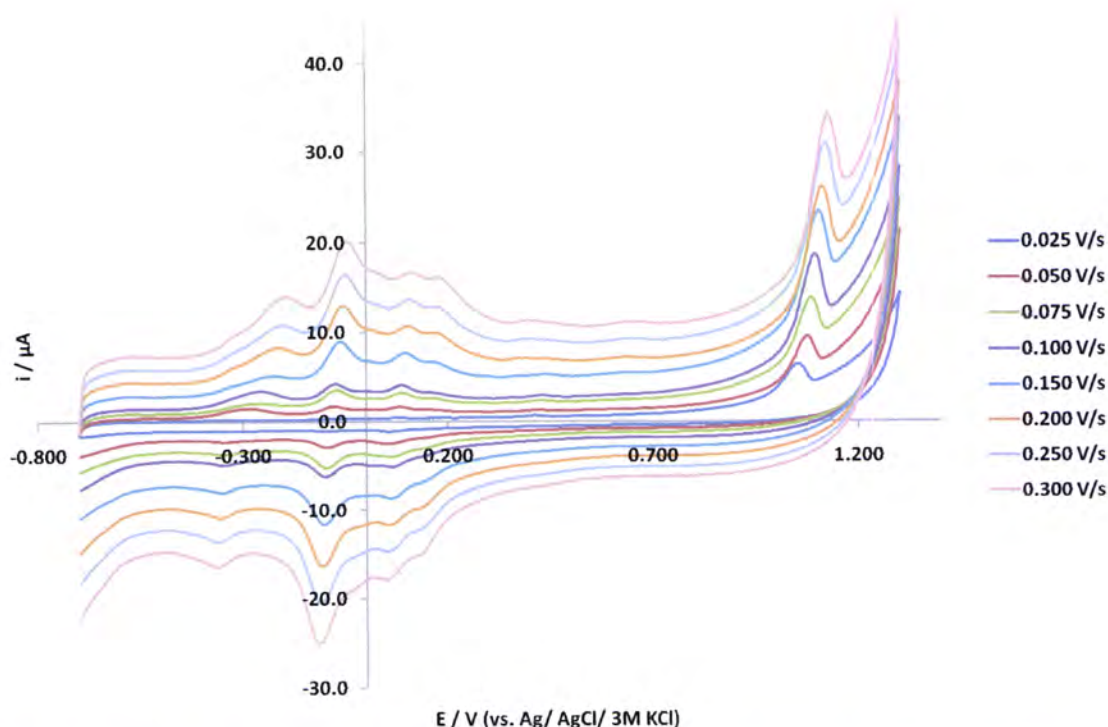


Figura 38 - Efeito da velocidade de varrimento, no intervalo de velocidades entre 0.025 e 0.300 V s^{-1} , nos voltamogramas cíclicos de $6.0 \mu\text{M}$ CBZ, obtidos com o eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de $8 \mu\text{L}$ de suspensão MWCNTs-DHP, no tampão fosfato 0.1 M $\text{pH} 7$.

Como se pode observar nesta figura, a altura do pico anódico (P_5) em estudo, bem como a dos outros picos, aumenta com a velocidade de varrimento. Além disso, o respectivo potencial de pico, E_p , desloca-se no sentido de potenciais mais positivos, como aliás é típico de processos irreversíveis.

Representando graficamente, i_p em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento, $v^{1/2}$, (Figura 39), observa-se uma relação linear entre i_p e $v^{1/2}$, que é

traduzida pela equação: $i_p = 28.061 v^{1/2} - 1.6687$ com um coeficiente de determinação: $R^2 = 0.9909$. Esta relação linear indica que o processo anódico que ocorre no eléctrodo é principalmente controlado por um passo de difusão e não por adsorção. No presente caso, não se observa uma relação linear entre i_p e v , característica de processos de transferência electrónica que são controlados essencialmente pela adsorção das espécies electroactivas (Gosser Jr., 1993; Southampton Electrochemistry Group, 1985).

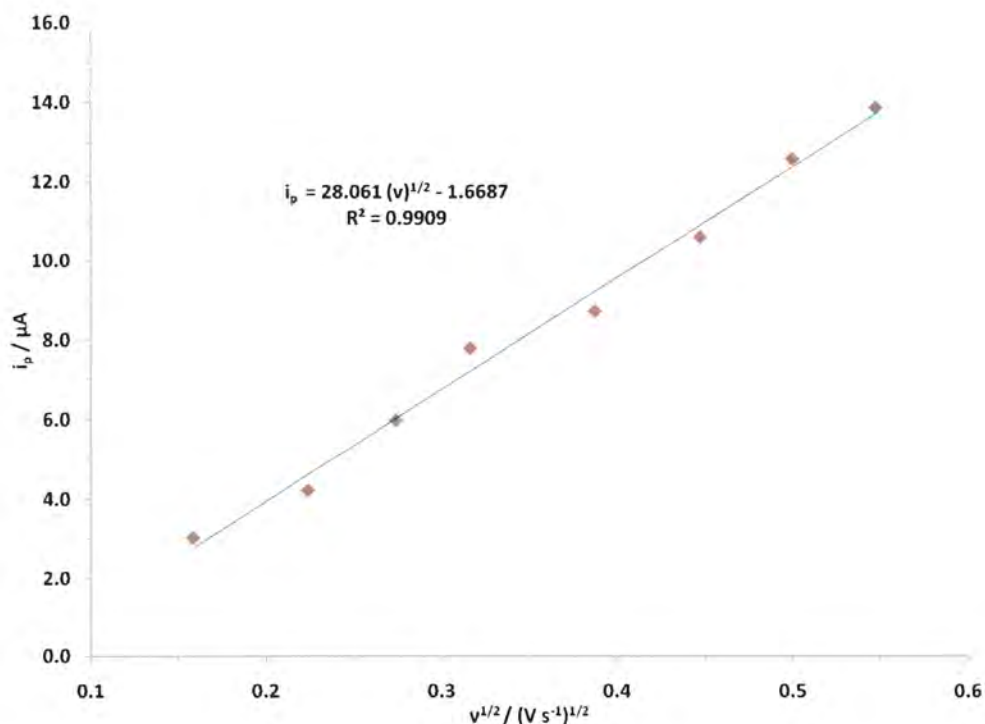


Figura 39 - Intensidade de corrente do pico anódico P_5 da CBZ, em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento. Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 38.

No entanto, a recta que traduz a relação entre i_p e $v^{1/2}$ não intercepta o eixo Y na posição zero. Este facto sugere que o processo de transferência de electrões não é controlado somente pela difusão das espécies electroactivas. Eventualmente, fenómenos de adsorção e/ou de interacção com os centros activos dos MWCNTs podem estar envolvidos, no processo de eléctrodo. Na tentativa de comprovar a presença destes efeitos de superfície, construiu-se o gráfico $\log i_p$ versus $\log v$ (Figura 40). De acordo com este, observa-se uma relação linear entre $\log i_p$ e $\log v$, que é traduzida pela equação: $\log i_p = 0.6219 \log v - 4.5309$ com um $R^2 = 0.9903$. O declive,

com o valor de 0.6219, sugere que a oxidação da CBZ procede por um mecanismo misto (Gosser Jr., 1993; Southampton Electrochemistry Group, 1985), controlado pela difusão das espécies até a superfície do eléctrodo, e influenciado pela adsorção e/ou interações com os centros activos dos MWCNTs. Recorde-se que para processos redox, controlados apenas por difusão, o valor do declive da relação $\log i_p$ versus $\log v$ assume um valor de 0.5, enquanto em processos controlados pela adsorção, o valor deste declive tende para a unidade.

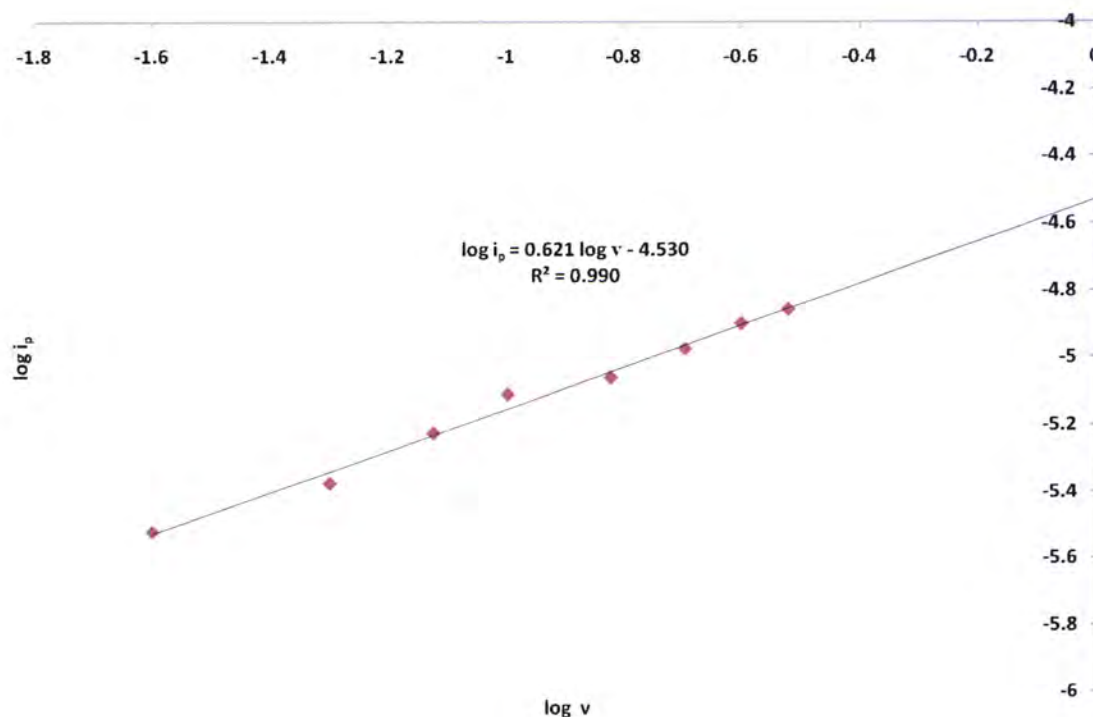


Figura 40 - Relação log-log da intensidade de corrente do pico anódico P_5 da CBZ, em função da velocidade de varrimento. Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 38.

Relativamente à dependência do potencial do pico de oxidação (E_p) da velocidade de varrimento, como já foi referido, verifica-se ser idêntica àquela que caracteriza processos irreversíveis. Com o aumento da velocidade de varrimento, o potencial do pico P_5 desloca-se para valores mais positivos, denunciando limitações de transferência electrónica a velocidades mais elevadas. Neste caso espera-se uma relação semi-logaritmica linear entre o potencial do pico de oxidação e a velocidade de

varrimento. Como se pode comprovar na figura 41, esta relação é obedecida para o processo anódico estudado.

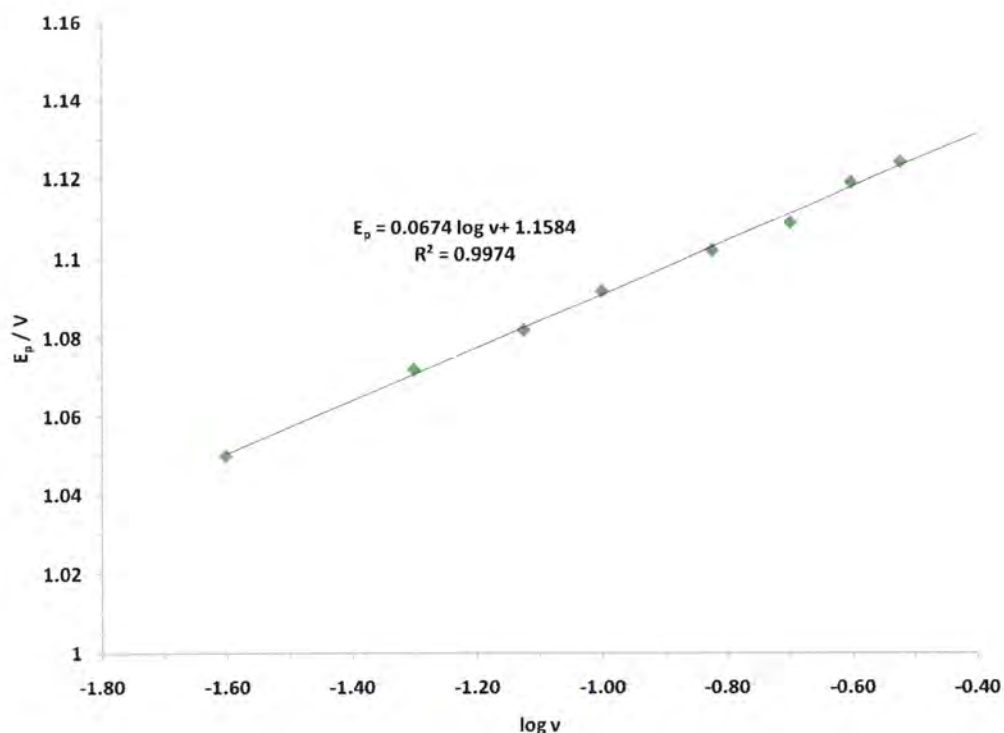


Figura 41 - Relação semi-log do potencial do pico anódico P_5 da CBZ, em função da velocidade de varrimento. Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 38.

3. 2. 2. 3. EFEITO DO TEMPO E POTENCIAL DE EQUILÍBRIO

O efeito da variação do tempo e do potencial de equilíbrio, no pico de oxidação de 6.0 μM de CBZ, foram estudados no sentido de averiguar se era possível aumentar a altura deste, dadas as vantagens analíticas que daí podiam resultar.

Efectuou-se o estudo do tempo de equilíbrio no intervalo de tempo entre 1 e 300 segundos (Figura 42). Verificou-se que o tempo de acumulação afecta muito pouco a corrente do pico de oxidação, dando-se um aumento relativo do pico até aos 240 segundos, havendo de seguida um decréscimo até aos 300 segundos. O ligeiro aumento da corrente de pico, devido possivelmente à acumulação ao longo do tempo de mais CBZ junto do filme do eléctrodo, não justifica a utilização em análise de uma etapa de equilíbrio tão demorada. Por isso manteve-se, nas determinações seguintes,

um valor de 15 s, como tempo de equilíbrio. Recorde-se que o período de tempo, que condiciona mais o valor da intensidade de corrente do pico e a repetibilidade nas medições é o período de tempo de 3 minutos, com rotação do eléctrodo, a um potencial de circuito aberto (*open circuit potential*, ocp).

O potencial inicial, outra das variáveis que pode influenciar a resposta voltamétrica do analito, foi avaliado no intervalo de potencial entre -0.700 V e 0.700 V. Os resultados experimentais deste estudo são apresentados na Figura 43. A corrente do pico de oxidação da CBZ apresenta o seu máximo entre -0.700 V e -0.500 V. Avançando para valores de potencial mais positivos, ocorre um decréscimo gradual da intensidade da corrente do pico de oxidação P_5 da CBZ. Deste modo, para não comprometer o valor do sinal analítico nas determinações seguintes, manteve-se o valor de potencial inicial em -0.700 V.

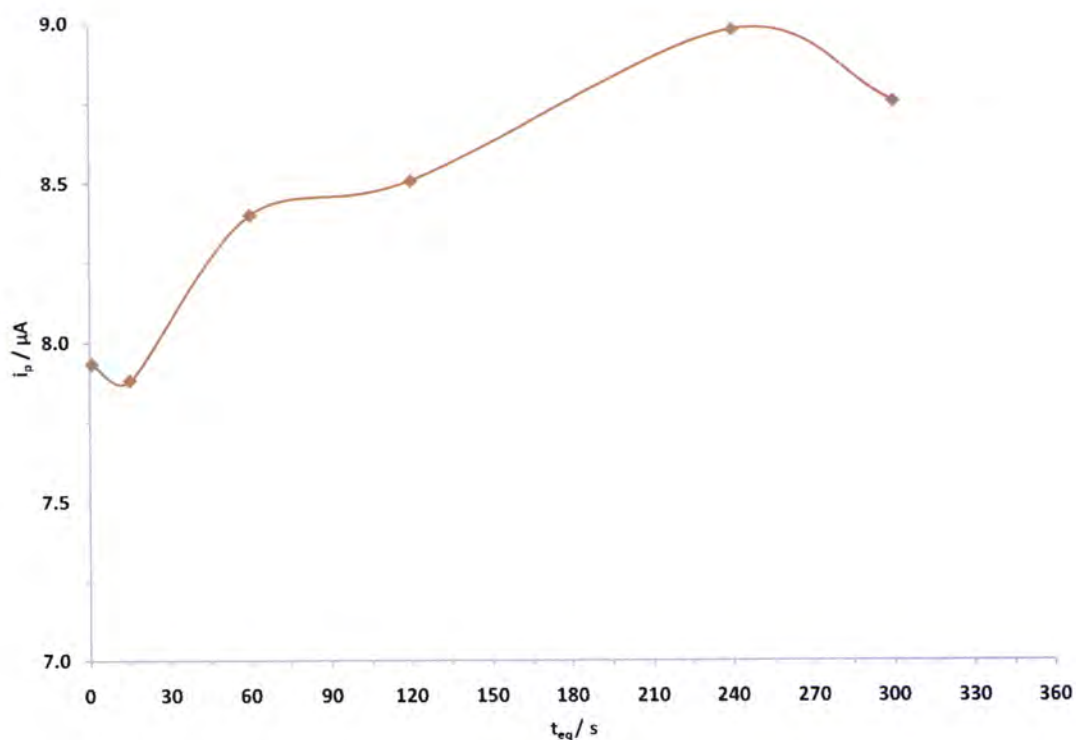


Figura 42 - Estudo do efeito do tempo de equilíbrio na intensidade da corrente de pico P_5 da carbamazepina. $E_i = -0.700 V$; $v = 0.100 V s^{-1}$.

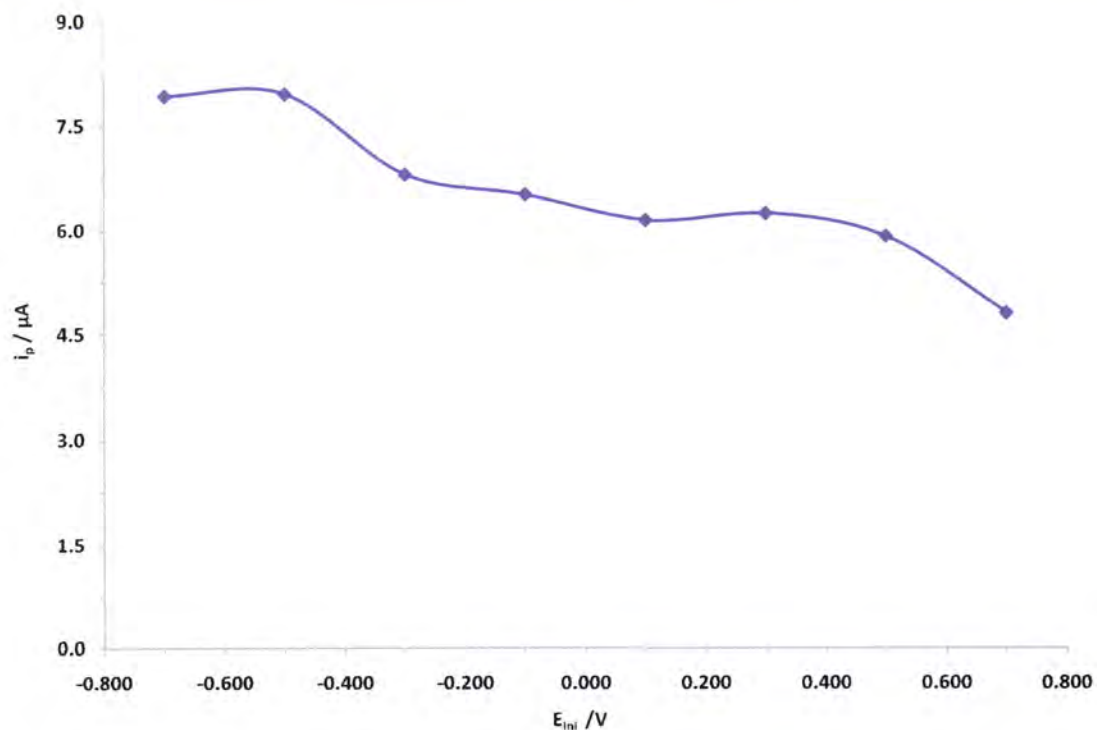


Figura 43 - Estudo do efeito do potencial inicial na intensidade da corrente de pico P_3 da carbamazepina. $t_{eq} = 15$ s; $v = 0.100$ V s^{-1} .

3. 2. 2. 4. INFLUÊNCIA DO PH

A influência do pH da solução, na oxidação da CBZ foi investigada por voltametria cíclica no intervalo de pH entre 2.18 e 11.75. Na figura 44 apresentam-se os voltamogramas cíclicos de $6.0 \mu M$ de CBZ no tampão fosfato 0.1 M, a três valores de pH diferentes (3.01, 6.89 e 11.27). A partir desta figura é possível observar que a intensidade de corrente do pico P_5 é maior a pH neutro, do que a valores de pH mais extremos. Além disso, observa-se uma tendência para o potencial de pico P_5 , se deslocar para potenciais tanto menos positivos, quanto mais alcalina é a solução. Esta tendência indica que a oxidação é favorecida a pH alcalino, apesar da quantidade de material oxidável disponível poder parecer menor, dado que a intensidade de corrente do pico é também menor.

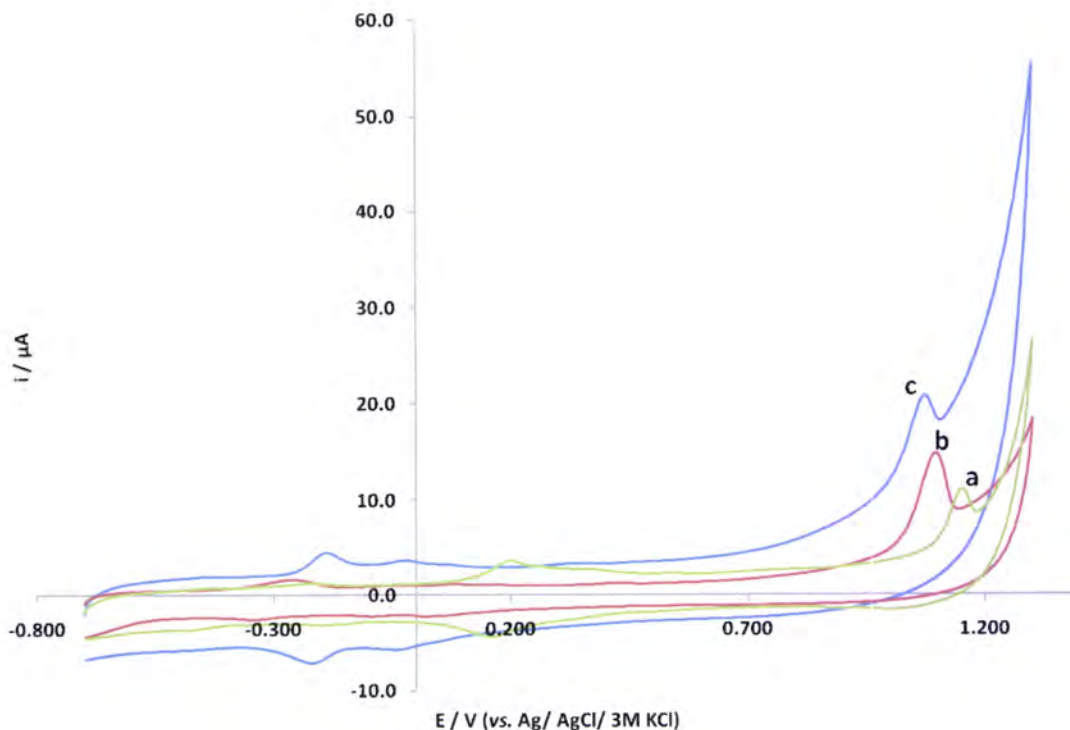


Figura 44 - Efeito do pH da solução de electrólito de suporte no comportamento electroquímico da CBZ, num eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 8 μL de suspensão MWCNTs-DHP. [CBZ] = 6.0 μM . pH: (a) 3.01, (b) 6.89, e (c) 11.27.

Na figura 45 apresenta-se resumidamente a dependência do potencial de pico, E_p e intensidade de corrente de pico, i_p , em função do pH. Desta figura destaca-se uma informação excepcional. No intervalo de pH entre 5.14 e 7.25, o potencial do pico de oxidação varia negativa e linearmente com o aumento do pH da solução de acordo com a seguinte equação: $E_p = -0.0279 \text{ pH} + 1.2873$ com um $R^2 = 0.9942$. O valor do declive desta relação sugere que, neste intervalo de pH, o número de prótons envolvido na oxidação da CBZ é metade do número de electrões (Kissinger e Heineman, 1996), que a própria CBZ transfere para o eléctrodo.

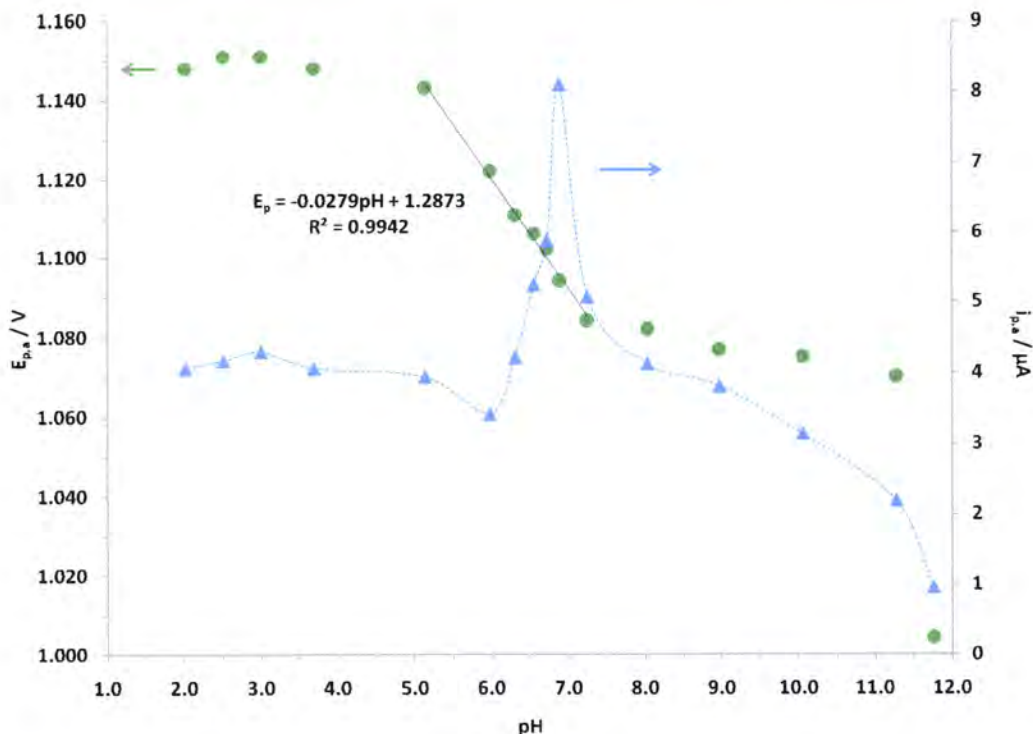


Figura 45 - Efeito do pH na intensidade de corrente de pico (i_p) e no potencial do pico de oxidação (E_p) de CBZ. Condições experimentais idênticas às da Figura 44, para todos os valores de pH estudados.

Relativamente à importância do pico anódico P_5 , na análise quantitativa da CBZ, pode concluir-se que as condições de pH neutro são as mais apropriadas, dado que a altura do pico é maior nestas condições.

3. 2. 2. 5. EFEITO DA QUANTIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS NO FILME MODIFICADOR

Uma vez que já se verificou que os MWCNTs são os responsáveis pelo aumento da resposta voltamétrica da CBZ, num eléctrodo de carbono vítreo modificado com um filme de MWCNTs-DHP, torna-se válido assumir que a quantidade de MWCNTs pode afectar o pico de oxidação da CBZ. Assim, a relação entre a corrente do pico de oxidação P_5 e a quantidade de MWCNTs no filme de MWCNTs-DHP foi também avaliada por voltametria cíclica. Foram testados vários volumes de gota de suspensão MWCNTs-DHP: 2, 4, 6, 8, 10 e 12 μL , a três velocidades de varrimento: 0.025, 0.100 e

0.300 V s^{-1} . Os resultados encontram-se representados na figura 46. Observou-se que a corrente de pico aumenta em regra, com o aumento da quantidade de dispersão de MWCNTs-DHP, até o volume de $10 \mu\text{L}$. Com base nestes resultados, $10 \mu\text{L}$ de uma suspensão de 1 mg mL^{-1} de MWCNTs-DHP foi considerada a quantidade mais adequada para formar o filme de MWCNTs-DHP na superfície do eléctrodo de carbono vítreo. Para volumes de suspensão superiores a $10 \mu\text{L}$ verificou-se ainda, que o filme se formava fora dos limites do disco de carbono vítreo, de um modo pouco reprodutível. Na figura 47 apresentam-se os voltamogramas cíclicos da CBZ, obtidos com um volume de gota de $10 \mu\text{L}$, a três velocidades de varrimento: 0.025 , 0.100 e 0.300 V s^{-1} . Nesta figura pode observar-se que, independentemente da velocidade de varrimento, um volume de $10 \mu\text{L}$ garante que o valor do pico de corrente obtido tende a ser máximo.

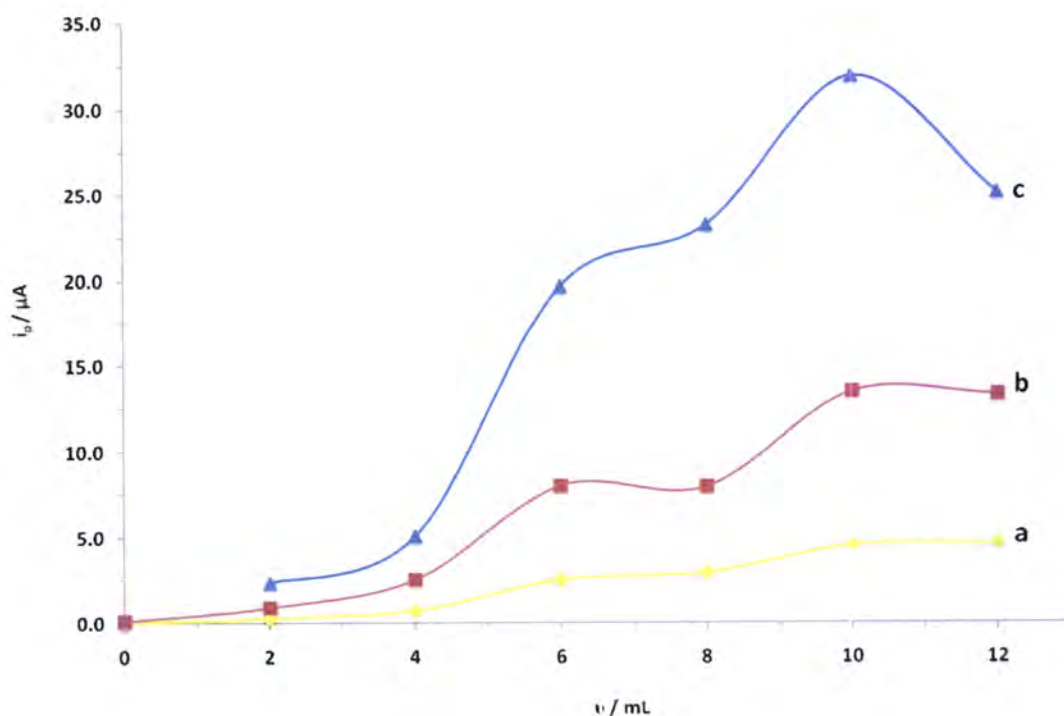


Figura 46 - Intensidades de corrente do pico P_5 , em função do volume de suspensão MWCNTs-DHP: 2, 4, 6, 8, 10 e $12 \mu\text{L}$, a três velocidades de varrimento: (a) 0.025 , (b) 0.100 , e (c) 0.300 V s^{-1} . $[\text{CBZ}] = 6.0 \mu\text{M}$.



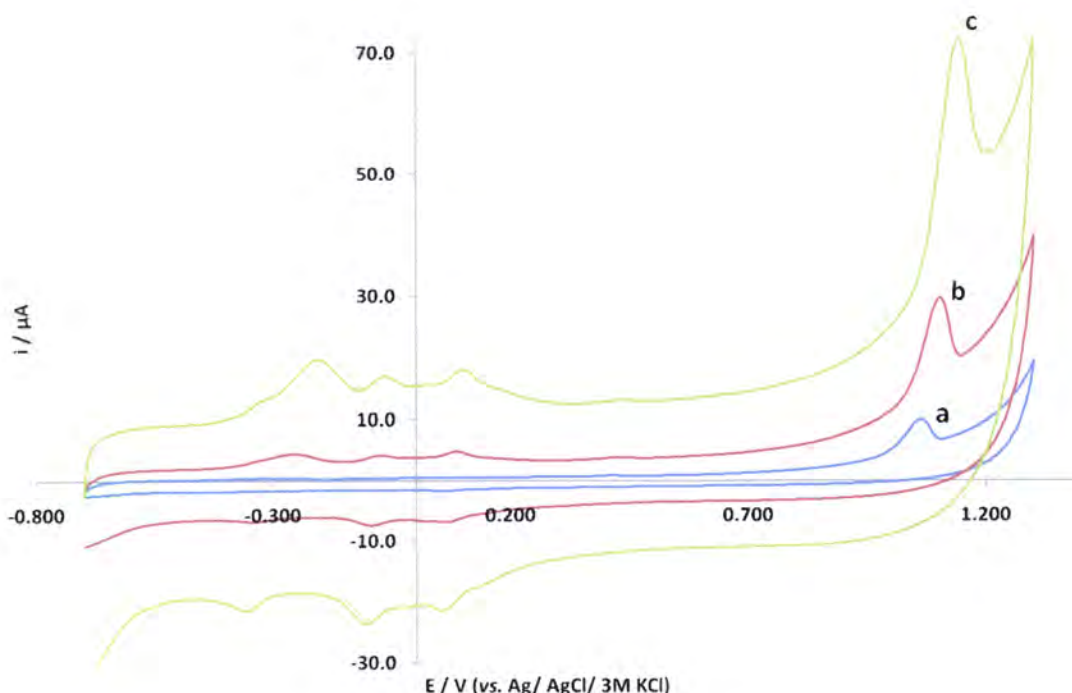


Figura 47 - Voltamogramas cíclicos de 6,0 μM CBZ, obtidos com o electrodo de carbono vítreo modificado com uma gota de 10 μL de suspensão MWCNTs-DHP, no tampão fosfato 0,1M pH 7, $E_r = -0,700$ V; $v / \text{V s}^{-1}$: (a) 0,025, (b) 0,100, e (c) 0,300.

3. 2. 2. 6. INFLUÊNCIA DO ELECTRÓLITO DE SUPORTE

O electrólito de suporte, tem como função minimizar o fenómeno da migração dos iões electroactivos, causada pelo campo eléctrico e contribuir para a diferença de potencial interfacial à distância de maior aproximação de iões solvatados ao eléctrodo. Na prática, a adição de um electrólito de suporte à solução consiste na adição de uma concentração elevada de um electrólito inerte, do ponto de vista electroquímico e químico. Relativamente à concentração do electrólito de suporte, esta deve ser pelo menos cem vezes mais concentrada do que as espécies electroactivas, de modo a garantir que o número de transporte destas seja mínimo. Vulgarmente a concentração de electrólito de suporte varia entre 0,01 M e 1,0 M, sendo que a concentração das espécies electroactivas pode variar de 5 mM a valores da ordem dos nM. Para escolher um electrólito de suporte devem ser considerados alguns factores, como a solubilidade no solvente empregue, a inércia redox dos iões formados na janela de potencial considerada e a inércia química com a espécie em análise (Kissinger e Heineman,

1996). Este electrólito pode ser um sal inorgânico ou orgânico, um ácido ou uma base, ou ainda uma solução tampão como acetato, citrato ou fosfato (Wang, 2006).

O tipo de electrólito é um factor chave que pode afectar as propriedades electroquímicas dos MWCNTs, assim como a sensibilidade da determinação voltamétrica da CBZ. Para avaliar a influência do electrólito de suporte na resposta electroquímica da CBZ foram testados, por voltametria cíclica, três electrólitos de suporte: tampão fosfato 0.1 M pH 7; tampão acetato 0.1 M pH 4.7; tampão amónio 0.1 M pH 11, construindo três curvas de calibração, em que [CBZ] varia entre 0.13 μM e 4.27 μM . Usou-se para o efeito, um eléctrodo modificado com 10 μL de suspensão de MWCNTs–DHP, e uma velocidade de varrimento de 0.100 V/s. Os voltamogramas cíclicos, obtidos nos dois novos meios estudados são igualmente complexos (resultados não mostrados), mas nestes também se observa um pico a potenciais mais anódicos, tal como no tampão fosfato (o pico P_5). Tendo em conta as pequenas diferenças observadas nos potenciais de pico, pode afirmar-se que este processo anódico da CBZ é o mesmo nos três electrólitos. No entanto, as diferenças observadas na intensidade de corrente dos picos, sugerem que a natureza dos iões presentes tem influência no processo de oxidação da CBZ no eléctrodo modificado. Na Figura 48, apresenta-se a intensidade de corrente do pico mais anódico da CBZ em função da sua concentração, para cada um dos electrólitos estudados. Conforme se pode observar através dos valores de R^2 das rectas, a linearidade entre i_p e [CBZ] é superior no tampão fosfato, confirmando que a sua escolha é a mais adequada, quando se trata de utilizar o pico P_5 como sinal na análise quantitativa da CBZ.

Nos voltamogramas cíclicos, obtidos no tampão acetato, observou-se que existem outros picos, tanto de oxidação como de redução, que podem ser potencialmente úteis para quantificar voltametricamente a CBZ. No entanto não são aqui estudados.

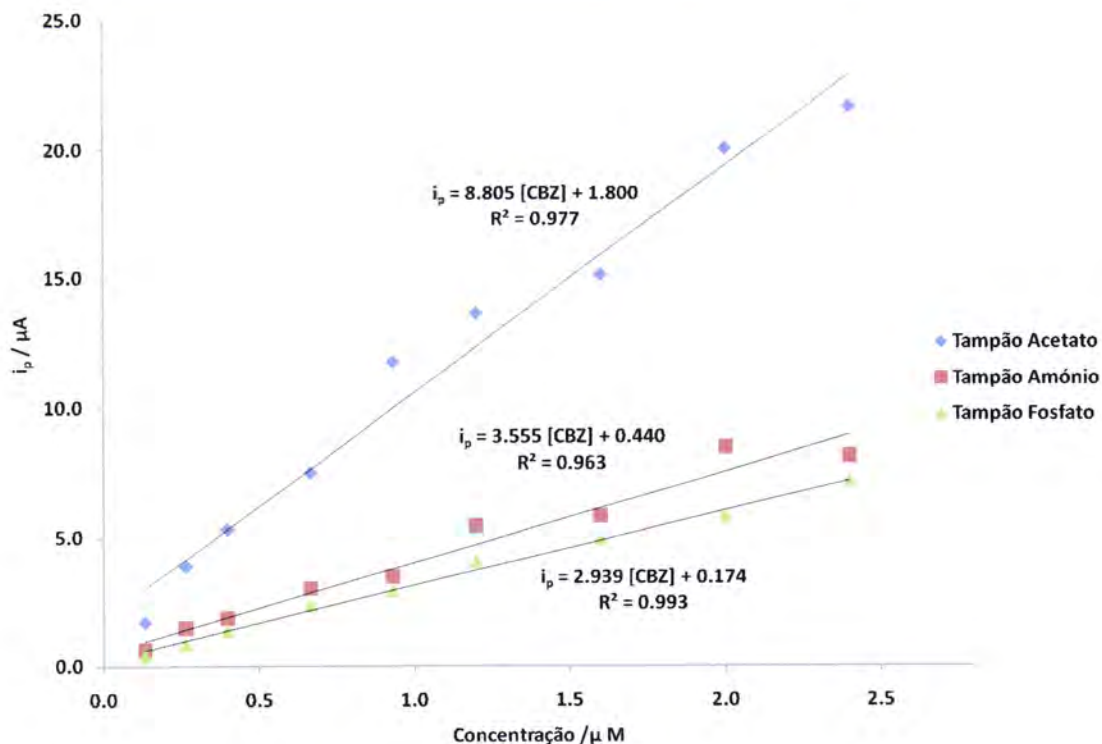


Figura 48 - Relações entre a intensidade de corrente do pico mais anódico da CBZ e a concentração desta, obtidas em 3 electrolitos de suporte: tampão fosfato 0.1 M pH 7; tampão acetato 0.1 M pH 4.7; tampão amônio 0.1M pH 11. Usou-se uma gota de 10 μL de suspensão de MWCNTs-DHP e $v=0.100 \text{ Vs}^{-1}$.

3. 2. 2. 7. INFLUÊNCIA DE POTENCIAIS INTERFERENTES

Foi estudado o efeito de potenciais interferentes na resposta voltamétrica da carbamazepina. Os interferentes escolhidos para este estudo foram o atenolol, o diclofenac de sódio, o ibuprofeno, o ácido clofibrico e a oxcarbazepina, uma vez que estes fármacos são frequentemente encontrados, em conjunto com a carbamazepina, no ambiente.

O atenolol (2-(4-(2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi)fenil)acetamida), comercializado como Tenormin[®] entre outros, é um fármaco que pertence ao grupo dos β -bloqueadores, uma classe de fármacos usados principalmente em casos de doenças cardiovasculares e em casos de hipertensão arterial (Hegde *et al.*, 2008).

O ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil) propanóico), comercializado como Brufen[®] e Trifene[®] entre outros, é um fármaco do grupo dos anti-inflamatórios não esteróides (AINE) sendo também analgésico e antipirético, utilizado frequentemente

no alívio sintomático da dor de cabeça (cefaleia), dor dentária, dor muscular (mialgia), dores menstruais, febre e dor pós-cirúrgica. Também é usado para tratar quadros inflamatórios, como é o caso da artrite reumatóide.

O diclofenac de sódio, DFNa, (acetato de 2-(2-(2,6-diclorofenilamino)fenil) sódio), comercializado como Voltaren® e Cataflan® entre outros, é um anti-inflamatório não-esteróide (AINE) com acção sobretudo analgésica e anti-inflamatória, não sendo usado especificamente como antipirético mesmo tendo esta acção (Zhang *et al.*, 2008).

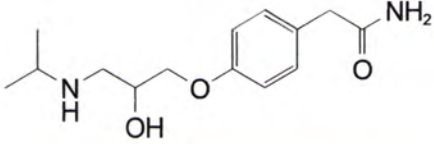
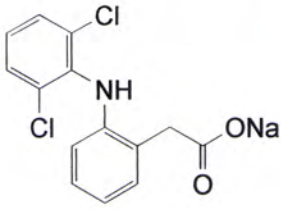
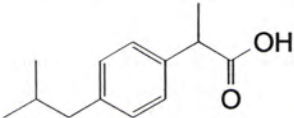
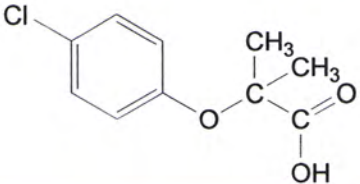
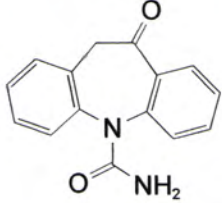
O ácido clofíbrico (ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropanóico), comercializado como Tricerol® entre outros, pertence ao grupo de fármacos denominados fibratos (Komsta *et al.*, 2006). Os fibratos são fármacos usados no tratamento da hipercolesterolemia e na prevenção da arteriosclerose. Estes são derivados do ácido 2-fenoxi-2-metilpropanóico. Reduzem os níveis de triglicerídeos e os níveis da LDL (lipoproteína de baixa densidade, “mau colesterol”), aumentam os níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade, “bom colesterol”) e diminuem a taxa de formação das placas arterioscleróticas nas artérias.

A oxcarbazepina (10,11-Dihidro-10-oxo-5H-dibenz(b,f)azepina-5-carboxamida) é um derivado estrutural da carbamazepina, em que um grupo cetona substitui a dupla ligação C-C no anel da dibenzazepina. A oxcarbazepina, comercializada com o nome de Proaxen® e Trileptal®, é um fármaco indicado para o tratamento de crises epilépticas parciais com ou sem crises tónico-clónicas generalizadas secundariamente e de nevralgias do trigémeo (Calvo *et al.*, 2007).

Este estudo foi realizado usando também a voltametria cíclica. Foi estudado o efeito de potenciais interferentes na resposta voltamétrica de 0.4 μM de CBZ, na razão molar de 1:1. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos entre -0.700 e 1.300 V, no tampão fosfato 0.1 M pH 7, a uma velocidade de varrimento de 0.100 V s^{-1} . Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 9. Estes mostram que o diclofenac de sódio, o ácido clofíbrico e o ibuprofeno, são responsáveis por um aumento da resposta voltamétrica da CBZ, enquanto o atenolol e a oxcarbazepina são responsáveis por uma diminuição dessa resposta. O diclofenac de sódio e o ácido clofíbrico constituem os maiores interferentes.

No caso do diclofenac de sódio, o voltamograma cíclico apresenta, além do pico de oxidação da CBZ a um potencial de 1.099 V, um pico anódico que ocorre a um potencial de 0.640 V, referente à oxidação do diclofenac de sódio. Esta resposta já era esperada, de acordo com o que se encontra descrito na literatura (Yang *et al.*, 2008). Os restantes fármacos não apresentaram qualquer resposta voltamétrica nas condições experimentais usadas.

Tabela 9 - Influência de potenciais interferentes na resposta voltamétrica de 0.4 μM de CBZ, para uma razão molar 1:1.

Interferentes	Varição do Sinal da CBZ (%)
<p>Atenolol</p> 	- 7.8
<p>Diclofenac de sódio</p> 	+ 38.6
<p>Ibuprofeno</p> 	+ 5.3
<p>Ácido clofibrico</p> 	+ 17.2
<p>Oxcarbazepina</p> 	- 8.4

3. 3. QUANTIFICAÇÃO DE CARBAMAZEPINA COM O MWCNTs-DHP/GCE

3. 3. 1. CURVA DE CALIBRAÇÃO

No seguimento dos estudos anteriores, e conforme já foi antecipadamente apresentado (ver ponto 3. 2. 2. 6), estudou-se a relação i_p versus [CBZ], no sentido de saber qual a região de linearidade para a quantificação da CBZ, usando o eléctrodo modificado. Neste estudo utilizou-se a voltametria de varrimento linear, e todas as outras condições analíticas consideradas óptimas, para construir a curva de calibração. Inicialmente, utilizou-se uma velocidade de varrimento de 0.300 V s^{-1} , dado que as intensidades de pico de corrente eram mais elevadas que a velocidades menores. No entanto verificou-se que a linearidade da relação i_p versus [CBZ] não era a melhor. Deste modo optou-se por realizar as medidas a uma velocidade de 0.100 V s^{-1} . As medições voltamétricas, com as diferentes soluções de CBZ, foram todas realizadas na mesma célula, adicionando alíquotas de uma solução padrão de CBZ. Os voltamogramas correspondentemente obtidos, com o sinal analítico de interesse localizado em torno de 1.099 V , apresentam-se na figura 49.

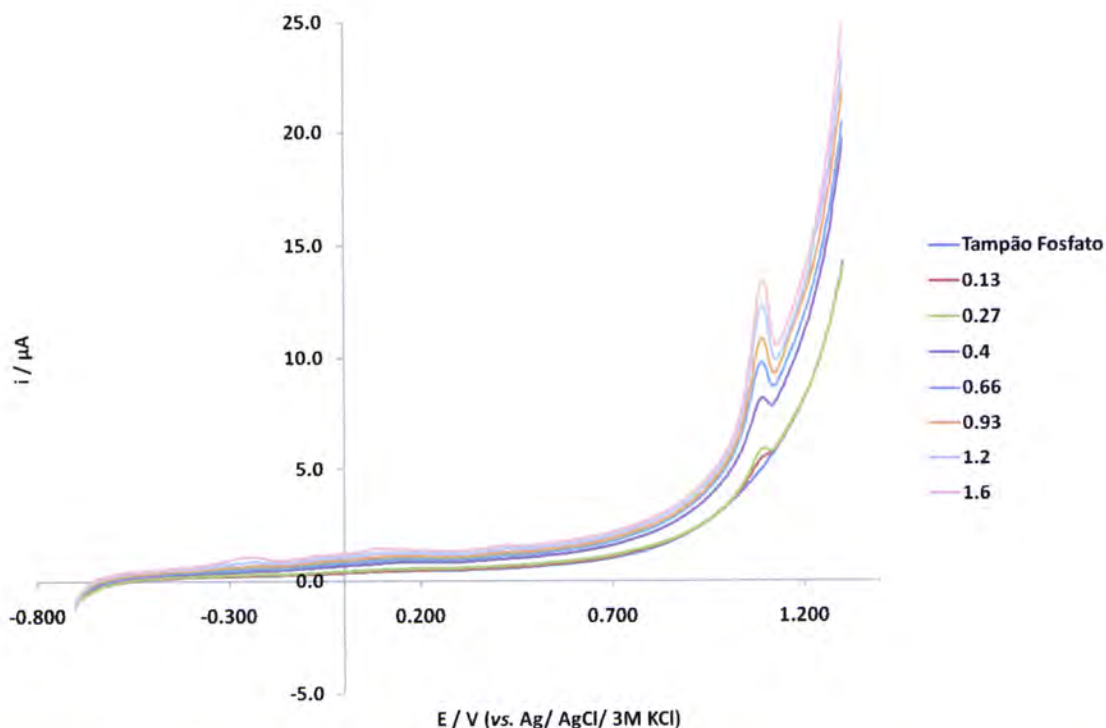


Figura 49 - Voltamogramas de varrimento linear, obtidos com soluções de CBZ com concentração diferente (μM), no tampão fosfato 0.1 M pH 7, a $v = 0.100 \text{ V s}^{-1}$.

Como se pode observar, os voltamogramas de varrimento linear obtidos mostram um aumento da corrente de pico com o aumento da concentração de CBZ na solução. Através do *software* que é usado para controlar o potenciostato, determinou-se em cada voltamograma o valor de intensidade de corrente do pico, i_p . Com estes valores e os respectivos valores de concentração de CBZ, construiu-se a curva de calibração (Figura 50).

A curva obtida apresenta um comportamento linear na gama de concentração 0.13 – 1.60 μM (30.7 - 378 $\mu\text{g L}^{-1}$). A relação entre intensidade de corrente do pico de oxidação e a concentração da CBZ pode ser descrita pela seguinte equação de regressão linear: $i_p (\mu\text{A}) = 2.5898 [\text{CBZ}] (\mu\text{M}) + 0.4718$ com um $R^2 = 0.9963$. A gama de concentração pode estender-se a um valor de 2.40 μM , comprometendo o valor de R^2 (= 0.9935). A partir deste valor de concentração observa-se um desvio negativo da linearidade, devido provavelmente à aproximação de um estado de saturação, dos centros activos dos MWCNTs.

A informação estatística foi obtida a partir de cinco curvas da calibração. O limite de detecção (LOD) e o de quantificação (LOQ) é de 0.04 e 0.14 μM , respectivamente. O LOD e o LOQ foram calculados usando as seguintes equações: $\text{LOD} = 3s/m$ e $\text{LOQ} = 10s/m$, em que o s é o desvio padrão da corrente de pico do branco (5 corridas) e o m é o declive da curva de calibração (Miller e Miller, 2000).

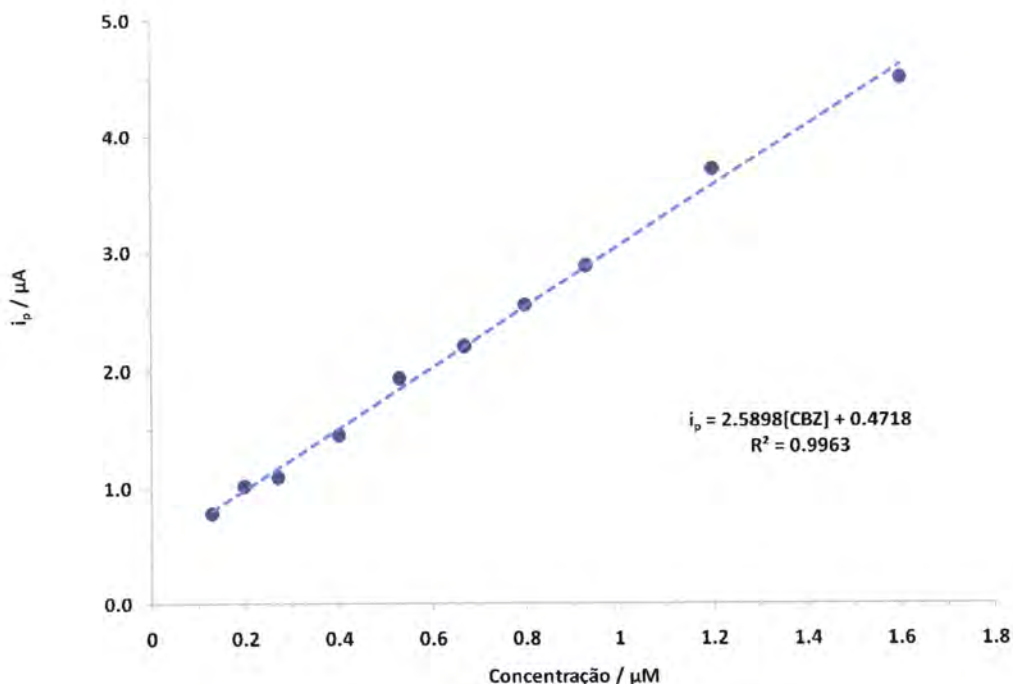


Figura 50 - Curva de calibração da CBZ, no intervalo de concentração 0.13 - 1.60 μM (30.7 - 378 $\mu\text{g L}^{-1}$).

3.3.2. DETERMINAÇÃO DA CARBAMAZEPINA EM AMOSTRAS REAIS

A determinação da carbamazepina em amostras reais foi realizada, usando o método da adição padrão. Conforme já foi referido, este método permite a minimização de efeitos da matriz da amostra, que podem influenciar o valor do sinal analítico, e facilita consideravelmente as medições electroquímicas, dado que todas elas são realizadas sucessivamente na mesma célula (em especial, com o mesmo eléctrodo de trabalho, em condições que permanecem constantes).

De modo a justificar a validade do método voltamétrico e a importância do eléctrodo de trabalho na determinação da CBZ, seleccionaram-se as seguintes

amostras reais: um fármaco, água da torneira dopada com CBZ e uma amostra ambiental, proveniente de uma estação de tratamento de águas residuais domésticas, que foi igualmente dopada.

3.3.2.1. DETERMINAÇÃO DA CARBAMAZEPINA NO FÁRMACO TEGRETOL®

O método proposto foi aplicado na determinação da CBZ, que compõe o fármaco Tegretol®. Uma quantidade rigorosamente conhecida do fármaco foi dissolvida num solvente apropriado, conforme descrito na parte experimental, transferindo-se uma alíquota da solução resultante para a célula electroquímica. Na célula, a concentração correspondente de CBZ era de 0.846 μM . Após sucessivas adições de uma solução padrão de CBZ de 200 μM , detectaram-se 0.851 μM de CBZ (Figura 51), havendo assim uma percentagem de recuperação de 100.6%. Esta percentagem de recuperação indica que a determinação da CBZ, usando um eléctrodo de carbono vítreo modificado com um filme de MWCNTs-DHP nas condições experimentais já referidas, é um método válido e sensível. No caso desta amostra e nas condições experimentais utilizadas, ficou ainda provado que os ingredientes inactivos do fármaco não constituem uma interferência séria nas medições voltamétricas (Novartis Pharmaceuticals Corporation, 2009).

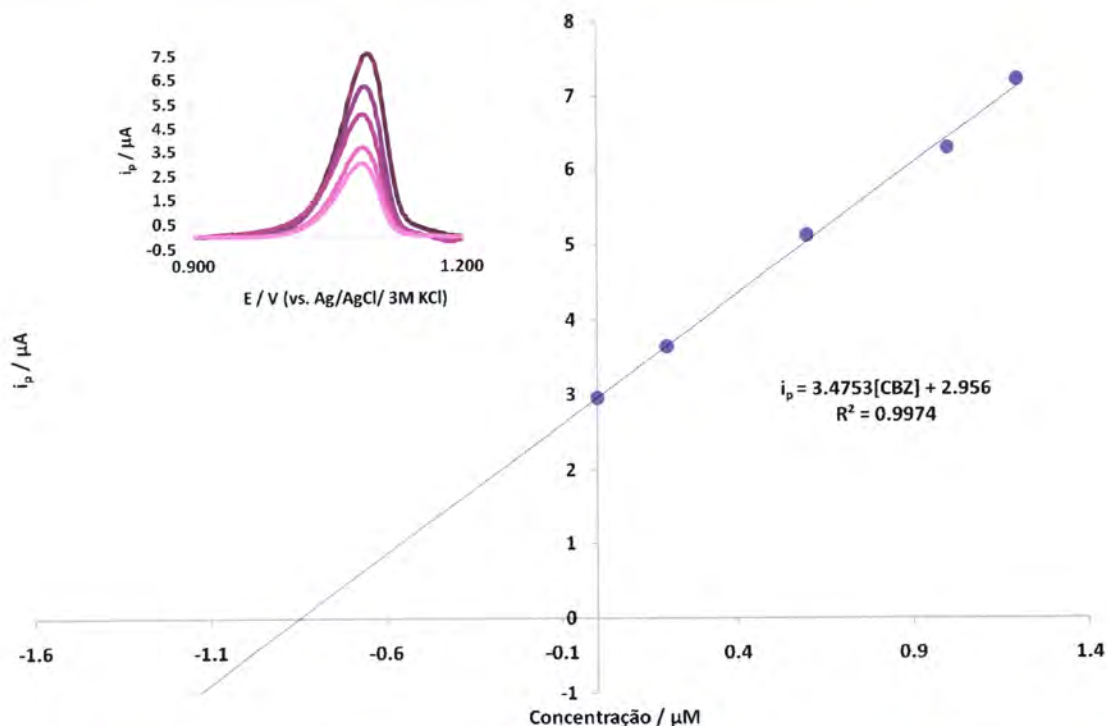


Figura 51 - Curva de adição padrão, obtida na determinação da CBZ no fármaco Tegretol®. A figura inserida ilustra cinco picos de oxidação P_c da CBZ, corrigidos para a linha de base, dos voltamogramas correspondentemente obtidos com as soluções de Tegretol® (sem e com quatro adições padrão).

3. 3. 2. 2. DETERMINAÇÃO DA CARBAMAZEPINA EM ÁGUA DA TORNEIRA DOPADA

Para verificar se o método proposto podia ser utilizado com sucesso, na detecção e determinação da CBZ numa matriz desconhecida, mas relativamente simples, realizaram-se vários ensaios com água da torneira dopada com uma quantidade conhecida de CBZ. Nestes, a concentração de CBZ na célula electroquímica era de $0.292 \mu\text{M}$. Após várias adições de uma solução padrão de CBZ de $200 \mu\text{M}$, detectaram-se $0.286 \mu\text{M}$ de CBZ (Figura 52), havendo assim uma percentagem de recuperação de cerca de 98%. Este resultado veio também ele a confirmar, a importância e utilidade do eléctrodo MWCNTs-DHP/GCE na determinação voltamétrica da CBZ.

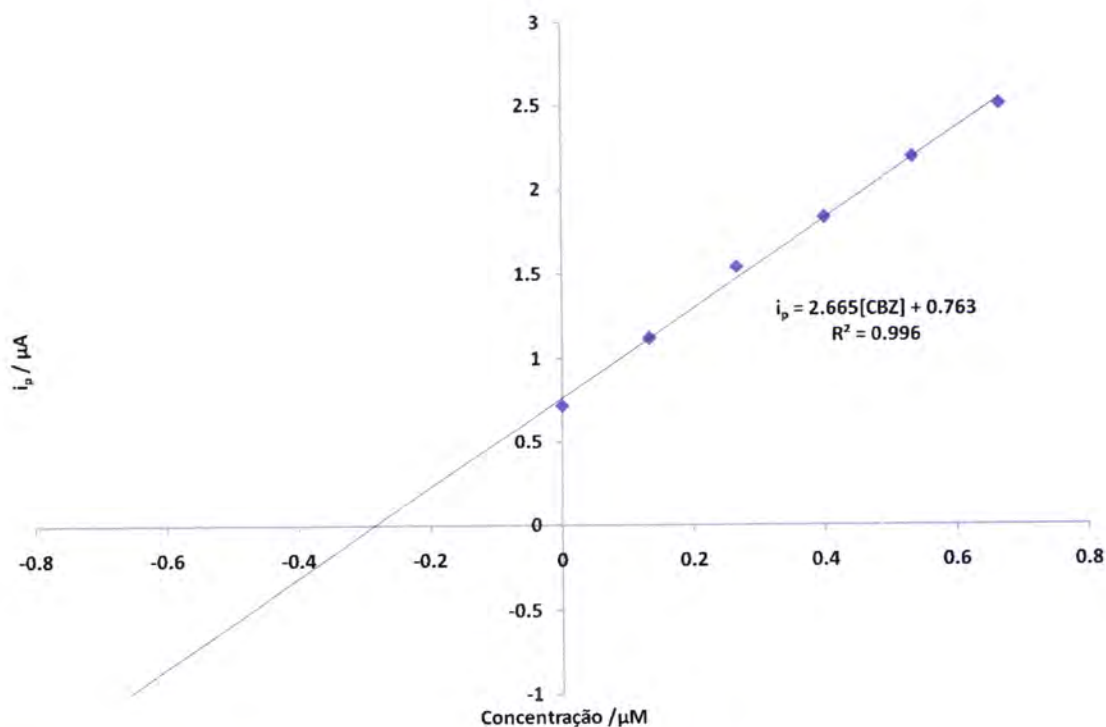


Figura 52 - Curva de adição padrão, obtida na determinação da CBZ numa amostra de água da torneira dopada.

3. 3. 2. 3. DETERMINAÇÃO DA CARBAMAZEPINA NUM EFLUENTE DOPADO

De modo a verificar, se os objectivos principais deste trabalho podiam ser alcançados com amostras mais complexas e com impacto ambiental relevante, o método desenvolvido foi aplicado na determinação da CBZ, numa amostra ambiental real: um efluente recolhido à saída de uma estação de tratamento de águas residuais domésticas. Depois de ter sido conveniente filtrado este efluente foi analisado voltametricamente, nas condições experimentais consideradas óptimas, usando o MWCNTs-DHP/GCE. Em nenhum destes ensaios foi detectado qualquer sinal electroquímico (pico P_5 , a $E_p = 1.099$ V), referente à presença de CBZ na amostra. Ou porque a sua concentração é nula, ou porque a concentração existente é inferior ao limite de detecção do método utilizado.

Na sequência destes ensaios, dispôs-se de um volume fixo desta amostra, dopando-a de seguida com uma concentração de CBZ conhecida. Utilizando o método da adição padrão, procedeu-se de seguida à análise voltamétrica desta amostra.

Começou-se por adicionar o efluente dopado à célula electroquímica, ficando a concentração de CBZ na célula de 0.212 μM . Depois da medição voltamétrica e registo da intensidade de corrente de pico, correspondente a esta amostra de trabalho, fizeram-se adições sucessivas de uma solução padrão de CBZ de 200 μM , medindo e registando as intensidades de corrente de pico nos respectivos voltamogramas. Com base nestes valores construiu-se o gráfico i_p vs concentração de CBZ_{adicionada} (Figura 53), o qual permitiu determinar, por extrapolação da recta i_p (μA) = 1.4611 [CBZ]_{ad} (μM) + 0.7303 ($R^2 = 0.9949$), a seguinte concentração de CBZ no efluente: 0.481 μM . Neste caso, verificou-se que a percentagem de recuperação, de cerca de 226.8%, era excepcionalmente elevada. Em outros ensaios, realizados com diferentes volumes de amostra na célula e por isso diferentes concentrações iniciais de CBZ, os valores obtidos foram da mesma ordem de grandeza. No entanto, também se pode verificar que quanto maior é o volume de amostra introduzido na célula electroquímica, maior é o valor da percentagem de recuperação obtido. A enorme discrepância destes valores, relativamente ao que era esperado determinar em CBZ na amostra dopada, sugere uma forte influência de outros componentes da matriz. Um aumento do volume de amostra introduzida na célula, a que corresponderá um aumento da concentração de interferentes, parece confirmar que é este o caso.

Em face dos resultados anteriores, tentou-se resolver o problema, executando um passo de preparação de amostra comumente utilizado para o efeito (Vega *et al.*, 2007). Este passo consiste em submeter a amostra, à técnica de extracção em fase sólida, SPE (ver Ponto 2. 5. da Parte Experimental), antes da determinação propriamente dita. Neste processo de limpeza por SPE usaram-se amostras previamente dopadas com CBZ e amostras que não foram dopadas com qualquer CBZ a não ser depois da SPE. Quer umas quer outras foram analisadas, no sentido de verificar que a técnica de SPE não tem influência no teor de CBZ da solução tratada, como é esperado para estes analitos (Vega *et al.*, 2007).

Após a SPE, e mantendo as restantes condições experimentais, efectuou-se a determinação da CBZ num efluente dopado, com concentração na célula de 0.212 μM . Usando o método da adição padrão, e após várias adições de uma solução padrão de CBZ de 200 μM (Figura 53), determinou-se por extrapolação da recta i_p (μA) = 1.5368

$[\text{CBZ}]_{\text{ad}} (\mu\text{M}) + 0.3112$ ($R^2 = 0.9986$), a seguinte concentração em CBZ: $0.202 \mu\text{M}$. Este valor traduz-se numa percentagem de recuperação, de cerca de 95.3%, que do ponto de vista analítico é considerada bastante aceitável.

Comparando os diferentes resultados obtidos, com as amostras tratadas por SPE e as amostras que não foram tratadas pela mesma técnica, pode concluir-se que a utilização da mesma é um requisito indispensável na determinação voltamétrica da CBZ, em amostras que são muito complexas do ponto de vista químico.

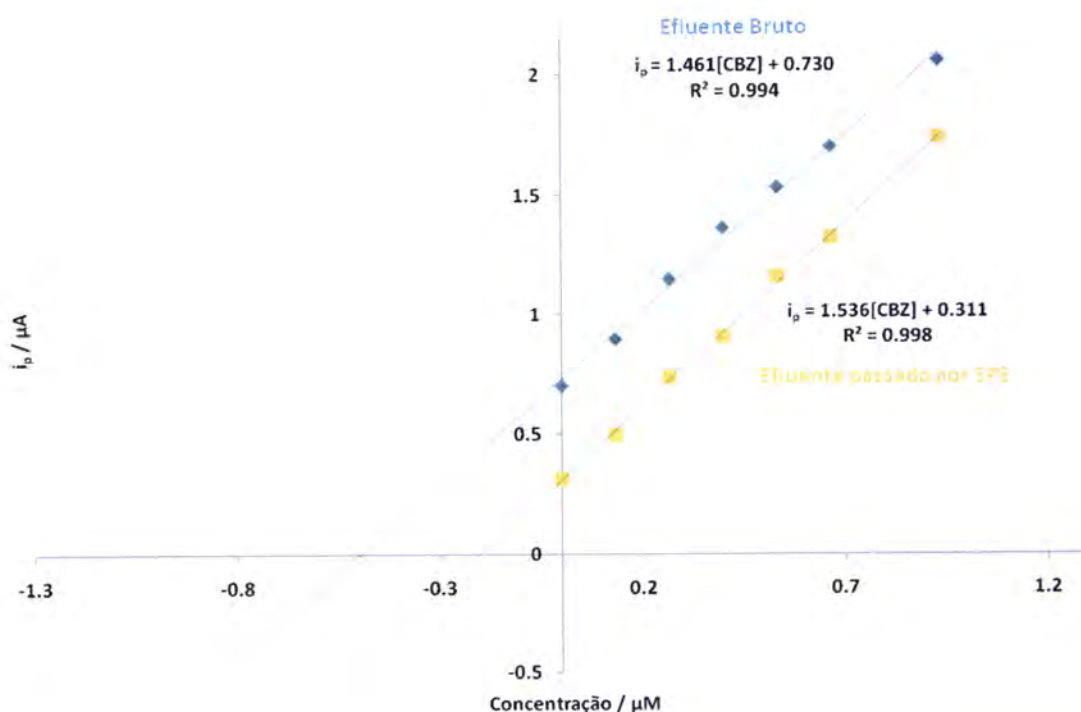


Figura 53 - Determinação da CBZ em dois efluentes dopados com $0.212 \mu\text{M}$, um no seu estado bruto e o outro passado previamente por SPE, através do método da adição padrão.

3. 4. QUANTIFICAÇÃO DA CARBAMAZEPINA: MÉTODO VOLTAMÉTRICO PROPOSTO *VERSUS* OS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS HPLC-UV/VIS E LC-ESI-MS/MS

Os métodos de HPLC-UV/Vis e de LC-ESI-MS/MS foram usados para fazer a quantificação da CBZ nas várias amostras para demonstrar a eficácia e a validade do

método voltamétrico desenvolvido neste trabalho. Através destes métodos correntes, provou-se que os resultados obtidos com o sensor desenvolvido estão de acordo com a quantidade de CBZ presente em formulações farmacêuticas comerciais e com a quantidade de CBZ em amostras de águas residuais dopadas. Na Tabela 10 estão sumarizados os resultados obtidos pelo método voltamétrico e pelos métodos cromatográficos.

As taxas de recuperação obtidas demonstram que o método voltamétrico proposto com o eléctrodo de carbono vítreo modificado com um filme de MWCNT-DHP, possui um grande potencial para ser aplicado na análise de CBZ na prática. Na análise do fármaco Tegretol[®], foram obtidas percentagens de recuperação mais elevadas com o método voltamétrico do que os métodos cromatográficos. No caso das águas residuais dopadas, as concentrações de CBZ obtidas com os métodos HPLC-UV/Vis e LC-ESI-MS/MS foram substancialmente mais elevadas do que a concentração de CBZ usada para dopar as amostras. Isto mostra os reveses que ocorrem nestas técnicas na presença de efeitos de matriz. Este problema pode ocorrer devido à elevada sensibilidade da fonte de ESI e do detector UV a outros componentes presentes na matriz, que pode resultar na supressão ou no aumento do sinal. Como foi referido acima, para minimizar a influência de interferentes na determinação da CBZ em amostras reais, o método da adição padrão é uma alternativa adequada. No entanto, essa técnica é mais facilmente usada e com um menor consumo de tempo, nos métodos voltamétricos do que nos métodos cromatográficos.

Tabela 10 – Determinação da CBZ no fármaco Tegretol[®] e em amostras de águas residuais dopadas.

Amostra	Concentração de CBZ	Método voltamétrico	HPLC-UV	LC-ESI-MS/MS	Taxa de recuperação do método voltamétrico (%)
Tegretol [®] 200	200.0 mg/comprimido	201.1 mg/comprimido	185.2 mg/comprimido	182.1 mg/comprimido	100.6
Água residual dopada	0.500 µg mL ⁻¹	0.479 µg mL ⁻¹	0.588 µg mL ⁻¹	0.558 µg mL ⁻¹	95.8

4. CONCLUSÃO

4. CONCLUSÃO

Os estudos voltamétricos realizados, sobre o comportamento e detecção catódica da CBZ com o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, revelaram que:

- a CBZ é electroreduzida a aproximadamente -1.074 V vs. Ag/AgCl/KCl 3M, no electrólito de suporte seleccionado, o tampão fosfato 0.1 M pH ~ 7 .
- a electroredução da CBZ, quando estudada por voltametria cíclica, aparenta ser um processo essencialmente irreversível. Os resultados paralelamente obtidos por voltametria de onda quadrada e impulso diferencial mostram porém que a electroredução da CBZ não é totalmente irreversível. Esta diferença parece estar relacionada com a quantidade de produto resultante da redução, que é detectável, em cada voltametria.
- a electroredução da CBZ, estudada por voltametria cíclica, parece ser um processo predominantemente controlado por difusão, influenciado também pela adsorção da própria CBZ.
- a detecção da CBZ deve ser efectuada, no electrólito de suporte considerado, a valores de pH na gama de 5 – 12. Na detecção pode utilizar-se o valor de pH do tampão fosfato 0.1 M, o qual é efectivamente 6.71, sem que haja necessidade de ajustar o mesmo com soluções de electrólitos básicos ou ácidos.
- a CBZ pode ser determinada por voltametria de onda quadrada em matrizes aquosas muito simples, mas em amostras reais de matriz mais complexa tal não é possível. No primeiro caso, com a aplicação de um potencial de deposição de -0.400 V durante 60 s, verificou-se que a relação entre a intensidade de corrente no pico e a concentração de CBZ era linear no intervalo $0.020 - 1.330$ μM , para as frequências de 100 e 200 Hz. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) respectivamente obtidos para cada frequência foram: $(\text{LOD})_{100 \text{ Hz}} = 0.03$ μM e $(\text{LOQ})_{100 \text{ Hz}} = 0.09$ μM ; $(\text{LOD})_{200 \text{ Hz}} = 0.03$ μM e $(\text{LOQ})_{200 \text{ Hz}} = 0.10$ μM . No segundo caso, das amostras reais, em que se recorreu à dopagem das mesmas e ao método da adição padrão para minimizar os efeitos de matriz, obtiveram-se sempre percentagens de recuperação demasiado elevadas. Estes

resultados mantiveram-se, mesmo com as amostras previamente submetidas ao processo de limpeza de extracção por fase sólida (SPE).

Os estudos voltamétricos realizados sobre o comportamento e detecção anódica da CBZ, com o eléctrodo de carbono vítreo modificado com o filme de MWCNTs-DHP e o eléctrodo de carbono vítreo não modificado, revelaram que:

- num tampão fosfato 0.1 M pH ~ 7, a resposta electroquímica da CBZ no eléctrodo modificado é mais complexa e muito mais acentuada do que no eléctrodo de carbono vítreo não modificado. Esta resposta sugere uma série de processos de oxidação sucessiva da CBZ, cuja natureza não foi ainda possível determinar, na sua totalidade. A ampliação do sinal é significativa a aproximadamente -0.240 V (pico P₁) e 1.099 V (pico P₅). Ambos os picos podem ser utilizados como sinal analítico para a quantificação da CBZ. Em especial, o pico mais anódico por ser o de maior magnitude.

- o pico mais anódico ($E_{p,5} = 1.099$ V) e mais intenso, seleccionado para a determinação voltamétrica da CBZ, corresponde a um processo de oxidação irreversível que parece proceder por um mecanismo misto, controlado por difusão e influenciado pela adsorção.

- o sinal analítico seleccionado para a determinação voltamétrica da CBZ no MWCNTs-DHP/GCE) é repetível entre cada medição, quando o eléctrodo é mantido em potencial de circuito aberto (*open circuit potential*, ocp) durante 180 s e com uma velocidade de rotação de 1000 a 1500 rot/min.

- a voltametria de varrimento linear (LSV) é um método mais adequado para a análise quantitativa da CBZ com o MWCNTs-DHP/GCE, do que as voltametrias de onda quadrada (SWV) e voltametria de impulso diferencial (DPV).

- o valor do pH do meio influencia o comportamento anódico da CBZ e, para fins analíticos, a sensibilidade da análise voltamétrica. Neste estudo concluiu-se que, as condições de pH natural do electrólito de suporte seleccionado (pH 6.71) são as mais

apropriadas para a determinação quantitativa da CBZ, dado que a altura do pico ($i_{p,5}$) é maior nestas condições.

- entre os vários electrólitos de suporte testados (tampões acetato e amónio), o tampão fosfato 0.1 M pH 6.71 provou ser o meio mais adequado, quando se trata de utilizar o pico P_5 como sinal para quantificar a CBZ com o MWCNTs-DHP/GCE.

- entre as várias substâncias testadas, que podem ser encontradas em conjunto com a CBZ em amostras de águas residuais domésticas, e que podem ser potenciais interferentes na sua determinação voltamétrica, o diclofenac de sódio e o ácido clofíbrico são os interferentes mais importantes. No meio fosfato estudado, ambas alteram o valor do sinal em maior extensão do que as outras substâncias testadas (o atenolol, o ibuprofeno e a oxcarbazepina).

- através da voltametria de varrimento linear (LSV), nas condições experimentais consideradas óptimas e com uma velocidade de varrimento de 100 mV s^{-1} , a intensidade de corrente do pico P_5 varia linearmente com a concentração de CBZ, no intervalo $0.13 - 1.60 \text{ } \mu\text{M}$ ($30.7 - 378 \text{ } \mu\text{g/L}$). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos foram 40 and 140 nM (9.5 and $33.1 \text{ } \mu\text{g/L}$), respectivamente. Tanto quanto se sabe, na bibliografia disponível, 40 nM é o valor de LOD mais baixo encontrado para a determinação da CBZ, usando técnicas electroquímicas.

- o eléctrodo modificado com o filme de MWCNTs-DHP é um sensor voltamétrico suficientemente sensível, reprodutível e rigoroso na detecção e quantificação da CBZ em amostras farmacêuticas, em águas naturais para consumo humano e águas residuais domésticas com elevado grau de contaminação. Nos ensaios de recuperação realizados, com o fármaco Tegretol[®], água da torneira e água de uma estação de tratamento de esgotos domésticos, ambas dopadas com CBZ, obtiveram-se percentagens de 100.6%, 98.0%, e 95.8%, respectivamente. Nestes ensaios provou-se que as duas primeiras amostras reais utilizadas, não necessitam de ser submetidas a qualquer tratamento prévio. Pelo contrário, é fundamental que a amostra de água da

estação de tratamento de esgotos seja previamente tratada, através da técnica de extracção em fase sólida (SPE).

- a técnica voltamétrica desenvolvida conduz a resultados analíticos muito satisfatórios, quando comparados com os resultados paralelamente obtidos, através das técnicas cromatográficas normalmente eleitas, como a HPLC-UV e a LC-MS.

Resumidamente, pode concluir-se que o sensor voltamétrico MWCNTs-DHP/GCE e o método electroanalítico aqui propostos para a determinação da CBZ, constituem uma alternativa promissora, em termos de simplicidade, rapidez, fiabilidade e baixo custo de análise, relativamente às técnicas cromatográficas correntes.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho e em algumas questões pertinentes que surgiram no decurso do mesmo, consideram-se como temas de interesse para desenvolver no futuro, os seguintes tópicos:

- Aplicação da técnica voltamétrica desenvolvida, a amostras de natureza biológica e a amostras em que coexistem com a CBZ, os seus principais metabolitos; Incluir neste estudo a caracterização electroquímica destes metabolitos.
- Investigação sobre os mecanismos de reacção de oxidação electródicos da CBZ e identificação dos produtos resultantes.
- Exploração das características analíticas dos picos de oxidação e redução da CBZ, que não foram objecto de estudo neste trabalho, em outros electrólitos de suporte.
- Concepção de outros sensores voltamétricos, em que se utilizam outros substratos electrónicos para formar o filme de nanotubos de carbono, em vez do GCE (por exemplo, eléctrodos de fibra ou de pasta de carbono, de diamante dopado com boro, ou mesmo de tinta impressa).
- Concepção de outros sensores voltamétricos, em que se utilizam nos filmes modificadores outros tipos de nanomateriais (por exemplo, nanopartículas de ouro).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, E. N.; Marks, A.; Lizer, M. H. (2009). "Carbamazepine-induced hyperammonemia." *Am. J. Health-Syst. Ph.*, 66(16), 1468-1470.
- Agui, L.; Yanez-Sedeno, P.; Pingarron, J. M. (2008). "Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry - A review." *Anal. Chim. Acta*, 622(1-2), 11-47.
- Ahrer, W.; Scherwenk, E.; Buchberger, W. (2001). "Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry." *J. Chromatogr. A*, 910(1), 69-78.
- Andreozzi, R.; Marotta, R.; Pinto, G.; Pollio, A. (2002). "Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity." *Water Res.*, 36(11), 2869-2877.
- Baldwin, R. P.; Thomsen, K. N. (1991). "Chemically Modified Electrodes in Liquid-Chromatography Detection - A Review." *Talanta*, 38(1), 1-16.
- Barceló, D.; Petrovic, M. (2008). *The Handbook of Environmental Chemistry - Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste: Occurrence, Analysis and Effects.*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Leipzig.
- Bard, A. J.; Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications*, 2^a ed. Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Batt, A. L.; Bruce, I. B.; Aga, D. S. (2006). "Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges." *Environ. Pollut.*, 142(2), 295-302.
- BLAC (2003). "Arzneimittel in der Umwelt Auswertung der Untersuchungsergebnisse."

- Brett, C. M. A.; Oliveira-Brett, A. M. (1993). *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications.*, Oxford University Press, Oxford.
- Burstein, E.; Cohen, M. L.; Mills, D. L.; Stiles, P. J. (2008). *Carbon Nanotubes: Quantum Cylinders of Graphene.*, Elsevier, United Kingdom.
- Calvo, M. E. B.; Renedo, O. D.; Martinez, M. J. A. (2007). "Determination of oxcarbazepine by Square Wave Adsorptive Stripping Voltammetry in pharmaceutical preparations." *J Pharmaceut. Biomed.*, 43(3), 1156-1160.
- Campanella, L.; Ambrosi, A.; Bellanti, F.; Tomassetti, M. (2006). "Comparison between voltammetric and spectrophotometric methods for drug analysis." *Curr. Anal. Chem.*, 2(3), 229-241.
- Dordio, A. V.; Candeias, A. J. E.; Pinto, A. P.; da Costa, C. T.; Carvalho, A. J. P. (2009). "Preliminary media screening for application in the removal of clofibric acid, carbamazepine and ibuprofen by SSF-constructed wetlands." *Ecol. Eng.*, 35(2), 290-302.
- Drewes, J. E.; Heberer, T.; Reddersen, K. (2002). "Fate of pharmaceuticals during indirect potable reuse." *Water Sci. Technol.*, 46(3), 73-80.
- Duan, L. S.; Xie, F.; Zhou, F.; Wang, S. F. (2007). "The electrochemical Behavior of acetaminophen on multi-walled carbon nanotubes modified electrode and its analytical application." *Anal. Lett.*, 40, 2653-2663.
- Dunbier, U.; Jugelt, W. (1991). "Electrochemical Reduction of 5H-Dibenz[B,F]Azepine Derivatives .5. Cathodic Behavior of Carbamazepine-Ammonium Halide Addition-Compounds." *Pharmazie*, 46(7), 512-517.

- Durst, R. A.; Baumner, A. J.; Murray, R. W.; Buck, R. P.; Andrieux, C. P. (1997). "Chemically modified electrodes: Recommended terminology and definitions (IUPAC recommendations 1997)." *Pure Appl. Chem.*, 69(6), 1317-1323.
- Ferrari, B.; Paxeus, N.; Lo Giudice, R.; Pollio, A.; Garric, J. (2003). "Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac." *Ecotox. Environ. Safe.*, 55(3), 359-370.
- Fritz, J. S. (1999). *Analytical Solid Phase Extraction.*, John Wiley & Sons, New York.
- Gonzalez-Barreiro, C.; Lores, M.; Casais, M. C.; Cela, R. (2003). "Simultaneous determination of neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater by high-performance liquid chromatography-post-column photochemically induced fluorimetry." *J. Chromatogr. A*, 993(1-2), 29-37.
- Gosser Jr., D. K. (1993). *Cyclic Voltammetry Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms.*, VCH Publishers, New York.
- Hall, R. D. (2009). "<http://www.scifi.co.uk/blog/paranormal/alien-implants-removed-from-hu/>".
- Heberer, T.; Reddersen, K.; Mechlinski, A. (2002). "From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas." *Water Sci. Technol.*, 46(3), 81-88.
- Hefnawey, G. B.; El-Hallag, I. S.; Ghoneim, E. M.; Ghoneim, M. M. (2004). "Voltammetric behavior and quantification of the sedative-hypnotic drug chlordiazepoxide in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum at a mercury electrode." *J. Pharmaceut. Biomed.*, 34(1), 75-86.

- Hegde, R. N.; Hosamani, R. R.; Nandibewoor, S. T. (2009a). "Voltammetric oxidation and determination of cinnarizine at glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes." *Colloid. Surface. B*, 72(2), 259-265.
- Hegde, R. N.; Shetti, N. P.; Nandibewoor, S. T. (2009b). "Electro-oxidation and determination of trazodone at multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode." *Talanta*, 79(2), 361-368.
- Hegde, R. N.; Swamy, B. E. K.; Sherigara, B. S.; Nandibewoor, S. T. (2008). "Electro-oxidation of atenolol at a glassy carbon electrode." *Int. J. Electrochem. Sci.*, 3(3), 302-314.
- Huang, J.; Li, J.; Yang, Y.; Wang, X. S.; Wu, B. Y.; Anzai, J. I.; Osa, T.; Chen, Q. (2008). "Development of an amperometric L-lactate biosensor based on L-lactate oxidase immobilized through silica sol-gel film on multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticle modified glassy carbon electrode." *Mat. Sci. Eng. C-Biom.*, 28(7), 1070-1075.
- Johnson, A. C.; Jurgens, M. D.; Williams, R. J.; Kummerer, K.; Kortenkamp, A.; Sumpter, J. P. (2008). "Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study." *J. Hydrol.*, 348(1-2), 167-175.
- Jones, O. A. H.; Voulvoulis, N.; Lester, J. N. (2002). "Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals." *Water Res.*, 36(20), 5013-5022.
- Jorio, A.; Dresselhaus, G.; Dresselhaus, M. S. (2008). *Carbon Nanotubes: Advanced Topics in Synthesis, Structure, Properties and Applications.*, Springer, Germany.

- Katz, E.; Willner, I. (2004). "Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: Applications in nanobioelectronics." *Chemphyschem*, 5(8), 1085-1104.
- Kazakevich, Y.; Lobrutto, R. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Cientists.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Khan, S. J.; Ongerth, J. E. (2004). "Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations." *Chemosphere*, 54(3), 355-367.
- Kissinger, P. T.; Heineman, W. R. (1996). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry.*, Marcel Dekker, New York.
- Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T. (2003). "Response to comment on "pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance"." *Environ. Sci. Technol.*, 37(5), 1054.
- Komsta, L.; Misztal, G.; Majchrzak, E.; Hauzer, A. (2006). "Separation of fibrate-type antihyperlipidemic drugs by capillary electrophoresis and their quantitation in pharmaceutical." *J Pharmaceut. Biomed.*, 41(2), 408-414.
- Kutner, W.; Wang, J.; L'her, M.; Buck, R. P. (1998). "Analytical aspects of chemically modified electrodes: Classification, critical evaluation and recommendations (IUPAC recommendations 1998)." *Pure Appl. Chem.*, 70(6), 1302-1318.
- La Farre, M.; Ferrer, I.; Ginebreda, A.; Figueras, M.; Olivella, L.; Tirapu, L.; Vilanova, M.; Barcelo, D. (2001). "Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*." *J. Chromatogr. A*, 938(1-2), 187-197.

- Labuda, J. (1992). "Chemically Modified Electrodes As Sensors in Analytical-Chemistry." *Selective Electr. Rev.*, 14(1), 33-86.
- Lambin, P.; Meunier, V.; Henrard, L.; Lucas, A. A. (2000). "Measuring the helicity of carbon nanotubes." *Carbon*, 38(11-12), 1713-1721.
- Laschi, S.; Bulukin, E.; Palchetti, I.; Cristea, C.; Mascini, M. (2008). "Disposable electrodes modified with multi-wall carbon nanotubes for biosensor applications." *ITBM-RBM*, 29(2-3), 202-207.
- Lin, A. Y. C.; Yu, T. H.; Lateef, S. K. (2009). "Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan." *J. Hazard. Mater.*, 167(1-3), 1163-1169.
- Lin, Z. Y.; Chen, G. N. (2006). "Determination of carbamates in nature water based on the enhancement of electrochemiluminescent of Ru(bpy)(3)(2+) at the multi-wall carbon nanotube-modified electrode." *Talanta*, 70(1), 111-115.
- Lu, S. F.; Wu, K. B.; Dang, X. P.; Hu, S. S. (2004). "Electrochemical reduction and voltammetric determination of metronidazole at a nanomaterial thin film coated glassy carbon electrode." *Talanta*, 63(3), 653-657.
- Miao, X. S.; Metcalfe, C. D. (2003). "Determination of carbamazepine and its metabolites in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." *Anal. Chem.*, 75(15), 3731-3738.
- Miao, X. S.; Yang, J. J.; Metcalfe, C. D. (2005). "Carbamazepine and its metabolites in wastewater and in biosolids in a municipal wastewater treatment plant." *Environ. Sci. Technol.*, 39(19), 7469-7475.

Miller, N.; Miller, J. C. (2000). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4 Ed., Pearson-Prentice Hall, London.

Moses, G. S.; Rao, K. M.; Rao, N. S.; Ramachandraiah, A. (1995). "Electrochemical Studies of Carbamazepine." *J. Indian Chem. Soc.*, 72(5), 333-337.

Novartis Pharmaceuticals Corporation. (2009).
["http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/tegretol.pdf."](http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/tegretol.pdf)

Reith, D. M.; Appleton, D. B.; Hooper, W.; Eadie, M. J. (2000). "The effect of body size on the metabolic clearance of carbamazepine." *Biopharm Drug Dispos*, 21(3), 103-111.

Rezaei, B.; Damiri, S. (2009). "Electrochemistry and Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Amoxicillin on a Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode." *Electroanal.*, 21(14), 1577-1586.

Sadek, P. C. (2002). *The HPLC Solvent Guide*, 2ª Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.

Schindler, W.; Hafliger, F. (1954). "Uber Derivate des Iminodibenzyls." *Helv. Chim. Acta*, 37(2), 472-483.

Shahrokhian, S.; Ghalkhani, M.; Adeli, M.; Amini, M. K. (2009). "Multi-walled carbon nanotubes with immobilised cobalt nanoparticle for modification of glassy carbon electrode: Application to sensitive voltammetric determination of thioridazine." *Biosens. Bioelectron.*, 24(11), 3235-3241.

Southampton Electrochemistry Group. (1985). *Instrumental Methods in Electrochemistry.*, Ellis Horwood, London.

Souza, D.; Codognoto, L.; Malagutti, A. R.; Toledo, R. A.; Pedrosa, V. A.; Oliveira, R. T. S.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A.; Machado, S. A. S. (2004). "Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: Aplicações." *Química Nova*, 27(5), 790-797.

Souza, D.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. (2003). "Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos." *Química Nova*, 26(1), 81-89.

Stanford University. (2006). "<http://neurophilosophy.wordpress.com/2006/08/31/carbon-nanotubes-stimulate-single-retinal-neurons/>".

Strenn, B.; Clara, M.; Gans, O.; Kreuzinger, N. (2004). "Carbamazepine, diclofenac, ibuprofen and bezafibrate - investigations on the behaviour of selected pharmaceuticals during wastewater treatment." *Water Sci Technol*, 50(5), 269-276.

Teixeira, D. M. F. M. G. (2006). "Novos métodos para a extracção de compostos fenólicos de plantas da família Moraceae." Doutorado, Universidade de Évora.

Ternes, T. A. (1998). "Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers." *Water Res.*, 32(11), 3245-3260.

Thacker, P. D. (2005). "Pharmaceutical data elude researchers." *Environ. Sci. Technol.*, 39(9), 193A-194A.

Till, A. E. (2003). "Comment on "pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance"." *Environ. Sci. Technol.*, 37(5), 1052-1053.

Turk, D. J.; McClintock, S. A.; Purdy, W. C. (1985). "The Electrochemical Detection of Certain Tricyclic Drugs at Polymer Electrodes - A Preliminary-Report." *Anal. Lett. PT B*, 18(20), 2605-2618.

- Uslu, B.; Ozkan, S. A. (2007). "Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals." *Anal. Lett.*, 40(5), 817-853.
- van Rooyen, G. F.; Badenhorst, D.; Swart, K. J.; Hundt, H. K. L.; Scanes, T.; Hundt, A. F. (2002). "Determination of carbamazepine and carbamazepine 10, 11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionisation." *J. Chromatogr. B*, 769(1), 1-7.
- Vega, D.; Agui, L.; Gonzalez-Cortes, A.; Yanez-Sedeno, P.; Pingarron, J. M. (2007). "Voltammetry and amperometric detection of tetracyclines at multi-wall carbon nanotube modified electrodes." *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 951-958.
- Vieno, N.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L. (2007). "Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland." *Water Res.*, 41(5), 1001-1012.
- Vieno, N. M.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L. (2006). "Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection." *J. Chromatogr. A*, 1134(1-2), 101-111.
- Wang, F.; Chen, L.; Chen, X.; Hu, S. (2006). "Studies on electrochemical behaviors of acyclovir and its voltammetric determination with nano-structured film electrode." *Anal. Chim. Acta*, 576(1), 17-22.
- Wang, J. (2006). *Analytical Electrochemistry*, 3^a ed. Ed., WILEY-VCH, New York.
- Weigel, S.; Bester, K.; Huhnerfuss, H. (2001). "New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea

- water for organic contaminants by gas chromatography-mass spectrometry." *J. Chromatogr. A*, 912(1), 151-161.
- Wick, A.; Fink, G.; Joss, A.; Siegrist, H.; Ternes, T. A. (2009). "Fate of beta blockers and psychoactive drugs in conventional wastewater treatment." *Water Res.*, 43(4), 1060-1074.
- Yang, X. F.; Wang, F.; Hu, S. S. (2008). "Enhanced oxidation of diclofenac sodium at a nanostructured electrochemical sensing film constructed by multi-wall carbon nanotubes-surfactant composite." *Mat. Sci. Eng. C-Biom.*, 28(1), 188-194.
- Zhang, Y. J.; Geissen, S. U.; Gal, C. (2008). "Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies." *Chemosphere*, 73(8), 1151-1161.
- Zheng, Y. Q.; Yang, C. Z.; Pu, W. H.; Zhang, J. D. (2009). "Determination of oxalic acid in spinach with carbon nanotubes-modified electrode." *Food Chem.*, 114(4), 1523-1528.
- Zosky, C. G. (2007). *Handbook of Electrochemistry*, 1 Ed., Elsevier, New York.

7. ANEXOS

Em seguida, apresentam-se dois anexos: uma comunicação em painel apresentada no *Euroanalysis 09*, que decorreu de 6 a 10 de Setembro de 2009 em *Innsbruck*, Áustria e um artigo submetido para publicação na revista *Analytica Chimica Acta*, ambos resultantes do trabalho desenvolvido nesta tese.



Voltammetric Determination of Carbamazepine with a Multi-Walled Carbon Nanotubes-Modified Glassy Carbon Electrode

A. Veiga^a, A. V. Dordio^{a,b}, A. Carvalho^{a,d}, D. M. Teixeira^{a,c}, J. G. Teixeira^{a,d}

^a Departamento de Química, ^b IMAR – Instituto do Mar, ^c ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, ^d Centro de Química de Évora, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho 59, 7000-671 Évora, Portugal



Introduction

Nowadays the analysis of pharmaceutical substances plays vital roles in the quality control of drugs and of environmental water samples, because these can have an extensive impact on public health. In the modern society, a large number of pharmaceuticals are used for the prevention, diagnosis and treatment of diseases in animals and humans. The ingested drugs are only partially absorbed by the body, and due to their higher consumption, pharmaceuticals along with their metabolites are continuously introduced in the aquatic ecosystem mainly through excreta, disposal of unused or expired drugs, and pharmaceutical discharges. If the pharmaceutical residues are not effectively removed from the water by the drinking water treatment facilities, the pharmaceuticals are unintentionally consumed by humans [1].

The recent development of more sensitive analytical techniques, with significantly lower limits of quantification for these compounds, became possible its quantification in environmental matrices. Several analytical methods have been published concerning the determination of pharmaceuticals in environmental samples, generally using chromatographic techniques like liquid chromatography with UV detection, liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS), LC-MS tandem and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) because of the lower quantification limits that these techniques can achieve (ng L⁻¹ range) [2]. Despite its high sensitivity, these methods always require the use of expensive and complex equipment, and some of them involve laborious and time-consuming multiple stage pre-concentration steps. Electroanalytical methods can be a suitable alternative for the quantification of pharmaceutical compounds in environmental matrices. These techniques are characterized by rapidity, simplicity and sensitivity. Besides that, they require low cost running time operations and equipments. These equipments can be also portable, which is particularly suitable for on-site monitoring of pharmaceuticals in field analysis of contaminated samples. Therefore the development of new and simple electrochemical sensors for the determination of this kind of substances can be of great importance and interest [3].

Among the several common pharmaceutical substances used today, and which can be found to be easily dissipated in the environment as emerging pollutants, the antiepileptic drug carbamazepine (CBZ) is one of the most serious problems due to its large use in some regions. In this work, a multi-wall carbon nanotubes/dihexadecyl phosphate film-modified glassy carbon electrode (MWCNTs/DHP-GCE) is described for the quantification of CBZ by linear sweep voltammetry (LSV). The developed sensor was applied to the quantification of CBZ in tablets and contaminated wastewater samples.

Experimental

Sample Preparation: Tegretol® 200 mg tablet was dissolved in a methanol/water mixture (20:80, v/v) in order to obtain a 200 mg L⁻¹ solution of CBZ. The wastewater samples were collected at a secondary treatment stage, in a wastewater treatment plant (WWTP) serving a small rural community population of ca. 400 inhabitants of Alentejo Portugal. The collected WWTP effluent was filtered in a 0.45 µm PTFE filter, percolated through a SPE LiChrolut C18 column and spiked with CBZ at 500 µg L⁻¹.

Preparation and use of the modified glassy carbon electrode: 1 mg of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs; Ref. 694185 from Aldrich) was mixed with 1 mg of dihexadecyl phosphate (DHP; Ref. D2631 from Sigma) in a 2.0 mL eppendorf. Then, 1 mL of deionised water was added to this mixture to form a black suspension of MWCNTs/DHP. This suspension was agitated in an ultrasonic bath for about 45 min. Finally, an appropriate volume (2 to 12 µL) of the MWCNTs/DHP suspension was cast on the clean surface of a glassy carbon electrode (GCE; Ref. 6 1204.110 from Metrohm) and air dried. Between measurements the electrode was rotated at 1000-1500 revolutions/min for about 3 min.

Electrochemical Equipment: Potentiostat/Galvanostat AUTOLAB from Ecochemie B.V. (Holland), PGSTAT20, software GPES, version 4.9; 663 VA Stand (Metrohm).

Electrochemical Technique: Cyclic Voltammetry (CV) and Linear Sweep Voltammetry (LSV).

Supporting electrolyte solution: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.89).

Electrodes (standard three-electrode cell configuration): Working electrode – Modified glassy carbon electrode; Reference electrode – Ag/AgCl(3M KCl); Auxiliary electrode – Glassy carbon rod electrode.

Results and Discussion

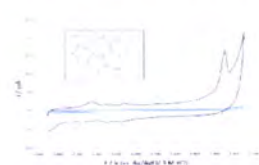


Fig. 1. Cyclic voltammograms responses of 1.4 µM CBZ at 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 6.89) at black line (MWCNTs/DHP film coated GCE) and at blue line (bare GCE). The dotted lines represent the corresponding blank responses. $v_{scan} = 0.100$ V s⁻¹ and $t_{scan} = 1.4$ s. An inset shows the LSV response.

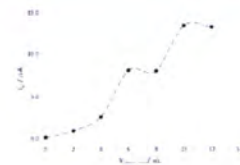


Fig. 2. Anodic peak current versus amount of MWCNTs/DHP dispersion on the GCE surface. 1.4 µM (1.07 × 10⁻³ mol L⁻¹) phosphate buffer solution (pH 6.89). Same voltammetric conditions as in Fig. 1. The plot includes the responses of 0.07 at bare GCE.

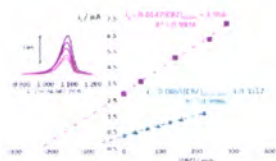


Fig. 3. Standard addition calibration curves for the determination of 1.4 µM CBZ at ■ (Tegretol® tablet) and ▲ spiked wastewater. 1.4 µM CBZ shows the analytical signal obtained with the respective sample solution at the modified GCE of 0.100 L of MWCNTs/DHP dispersion (same voltammetric conditions as in Fig. 1). The inset figure illustrates the proportional baseline corrected oxidation peaks of 1.02 obtained from the corresponding voltammograms of the two Tegretol® tablet solutions (without and with the four standard additions).

Table 1. Linear range, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) and recovery of CBZ using the described sensor.

Linear range (µg L ⁻¹)	30.7 - 219.7
LOD (µg L ⁻¹)	9.8
LOQ (µg L ⁻¹)	32.7
% Recovery	100.5 (Tegretol® tablet) 96.0 (Spiked wastewater)

♦ CBZ undergoes several oxidation processes at the multi-wall carbon nanotubes/dihexadecyl phosphate film-modified glassy carbon electrode (MWCNTs/DHP-GCE), during a potential sweep from -0.700 to 1.300 V versus Ag/AgCl(3M KCl) (Figure 1).

♦ The voltammetric response of CBZ in this modified electrode is significantly improved, when compared with the bare GCE. Around 1.080 V an irreversible oxidation peak current can be used as analytical signal for CBZ determination (Figure 1).

♦ In general, the analytical signal increased with the amount of MWCNTs/DHP dispersion cast on the GCE surface, as shown in figure 2.

♦ This signal changes linearly with the concentration of CBZ in a range from 30 - 220 ppb (Table 1).

♦ The proposed electrode proved to be suitable for the determination of CBZ in pharmaceutical formulations and wastewater samples (Figure 3), with good recoveries and low limits of detection and quantification (Table 1).

Conclusions

1. A multi-wall carbon nanotubes/dihexadecyl phosphate film-modified glassy carbon electrode (MWCNTs/DHP-GCE) is primarily described for the quantification of CBZ using linear sweep voltammetry (LSV).
2. In the tested conditions, the developed sensor showed good response and a relatively low limits of determination and quantification for CBZ.
3. The electrode was applied to pharmaceutical and environmental samples with excellent recoveries.

References

- [1] Y. Zhang, S. Geisen, C. Gal, Chemosphere 73 (2008) 1151.
- [2] T.A. Termes, Tre-Trends Anal. Chem. 20 (2001) 419.
- [3] A.D. Woolfson, in Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 3rd ed., Vol. 3, J. Swarbrick Ed., Informa Healthcare, New York, 2007, pp. 1450-1501.

EUROANALYSIS 09, 6 to 10 September 2009, Innsbruck, Austria

***Manuscript**

Click here to view linked References

1 **Rapid and Sensitive Voltammetric Determination of Carbamazepine**
2 **at Multi-Walled Carbon Nanotubes-Modified Glassy Carbon Electrode**

3

4 Alfredina Veiga¹, Dora Martins Teixeira^{1,2}, Ana Dordio¹, A. J. Palace Carvalho^{1,3}, Jorge
5 Ginja Teixeira^{1,3*}

6 ¹Chemistry Department, Evora University, CLAV Rua Romão Ramalho n.º 59, 7000-617 Evora, Portugal.

7 ²Institute of Mediterranean Agricultural and Environmental Sciences (IC.AAM), Évora, Portugal.

8 ³Chemistry Center of Évora (CQE), Évora, Portugal.

9

10 *Fax: +351266745303

11 e-mail: jmgt@uevora.pt

12

13 **Keywords**

14 Carbamazepine; Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs); Voltammetric
15 determination; Environmental samples; Pharmaceutical formulations.

16

17 **Abstract**

18 A multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)-dihexadecyl hydrogen phosphate (DHP)
19 film-coated glassy carbon electrode (GCE) was used for voltammetric determination of
20 carbamazepine (CBZ). The results showed that this modified electrode exhibits
21 excellent enhancement effects on the electrochemical oxidation of CBZ. The oxidation
22 peak current of CBZ at this film-modified electrode increased significantly, when
23 compared with that at a bare glassy carbon electrode. The proposed method was applied
24 to the quantification of CBZ in pharmaceutical formulations and wastewater samples
25 with good recoveries and low limits of detection and quantification (0.04 and 0.14 µM,

26 respectively), and was positively compared with chromatographic techniques commonly
27 used in the quantification of pharmaceutical compounds in real samples.

28

29

30 **1. Introduction**

31 Carbamazepine (Figure 1), chemically known as 5*H*-dibenzo[*b,f*]azepine-5-
32 carboxamide is an anticonvulsant, antiepileptic and mood stabilizing drug used
33 primarily in the treatment of epilepsy and bipolar disorder. It is also used to treat other
34 affective disorders such as resistant schizophrenia, ethanol withdrawal, restless leg
35 syndrome, psychotic behavior associated with dementia and post-traumatic stress
36 disorders [1, 2].

37 Carbamazepine (CBZ) is one of the most widely prescribed drugs, in a variety of
38 dosages and pharmaceutical forms [3]. Due to its high consumption rates in modern
39 society [3], it became important to develop and establish new, fast and accurate
40 methodologies for the determination of this drug in fields like the quality control
41 analysis of its pharmaceutical formulations, clinical control of their users, and especially
42 in analytical environmental chemistry, since CBZ is considered today one of the most
43 emergent pollutants in ground and surface waters [3-5]. For this reason, carbamazepine
44 has also been proposed as an anthropogenic marker in water bodies [6].

45 The introduction of carbamazepine in the aquatic ecosystem occurs mainly through
46 human excreta of the no adsorbed fraction of CBZ, and disposal of unused or expired
47 drug [3, 4, 7]. In these environments, CBZ proves to be highly resistant to
48 biodegradation or common chemical and biological processes of wastewater treatment
49 [8-10], which helps to explain why is one of the most frequently detected
50 pharmaceutical residues in water bodies around the world. If the pharmaceutical
51 residues are not effectively removed from water by the drinking water treatment plants,

52 they will be unintentionally consumed by humans [3]. During wastewater treatment,
53 CBZ was found to be removed by less than 10% [11-13]. As a result, CBZ has been
54 detected at concentrations up to 1.075 $\mu\text{g L}^{-1}$ in surface water samples and up to 0.610
55 $\mu\text{g L}^{-1}$ in groundwater samples [3, 12, 13]. It has also been found in drinking and sea
56 waters, but at lower levels [3, 14]. Although the trace levels detected (ng/L - $\mu\text{g/L}$), it is
57 important to take into account the effects of long-term exposure of pharmaceuticals like
58 CBZ, on public health and aquatic ecology. Additionally, the unknown synergistic
59 effects of the pharmaceutical mixtures must also be considered [14]. So, the occurrence
60 and fate of pharmaceuticals in the aquatic environment has been recognized as one of
61 the emerging issues in analytical and environmental chemistry in the last decade.
62 Several analytical methods have been published concerning the determination of CBZ
63 in pharmaceutical formulations and clinical and environmental samples. The most
64 common used are the chromatographic techniques, like liquid chromatography with UV
65 [15, 16] or diode-array detection [17], liquid chromatography coupled with mass
66 spectrometry (LC-MS) [18], LC-MS tandem [14, 19, 20] and gas chromatography
67 coupled with mass spectrometry (GC-MS) [21, 22], because of its high sensitivity and
68 selectivity and the lower quantification limits that these techniques can achieve ($\text{ng-}\mu\text{g}$
69 L^{-1} range) [23]. Other chromatographic techniques, like micellar electrokinetic
70 chromatography (MEKC) [24], were also used. The works that refer the use of
71 spectrophotometric techniques, as UV/vis spectrophotometry [5, 25, 26], and
72 electroanalytical techniques, like voltammetry [5, 27-29] are comparatively very scarce
73 and rarely adopted. The very few voltammetric methods known rely mostly on cathodic
74 behaviour of CBZ at mercury electrodes. Among these, the LOD varies between 1.0
75 [28] to 1.5 [5] μM .

76 Despite its little use on the detection and determination of CBZ, it is well known that
77 the voltammetric methods can overcome most of the problems associated to the
78 chromatographic methods. While these methods always require the use of expensive
79 and complex equipment, and some of them involve laborious and time-consuming
80 multiple stage pre-concentration steps, the voltammetric methods can be very rapid,
81 simple and sensitive, depending of the electrode materials and techniques used. Besides
82 that, they require low cost running time operations and equipments. These equipments
83 can be also portable, which is particularly suitable for on-site monitoring of
84 pharmaceuticals in field analysis of contaminated samples.

85 The aim of this work was to develop a new electrochemical methodology for the
86 quantification of CBZ in environmental samples and pharmaceutical formulations,
87 using voltammetric techniques. The electrochemical sensor was composed by a glassy
88 carbon electrode (GCE), modified with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and
89 a dispersing agent [30-33]. Several recent studies have been published dealing with the
90 quantification of pharmaceutical compounds such as atenolol [34], 2-chlorophenol [35],
91 trazodone [36], daunorubicin [37], lincomycin [38] and diclofenac [39], using this kind
92 of sensor. Attending to the importance and actuality of these studies, and to the fact that
93 very little advances has been reported on the voltammetric determination of CBZ [5, 27-
94 29], a MWCNTs–dihexadecyl hydrogen phosphate (DHP) film coated GCE [33, 36, 38-
95 41], is proposed in this work for the determination of this pharmaceutical substance. To
96 the best of our knowledge this was never tried or reported.

97 The observed enhanced electrooxidation of CBZ at the surface of MWCNTs-DHP film
98 coated GCE in phosphate buffer solution (pH 6.9) was attributed to the unique
99 properties of MWCNTs such as large specific surface area and strong adsorptive
100 properties providing more reaction sites [30, 31, 33, 39]. The proposed method was

101 successfully applied to quantify CBZ in commercial medicinal tablets and wastewater
102 samples. Besides that, the results obtained are in good agreement with that obtained by
103 HPLC and LC-MS techniques.

104

105 2. Experimental

106 2.1. Reagents and solutions

107 CBZ (> 99% purity) was obtained from Sigma-Aldrich and the pharmaceutical
108 preparation containing this active compound (Tegretol® tablets with 200 mg CBZ, from
109 Novartis®) was purchased in a local pharmacy. Oxcarbazepine was used from the
110 pharmaceutical preparation Proaxen® (tablets with 300 mg oxcarbazepine, from
111 Pentafarma/Grünenthal S.A.®), purchased in a local pharmacy.

112 Clofibrac acid (97% purity), atenolol (\geq 98% purity), diclofenac sodium salt (\geq 98%
113 purity) and ibuprofen (99.8% purity) were obtained from Sigma-Aldrich. MWCNTs
114 with > 95% purity (7-15 nm o.d. \times 3-6 nm i.d. \times 0.5-200 μ m length) were purchased
115 from Sigma-Aldrich (Ref. 694185). These were used as received, without any chemical
116 oxidation or washing step. Dihexadecyl hydrogen phosphate (DHP) was purchased from
117 Sigma-Aldrich (Ref. D2631) and stored at -18 °C.

118 All other chemical reagents used (*e.g.*, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , HCl and NaOH) for
119 solutions preparation were reagent grade from Merck and used as received. All
120 solutions were prepared with deionised water (resistivity \geq 18 M Ω cm) from a Millipore
121 Milli-Q system (Simplicity[®] UV, Millipore Corp., France), and methanol (HPLC
122 gradient grade, Merck).

123 The Proaxen® solution was prepared in a mixture of MeOH:H₂O (4:96 v/v), dissolving
124 a tablet (300 mg oxcarbazepine) in 20 mL of methanol, followed by its dilution with
125 deionised water on volumetric flask of 500 mL. The final concentration was 600 mg L⁻¹

5

126 oxcarbazepine (or 2.38×10^{-3} M). All other stock solutions of pharmaceutical
127 substances (1.0 mM) were prepared in a mixture of MeOH:H₂O (40:60 v/v). All
128 solutions were sonicated in an ultra-sonic bath for 15 min. Working solutions (0.2 mM)
129 of pharmaceutical substances, including the oxcarbazepine solution, were prepared daily
130 by suitable dilution (with ultra-pure water) of the respective stock solution before the
131 experiments.

132 A phosphate buffer stock solution (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, with pH 7.00 and 0.1 M) was
133 used to prepare the supporting electrolyte solutions. Whenever necessary the pH was
134 adjusted either with 4.7 M HCl or 5 M NaOH to the studied values.

135 The wastewater samples were collected at a secondary treatment stage, in a wastewater
136 treatment plant (WWTP), serving a small rural community population of *ca.* 400
137 inhabitants of Alentejo - Portugal. These samples were filtered through a 0.45 µm PTFE
138 filter, and then stored in a refrigerator (at 4°C) until analysis.

139

140 *2.2. Pharmaceutical preparations and spiked wastewater samples*

141 The Tegretol® solutions were prepared in a mixture of MeOH:H₂O (20:80 v/v), by
142 dissolving a tablet (200 mg CBZ) in 200 mL of methanol, followed by its dilution with
143 deionised water on a volumetric flask of 1 L. The final concentration was 200 µg mL⁻¹
144 CBZ (or 0.85×10^{-3} M). These solutions were sonicated in an ultra-sonic bath for 15
145 min, before use.

146 Appropriate aliquots of wastewater samples, spiked with 0.500 µg mL⁻¹ of CBZ, were
147 subjected to a solid phase extraction (SPE) pre treatment. The samples were percolated
148 through a 3 mL LiChrolut® C₁₈ column, which was previously conditioned with 7.5 mL
149 of methanol and 7.5 mL of deionised water.

150

151 2.3. *Electrochemical apparatus and measurements*

152 Cyclic and linear sweep voltammetric experiments were carried out using an Autolab
153 PGSTAT 20 (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands). The instrument was computer-
154 controlled using GPES (General Purpose Electrochemical System) software, version
155 4.9. All the measurements were carried out in a three-electrode measuring cell. The
156 working electrodes were a bare and a MWCNT modified glassy carbon disc electrode of
157 2.0 mm diameter, the auxiliary electrode was a platinum rod, and the reference electrode
158 was Ag/AgCl/ 3M KCl. All the potentials in the text are quoted *versus* this reference
159 electrode. The used glassy carbon disc electrodes were hand-polished using 0.3 μm
160 alumina powder on a polishing cloth followed by successively rinsing with acetone and
161 deionised water, before each experiment or modification. Cyclic voltammetric (CV)
162 measurements were carried out at scan rates of 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 and 300
163 mV s^{-1} using a step potential of 2.44 mV. Linear sweep voltammetric (LSV)
164 measurements were carried out at scan rates of 100 mV s^{-1} . Both voltammetric
165 measurements were performed between -0.700 and 1.300 V. All voltammograms were
166 recorded at a constant temperature of 22 °C. Solutions in the cell were purged with
167 oxygen-free nitrogen for 5 min prior to the measurement. A nitrogen blanket was
168 maintained above solutions surface during the measurements. The pH was controlled by
169 a Metrohm pH/mV meter (Model 632) with a glass pH electrode. To homogenize the
170 stock solutions and dispersions, an ultra-sonic bath (Transsonic T660/H Ehna®) was
171 used.

172

173

174

175 *2.4. Preparation of glassy carbon electrode modified with MWCNTs/DHP film*
176 *(MWCNTs/DHP-GCE) and with DHP film (DHP-GCE)*

177 In the preparation of MWCNTs/DHP-GCE, 1 mg MWCNTs and 1 mg DHP were
178 dispersed together in 1 mL deionised water, with the aid of ultra-sonic agitation for
179 about 30 min, to give 1 mg/mL MWCNTs–DHP dispersion. As reported previously,
180 prior to modification the GCE surface was treated and cleaned. After this, 2 to 12 μ L of
181 the MWCNTs–DHP dispersion was cast on the GCE surface and dried in a vacuum
182 desiccator. The DHP-GCE was prepared in a similar way, by casting the GCE surface
183 with a fixed amount of a prepared solution of 1 mg DHP/1 mL deionised water.

184

185 *2.5 HPLC-UV and LC-ESI-MS/MS analysis*

186 High performance liquid chromatography (HPLC) with UV/Vis spectrometry detection,
187 using an Elite LaChrom HPLC system equipment (Hitachi, Japan) was used to quantify
188 CBZ in commercial tablets and wastewater samples. The separation was performed in
189 isocratic mode, with a mobile phase composed by 75:25 (% v/v) acetonitrile:water
190 (acidified with phosphoric acid 0.1%, v/v), at a flow rate of 1.0 mL/min, and using a
191 reversed phase analytical column Zorbax Eclipse XDB-C18 with 5 μ m particle size.
192 The UV detector wavelength was set at 210 nm.

193 LC-ESI-MS/MS analyses of the samples were carried out in a LCQ Advantage
194 ThermoFinnigan mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source
195 and using an ion trap mass analyzer. The conditions of analysis were: capillary
196 temperature of 275° C; source voltage of 5.0 kV, source current of 100.0 μ A, and
197 capillary voltage of 15.0V in positive ion mode. The mass spectrometer equipment was
198 coupled to an HPLC system with autosampler (Surveyor ThermoFinnigan). The
199 analytical column was a reversed phase Thermo Hypersil gold (C18, particle size 5 μ m,

200 150 mm × 2.1 mm). The quantification of CBZ was performed with an isocratic
201 program using methanol as eluent A and water acidified with 0.1% (v/v) formic acid as
202 eluent B. The mobile phase was composed by 75% eluent A:25 % eluent B (v/v) at a
203 flow rate of 0.3 mL min⁻¹. The LC-ESI-MS/MS analysis were performed in the SRM
204 (Selected reaction monitoring) mode, using the most intense transition described for
205 CBZ (237.0→193.9) [19].

206 Five replicate injections of 20 µL were made for each sample previously filtered
207 through a 0.45 µm filter. Calibration curves were constructed using a set of CBZ
208 standard solutions, prepared with methanol /water (20:80, v/v) or pre-treated
209 wastewater, with concentrations ranging from 0.25 to 5.0 mg L⁻¹.

210

211 **3. Results and Discussion**

212 *3.1. Cyclic Voltammetric Behavior of Carbamazepine*

213 The electrochemical behavior of CBZ in 0.1M phosphate buffer with pH 6.89 was
214 investigated by cyclic voltammetry (CV). Fig. 2 depicts cyclic voltammograms for
215 6.0×10⁻⁶ mol L⁻¹ CBZ at (a) MWCNTs-DHP/GCE (8 µL of dispersion) and (c) bare
216 GCE. The dotted lines (b) and (d) represent the corresponding blank responses. Within
217 the potential window studied it can be seen that CBZ response at the MWCNTs/DHP-
218 GCE is very complex, since this molecule undergoes several oxidation and reduction
219 processes. On the basis of the few reports about the (electro)chemical oxidation and
220 reduction of the CBZ molecule, all these processes can be related with the initial redox
221 transformation of the olefinic double bond in the central heterocyclic ring. This
222 electrophore group can be oxidized to alcohol and carbonyl groups, among others [14]
223 and reduced to a single C-C bond [5, 27, 28]. The new functional groups can interact
224 with the chemical surface of MWCNTs, promoting new (electro)chemical reactions

9

225 with the lateral aromatic rings of the CBZ molecule. For example, a hydroxyl group can
226 be attached to one of these aromatic rings (like the way it happens with two known
227 metabolites of CBZ, the 2-hydroxy-CBZ (CBZ-2-OH) and the 3-hydroxy-CBZ (CBZ-3-
228 OH)) [42], being further electrochemically oxidized to a carbonyl group, as it is
229 common in several phenolic molecules [43]. Investigations about the electrochemical
230 nature of this complex behavior of CBZ molecule are an ongoing work in our team. For
231 now, and as it is clear in Fig. 2, it is important to focus on the analytical importance of
232 the well defined oxidation peak, P_+ , and the enhancement of its height at the
233 MWCNTs/DHP-GCE, when compared with the bare GCE. As expected, this was
234 attributed to the electrocatalytic properties of the MWCNTs. The opposite effect is
235 observed on the DHP film-coated GCE (data not shown) since DHP inhibits the electron
236 transfer between CBZ and the GC electrode.

237 In the first potential sweep, from -0.700 to 1.300 V, two well-defined and more intense
238 oxidation peaks appear (three other are less well-defined and intense). The first of these
239 two peaks appears around -0.260 V and the other, a very sensitive peak, P_+ , around
240 1.080 V. On the reverse scan, a corresponding reduction peak is observed for the less
241 anodic, and no reduction peak is observed for the more anodic, revealing that the former
242 seems to possess some degree of reversibility, while the second is totally irreversible.
243 This irreversible process, which is also observed at the bare GCE, indicates that the
244 oxidation of CBZ is more difficult on this unmodified surface, since it occurs at a more
245 anodic potential (*ca.* 1.190 V).

246 On successive cyclic voltammetric sweeps, the electrochemical signals of CBZ at the
247 modified electrode become very poor, suggesting that the interactions of CBZ with the
248 effective reaction sites of the modified electrode surface decreases. As it is well known,
249 this is a factor that can compromise the voltammetric determination of CBZ in routine

250 analysis. However, it was found in this study that the voltammetric response don't
251 varies (RSD = 0.67% for n = 5), when the electrode was maintained at an open circuit
252 potential (*ocp*) for 3 min and with a rotation speed of 1000 revolutions/min, between
253 each run. With this procedure the voltammetric determination can be performed with
254 the same modified electrode, without the necessity to clean it, or discard it using a new
255 one. For a given CBZ solution, probably during the time undertaken at the *ocp* a
256 maximum quantity of CBZ molecules is accumulated at reactive sites of the MWCNT
257 electrocatalytic layer.

258 Therefore, the voltammetric study of CBZ towards its electrochemical characterization
259 and the analytical quantification was performed with the data obtained from the first
260 voltammetric scan (cyclic voltammetry, CV, or linear sweep voltammetry, LSV), and
261 focused on the more intense and sensitive oxidation peak, the peak with $E_{p,a} = 1.080$ V
262 (peak P+).

263 It is also important to note that square wave voltammetry, known by its rapidity and
264 sensitivity [43], has given unsatisfactory results.

265

266 3.2. Optimization of the experimental variables

267 3.2.1. Influence of the equilibration potential and time

268 In electrochemical studies, where the interaction between the electroactive analyte and
269 the electrode surface can have a strong influence on the quality of the signal to be
270 measured, it is important to fix the potential and time conditions that precede the
271 measurement. Besides the *ocp* conditions used, the equilibration potential and time can
272 affect the amount of CBZ that accumulates at the electrode. Bearing this in mind, the
273 effect of both factors on peak current response was also studied. When equilibration
274 potential was varied from -0.700 to 0.700 V, it was found that the peak current

275 decreased between -0.500 V and 0.700 V (Fig. 3(a)). Hence, an equilibration potential
276 of -0.700 V was adopted. The peak current increased very little, when the equilibration
277 time varies from 1 s to 300 s (Fig. 3(b)). This indicates that this period of time has little
278 influence on the oxidation peak, when compared with the previous 3 min undertaken at
279 the *ocp*. As already suggested, it is possible that during this stage, and for a given CBZ
280 solution, the electrode surface becomes saturated with CBZ molecules. To avoid a too
281 much time consuming analysis, an equilibration time of 1 s was chosen.

282

283 3.2.2. Influence of pH

284 The effect of pH on the anodic response (P_+) of CBZ at the modified electrode was
285 tested over the pH range 2.0 - 11.8 using the same supporting electrolyte solution.
286 Within this pH range, the peak potential $E_{p,a}$ is almost pH independent between pH 2
287 and 5, and above this value is shifted to less positive values as the pH of the solution
288 increases (Fig. 4). The greater variations occur between pH 5.14 and 7.25 and for pH >
289 11. In the pH range 5.1 -7.3, the $E_{p,a}$ varies linearly with pH, with a negative slope of
290 27.9 mV/pH. This indicates that the number of protons released from the molecule, in
291 this anodic process and at this pH range, seems to be half the number of electrons
292 transferred to the electrode [44].

293 As can be also observed, the peak current is very sensitive to pH changes between pH
294 5.1 and 8.0, achieving a maximum value around 6.9 (the pH of the phosphate buffer
295 used as supporting electrolyte). Outside this pH range the peak current decreases
296 significantly when pH \geq 10. Therefore, further studies were performed at pH 6.89.

297

298

299

300 3.2.3. Influence of the scan rate on peak P_+

301 The dependence of peak potential, E_p , as well as peak current, i_p , on the scan rate (v)
302 were studied in the range 25–300 mV/s. The E_p is a function of the scan rate, shifting in
303 a positive direction, and the plot of E_p vs. $\log v$ (Fig. 5) was linear. At the same time, it
304 was found that the peak current, i_p , is proportional to the square root of the scan rate (i_p
305 (μA) = $28.06v^{1/2}$ (V/s) $^{1/2}$ - 1.6687; $R^2 = 0.9909$; the relation i_p vs. v was not linear,
306 presenting a $R^2 = 0.9765$). These diagnostic tests prove that the electrode reaction under
307 study is irreversible [45]. The linear relationship found between i_p and $v^{1/2}$, suggests that
308 the electrooxidation is a diffusion-controlled process. However, a linear relationship
309 with a slope close to 0.62, observed between $\log i_p$ and $\log v$ (Fig. 6, where i_p is in μA
310 and v is in Vs^{-1}) seems to be indicative of some adsorption contributions to the
311 electrode reaction. It can be said that this reaction at the modified GCE, is a “mixed”
312 diffusion-adsorption process [45-47].

313

314 3.2.4. Influence of the amount of MWCNTs/DHP dispersion

315 Figure 7 illustrates the relationship between the volume of 1 mg/mL dispersion used to
316 modify the GCE surface and the anodic peak current of CBZ. It is found that the peak
317 current increases in general with an increasing volume of the dispersion. Above 10 μL
318 the peak current changes slightly. Since the signal is not improved above this quantity
319 and because the dispersion spreads beyond the limits of the conductive surface of GCE
320 electrode, the volume of the dispersion chosen in the analytical determination of CBZ
321 was 10 μL .

322

323

324

325 3.3. Calibration curve

326 The calibration curve for CBZ (Fig. 8) was established by linear sweep voltammetry
327 (LSV), under the optimized experimental conditions described above. A scan rate of
328 100 mV s^{-1} was used. At these conditions, the plot of peak current, i_p , versus CBZ
329 concentration was found to be linear in the range $0.13 - 1.60 \mu\text{M}$ ($30.7 - 378 \mu\text{g/L}$). The
330 limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of CBZ, were calculated using the
331 typical equations $\text{LOD} = 3s/m$ and $\text{LOQ} = 10s/m$ (where s is the standard deviation of
332 the peak currents of the blank (five runs), and m is the slope of the calibration curve).
333 These were 40 and 140 nM (9.5 and $33.1 \mu\text{g/L}$), respectively. To the best of our
334 knowledge, this limit of detection is the lowest LOD that has been reported for
335 carbamazepine using electrochemical techniques.

336 At higher scan rates, the linearity between the peak current, i_p , and CBZ concentration
337 becomes unsatisfactory.

338

339 3.4. Interferences

340 Table 1 lists the influence of other pharmaceutical substances which possibly can occur
341 in wastewater [10], on the oxidation signal of CBZ. Under the optimum experimental
342 conditions, it was found that diclofenac and clofibric acid are the strongest interferents.
343 Both pharmaceuticals enhance the oxidation signal of CBZ, without distorting its shape.
344 In the other three cases, the effect in the peak current response of CBZ is substantially
345 more reduced. For all pharmaceuticals tested, the interference remains at the same level,
346 when the concentration of the compounds is four times the CBZ concentration. Among
347 the tested substances, diclofenac is the only pharmaceutical that produces an additional
348 voltammetric peak (at 0.630 V aprox.) at the modified GCE, as noted by Yang et al.
349 [39]. Attending to these effects, it is advisable to perform the analytical determination of

14

350 CBZ at real samples using the standard addition method, instead of the calibration curve
351 method.

352

353 *3.5. Analytical determination of CBZ*

354 The MWCNTs/DHP-GCE was used to determine CBZ in tablets and spiked wastewater
355 samples, by LSV. The content of CBZ in both samples was obtained using the standard
356 addition method, at the optimized experimental conditions. In the tablet assays, a
357 suitable aliquot (15 μL) of Tegretol® stock solution was diluted in 15 mL of 0.1 M
358 phosphate buffer (pH 6.89). The standard additions were made with the working
359 solution (200 μM = 47.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of CBZ. In the wastewater assays, the same
360 procedure was repeated. In this case, an appropriate aliquot (1.5 mL) of the spiked
361 wastewater sample (treated by SPE) was diluted in 13.5 mL of supporting electrolyte
362 solution. Figure 9 shows the standard addition curves obtained for the Tegretol®
363 solution and spiked wastewater. In Table 2 are summarized the results obtained in the
364 voltammetric analysis of five replicates from each sample. Otherwise, HPLC-UV and
365 LC-ESI-MS/MS were also used in the quantification of CBZ to prove the importance
366 and accuracy of this voltammetric method. The results obtained with the developed
367 sensor are in good agreement with the content of CBZ marked in the label of the tested
368 commercial formulation, and with the content of the spiked wastewater samples. The
369 recoveries obtained indicate that the proposed modified electrode and the voltammetric
370 method have a great potential for practical sample analysis of CBZ. In the analysis of
371 the Tegretol® solution, better recoveries were obtained using this method, when
372 compared with the other chromatographic methods. In the case of the spiked wastewater
373 samples, the concentrations of CBZ obtained using HPLC and LC-MS were
374 substantially higher than the CBZ content. This proves the significant drawback of these

375 techniques which is the occurrence of matrix effects. These effects are caused by the
376 high susceptibility of the ESI source and UV detector to other components present in
377 the matrix, which may result in the suppression or enhancement of the signal. As
378 referred above, to minimize the influence of interferences in the analytical determination
379 of CBZ at real samples, the standard addition method is a suitable alternative. However,
380 that technique is more easily performed and less time consuming using voltammetric
381 methods than in chromatographic methods.

382

383 **4. Conclusions**

384 The MWCNTs/DHP-GCE and the voltammetric method presented in this work
385 constitute a good technique for the determination of CBZ with good repeatability,
386 reproducibility, and recovery along with a low detection limit. This electroanalytical
387 technique is a promising alternative to the often reported chromatographic methods
388 owing to its simplicity, rapidity, reliability and low cost of analysis. The multi-walled
389 carbon nanotubes modified GCE electrode exhibits catalytic activity towards the
390 oxidation of CBZ, leading to a considerable improvement in the signal response. The
391 method has been applied with success to the determination of CBZ in pharmaceutical
392 dosage forms and spiked wastewaters. In the future the proposed methodology will be
393 applied to biological fluids to detect levels of carbamazepine.

394

395 **References**

396

- 397 1. J. B. Leikin, F. P. Paloucek, Poisoning and Toxicology Handbook, 4th ed.,
398 Informa Health Care, New York, 2008.

- 399 2. L. J. Doods (Ed.), *Drugs in Use: Clinical Case Studies for Pharmacists*, 4th ed.,
400 Pharmaceutical Press, London, 2010, p. 357.
- 401 3. Y. Zhang, S. U. Geißen, C. Gal, *Chemosphere*, 73 (2008) 1151-1161.
- 402 4. K. Kümmerer, A. Schuster, in: K. Kümmerer (Ed.), *Pharmaceuticals in the*
403 *Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, 3rd ed., Springer, 2008, p. 46.
- 404 5. L. Campanella, A. Ambrosi, F. Bellanti, M. Tomassetti, *Curr. Anal. Chem.*, 2
405 (2006) 229-241.
- 406 6. M. Clara, N. Kreuzinger, B. Strenn, *Water Res.*, 38 (2004) 947-954.
- 407 7. K. Fent, A. Weston, D. Caminada, *Aquatic Toxicology*, 76 (2006) 122-159.
- 408 8. K. Stamatelidou, V. Vavilin, G. Lyberatos, *Bioresource Technology*, 88 (2003)
409 131-136.
- 410 9. M. Clara, N. Kreuzinger, B. Strenn, O. Gans, H. Kroiss, *Water Res.*, 39 (2005)
411 97-106.
- 412 10. V. Matamoros, C. Arias, H. Brix, J. M. Bayona, *Water Research*, 43 (2009) 55-
413 66.
- 414 11. T. A. Ternes, *Water Res.*, 32 (1998) 3245-3260.
- 415 12. H. Heberer, *Toxicol. Lett.*, 131 (2002) 5-17.
- 416 13. T. Heberer, *J. Hydrol.*, 266 (2002) 175-189.
- 417 14. L. Hu, H. M. Martin, O. Yarce-Bulted, M. N. Sugihara, K. A. Keating, T. J.
418 Strathmann, *Environ. Sci. Technol.*, 43 (2009) 509-515.

- 419 15. Y. Kouno, C. Ishikura, M. Homma, K. Oka, *J. Chromatogr. B*, 695 (1997) 349-
420 353.
- 421 16. K. M. Patil, S. L. Bodhanka, *J. Pharma. Biomed. Analysis*, 39 (2005) 181–186.
- 422 17. L. HUA, M. Delgado, S. T. Iannaccone, L. J. Forman, C. M. Eggers, *Therap.*
423 *Drug Monit.*, 15 (1993) 317-327.
- 424 18. J. L. Maggs, M. Pirmohamed, N. R. Kitteringham, B. K. Park, *Drug Metab.*
425 *Dispos.*, 25 (1997) 275–280.
- 426 19. N. M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, *J. Chromatogr. A*, 1134 (2006) 101-
427 111.
- 428 20. G.F. van Rooyen, D. Badenhorst, K. J. Swart, H. K. Hundt, T. Scanes, A. F.
429 Hundt, *J. Chromatogr B*, 769 (2002) 1-7.
- 430 21. A. Frigerio, K. M. Baker, P. L. Morselli, *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 7
431 (1973) 125–134.
- 432 22. R. J. Perchalski, B. J. Wilder, *Clin. Chem.*, 20 (1974) 492–493.
- 433 23. T. A. Ternes, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 20 (2001) 419-434.
- 434 24. C. Wang, Z. Wang, D. Han, Q. Wu, X. Zang, *Anal. Letters*, 39 (2006) 1927-
435 1939.
- 436 25. T. Comoglu, N. Gönül, *Turk. J. Med. Sci.*, 35 (2005) 217-221.
- 437 26. M. S. Cámara, C. Mastandrea, H. C. Goicoechea, *J. Biochem. Biophys.*
438 *Method.*, 64 (2005) 153-166.

- 439 27. D. J. Turk, S. A. McClintock, W. C. Purdy, *Anal. Letters*, 18 (1985) 2605-2618.
- 440 28. Z. Q. Zhang, S. Z. Chen, W. L. Huang, F. Xu, *Yao Xue Xue Bao*, 28 (1993) 312-
441 316.
- 442 29. G. S. Moses, K. M. Rao, S. Rao, A. Ramachandraiah, *J. Indian Chem. Soc.*, 72
443 (1995) 333-337.
- 444 30. S. Lu, K. Wu, X. Dang, S. Hu, *Talanta*, 63 (2004) 653-657.
- 445 31. A. Merkoçi, M. Pumera, X. Llopis, B. Pérez, M. del Valle, S. Alegret, *TrAC*
446 *Trends in Analytical Chemistry*, 24 (2005) 826-838.
- 447 32. Z. Lin, G. Chen, *Talanta*, 70 (2006) 111-115.
- 448 33. L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, José M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta*, 622 (2008)
449 11-47.
- 450 34. R. N. Goyal, S. P. Singh, *Talanta*, 69 (2006) 932-937.
- 451 35. C. Li, *Microchim Acta*, 157 (2007) 21-26.
- 452 36. A. R. N. Hegde, N. P. Shetti, S. T. Nandibewoor, *Talanta*, 79 (2009) 361-369.
- 453 37. H. Jiang, Xue-Mei Wang, *Electrochem. Commun.*, 11 (2009) 126-129.
- 454 38. Y. Wu, S. Ye, S. Hua, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41 (2006) 820-824.
- 455 39. X. Yang, F. Wang, S. Hu, *Materials Science and Engineering C*, 28 (2008) 188-
456 194.
- 457 40. X. Wen, J. Fei, X. Chen, L. Yi, F. Ge, M. Huang, *Environmental Pollution*, 156
458 (2008) 1015-1020.

- 459 41. K. Balasubramanian, M. Burghard, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 452–468.
- 460 42. R. Mandrioli, F. Albani, G. Casamenti, C. Sabbioni, M. A. Raggi, J.
461 *Chromatogr. B*, 762 (2009) 109-116.
- 462 43. A. M. Brett, M. E. Ghica, *Electroanalysis*, 15 (2003) 1745-1750.
- 463 44. P. T. Kissinger, W. R. Heineman, *Laboratory Techniques in Electroanalytical*
464 *Chemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 1996.
- 465 45. Southampton Electrochemistry Group, *Instrumental Methods in*
466 *Electrochemistry*, 1st ed., Ellis Horwood, London, 1985.
- 467 46. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and*
468 *Applications*, 2nd ed., Wiley, New York, 2001.
- 469 47. K. G. David, *Cyclic Voltammetry Simulation and Analysis of Reaction*
470 *Mechanisms*, VCH Publishers, New York, 1993.
- 471
- 472
- 473
- 474
- 475
- 476
- 477

478 **Legends**

479 Fig. 1. Molecular structure of carbamazepine (CBZ).

480

481 Fig. 2. Cyclic voltammetric responses of 6.0×10^{-6} mol/L CBZ in 0.1 mol/L phosphate
482 buffer solution (pH 6.89) at (a) MWCNTs/DHP film coated GCE (8 μ L of dispersion)
483 and (c) bare GCE. The dotted lines (b) and (d) represent the corresponding blank
484 responses. $E_{eq} = -0.700$ V and $t_{eq} = 1$ s; Scan rate: 100 mV s^{-1} .

485

486 Fig. 3. (A) Effect of equilibration potential ($= E_{in}$) and (B) equilibration time, on the
487 anodic peak current of P-. [CBZ] = 6.0×10^{-6} mol L⁻¹ in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer
488 solution (pH 6.89) at MWCNTs/DHP film-coated GCE (8 μ L of dispersion). For (A) t_{eq}
489 = 1 s; For (B) $E_{eq} = E_{in} = -0.700$ V. Scan rate: 100 mV s^{-1} .

490

491 Fig. 4. Influence of solution pH on peak potential and peak current of peak P-. [CBZ] =
492 6.0×10^{-6} mol L⁻¹ in 0.1 mol L⁻¹ phosphate solutions at MWCNTs/DHP film-coated
493 GCE (8 μ L of dispersion). $E_{eq} = -0.700$ V, $t_{eq} = 1$ s; Scan rate: 100 mV s^{-1} .

494

495

496 Fig. 5. Plot of anodic peak potential (E_p) vs. $\log v$, where v is in Vs^{-1} . [CBZ] = $6.0 \times$
497 10^{-6} mol L⁻¹ in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 6.89) at MWCNTs/DHP film-
498 coated GCE (8 μ L of dispersion). $E_{eq} = -0.700$ V and $t_{eq} = 1$ s; Scan rate / V s^{-1} : 0.025;
499 0.050; 0.075; 0.100; 0.150; 0.200; 0.250; 0.300.

500

501

502 Fig. 6. Plot of $\log i_p$ vs. $\log v$. Same conditions as reported in Fig. 5.

503

504

505 Fig. 7. Peak current of P_a versus amount of MWCNT/DHP dispersion on the GCE
506 surface. [CBZ] = 6.0×10^{-6} mol L⁻¹ in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 6.89).
507 Same voltammetric conditions as in Fig. 2. The plot includes the equivalent anodic
508 response of CBZ at bare GCE.

509

510

511 Fig. 8. Calibration curve of carbamazepine, established by LSV, under the optimized
512 experimental conditions. Between each measurement the modified electrode was
513 maintained at *ocp* during 3 min. and constant rotation speed of 1000 rpm.

514

515

516 Fig. 9. Standard additions calibration curves for the determination of CBZ in (■)
517 Tegretol® tablet, and spiked wastewater (Δ). Each curve shows the analytical signal
518 (peak height) obtained with the respective sample solution at the modified GCE (10 μ L
519 of MWCNTs/DHP dispersion), before and after successive standard additions of 47.3
520 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CBZ working solution. Same voltammetric conditions as in Fig. 9. The inset
521 figure illustrates five polynomial baseline corrected oxidation peaks of CBZ, obtained
522 from the corresponding voltammograms of five Tegretol® tablet solutions (without and
523 with the four standard additions).

524

525 **Table 1.** Influence of potential interferents on the voltammetric response of 0.4 μM
526 CBZ (Molar ratio = 1:1).

527

528 **Table 2.** Determination of carbamazepine in Tegretol® and spiked wastewater samples.

529

Table

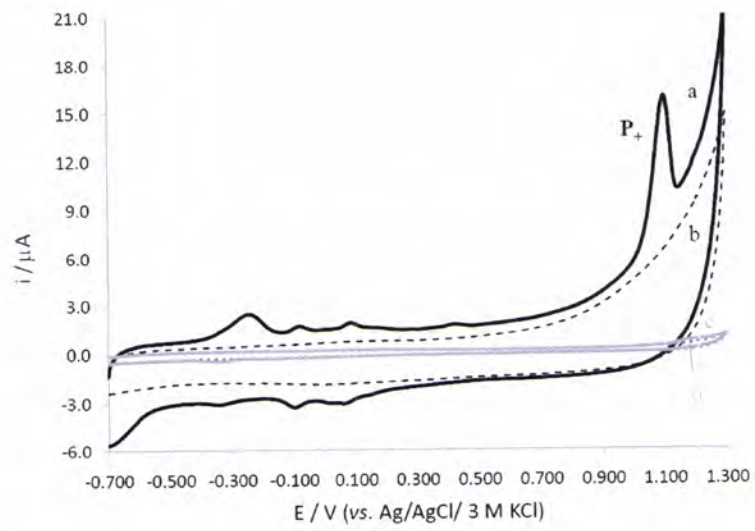
Potential interferents in wastewaters	Signal change (%)
Clofibric acid	-17.2
Ibuprofen	-5.3
Atenolol	-7.8
Diclofenac sodium	-38.6
Oxcarbazepine	-8.4

Table

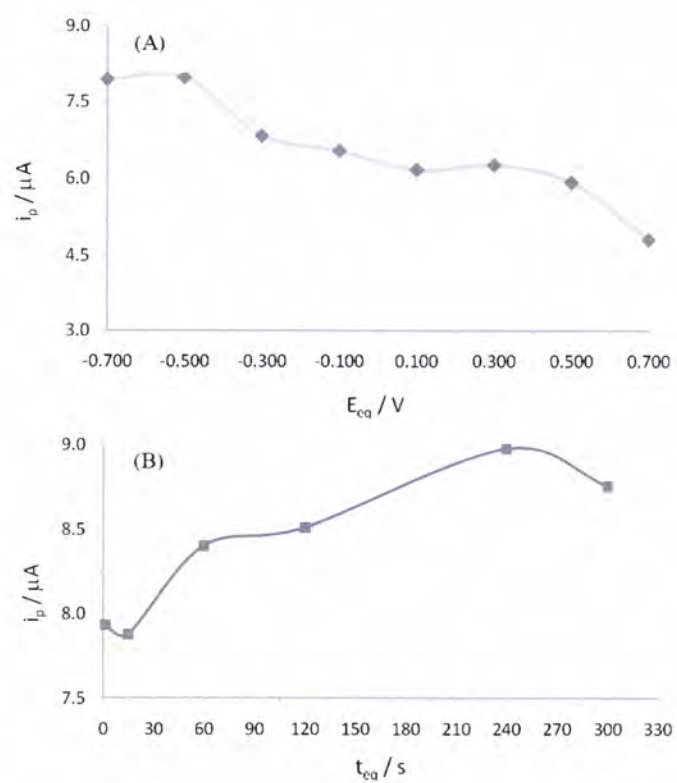
Sample	CBZ content	Found by			Recovery in this method (%)
		this method	HPLC	LC-MS	
Tegretol® 200	200 mg/tablet	201.1 mg/tablet ^a	185.2 mg/tablet	182.1 mg/tablet	100.6
Spiked wastewater	0.500 µg mL ⁻¹	0.479 µg mL ⁻¹ ^b	0.588 µg mL ⁻¹	0.558 µg mL ⁻¹	95.8

^a RSD = 2.20%; ^b RSD = 5.71%.

Figure

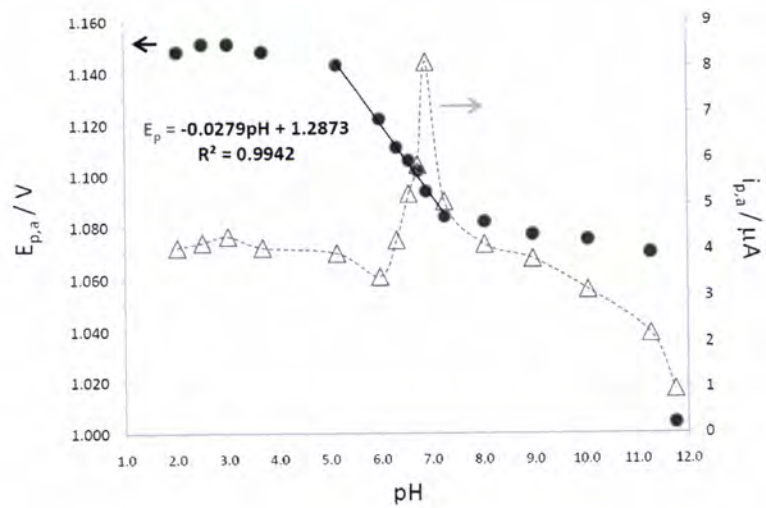
[Click here to download Figure: Fig 2.pdf](#)

Figure

[Click here to download Figure: Fig 3.pdf](#)

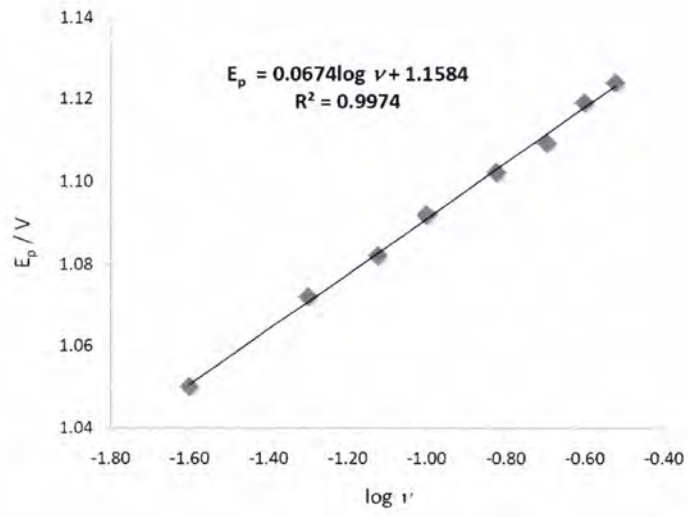
Figure

[Click here to download Figure: Fig 4.pdf](#)



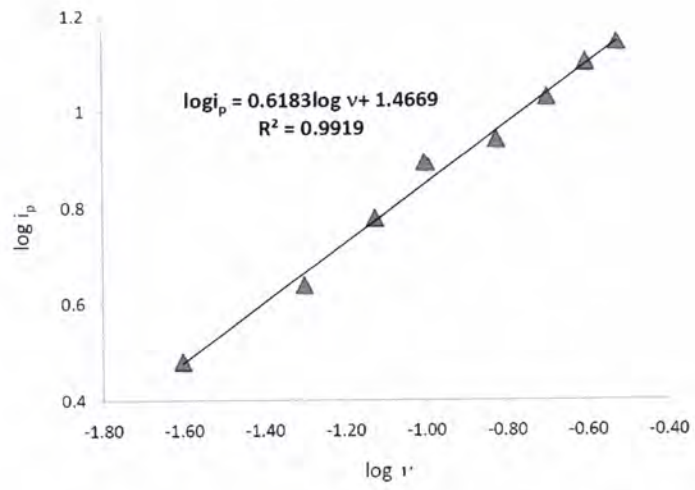
Figure

[Click here to download Figure: Fig 5.pdf](#)



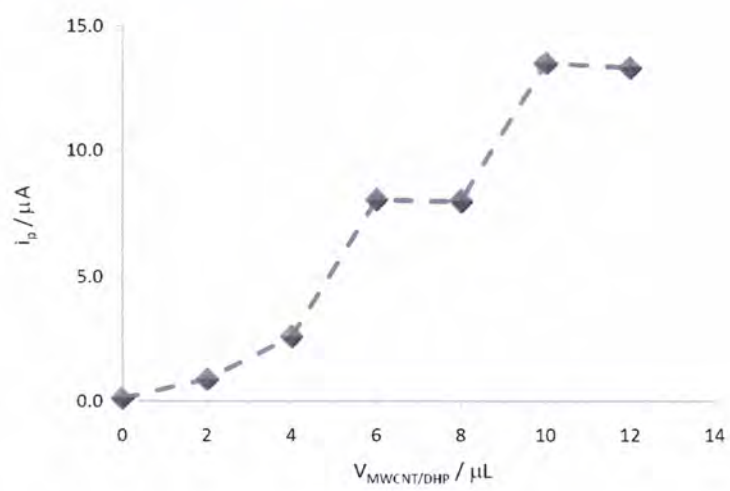
Figure

[Click here to download Figure: Fig 6.pdf](#)



Figure

[Click here to download Figure: Fig 7.pdf](#)



Figure

[Click here to download Figure: Fig 8.pdf](#)

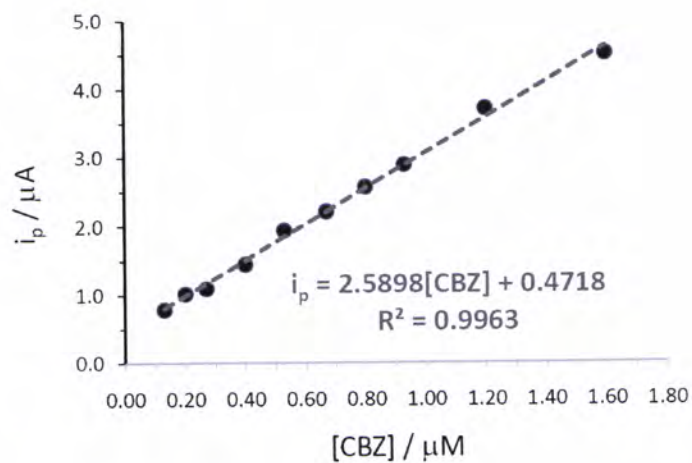


Figure
Click here to download Figure: Fig 9.pdf

