

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**LUIZ FERNANDO MENDES DE AZEVEDO**

**ELETROOXIDAÇÃO DE TADALAFILA EM ELETRODO  
DE CARBONO VÍTREO E DETERMINAÇÃO DIRETA EM FORMULAÇÃO  
FARMACÊUTICA POR VOLTAMETRIA**

**Alfenas, MG**

**2014**

**LUIZ FERNANDO MENDES DE AZEVEDO**

**ELETROOXIDAÇÃO DE TADALAFILA EM ELETRODO  
DE CARBONO VÍTREO E DETERMINAÇÃO DIRETA EM FORMULAÇÃO  
FARMACÊUTICA POR VOLTAMETRIA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

**Orientadora:** Profa. Dra. Alzira Maria Serpa Lucho

**Alfenas, MG**

**2014**

Azevedo, Luiz Fernando Mendes de.

Eletrooxidação de Tadalafila em eletrodo de carbono vitreo e determinação direta em formulação farmacêutica por voltametria / Luiz Fernando Mendes de Azevedo, Alfenas, MG. - 2014.

79 f. -

Orientadora: Alzira Maria Serpa Lucho

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Técnicas eletroquímicas. 2. Controle de qualidade. 3. Química - cinética. I. Lucho, Alzira Maria Serpa. II. Título.

CDD: 543

**LUIZ FERNANDO MENDES DE AZEVEDO**

**ELETROOXIDAÇÃO DE TADALAFILA EM ELETRODO  
DE CARBONO VÍTREO E DETERMINAÇÃO DIRETA EM FORMULAÇÃO  
FARMACÊUTICA POR VOLTAMETRIA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica

**Aprovado em: 16 de abril de 2014**

**Prof. Dr. Alzira Maria Serpa Lucho**

**Instituição: Universidade Federal de Alfenas**

**Assinatura:**



**Prof. Dr. Jerusa Simone Garcia**

**Instituição: Universidade Federal de Alfenas**

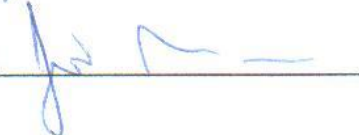
**Assinatura:**



**Prof. Dr. João Marcos Maduro.**

**Instituição: Universidade Federal de Uberlândia**

**Assinatura:**



**Alfenas, MG**

**2014**

**LUIZ FERNANDO MENDES DE AZEVEDO**

**Dedico a Deus, aos meus pais e irmãos, a  
minha esposa e amigos pelo apoio na  
realização deste trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, que durante todo esse trabalho e por toda a minha vida tem me acompanhado e iluminado.. obrigado por ter me dado a chance de viver e aprender, obrigado pelo alívio nos momentos difíceis e principalmente, e por diversas vezes, por ter me carregado em seus braços...
- A minha orientadora, Dra. Alzira Maria Serpa Lucho, e ao co-orientador Fábio Luís Pissetti, pela amizade, paciência, pelo apoio e conhecimento durante a realização deste trabalho. E pelo exemplo de simplicidade e sabedoria em encarar a vida.
- Aos meus pais, Idê e Luiz Gonzaga, meus exemplos maiores de amor, humildade, determinação e perseverança. EU AMO VOCÊS!!!
- Aos meus irmãos pelo apoio e confiança. Obrigado por acreditarem no meu potencial.
- À Bianca dos Reis Marcos: minha companheira de todas as horas, linda e livre da palavra Amor. Obrigado por fazer parte da minha vida e por todo companheirismo oferecido durante esta jornada, que também dedico a você...
- A minha sogra e familiares pelo apoio, incentivo e carinho durante todos esses anos.
- Aos colegas de trabalho, Rogério, José Roberto, Camila, Janaina, Kênia e Lucas, pela compreensão, pelo apoio, ensinamentos e pelo incentivo.
- A todos os funcionários da Universidade Federal de Alfenas que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho e por minha formação. Um agradecimento em especial aos professores “Jerusa Simone Garcia, Pedro Orival Luccas, Cláudio Viegas, Antônio Carlos Dorigueto, Eduardo Costa Figueiredo, Luciano Sindra Virtuoso, Keila Kill, Marcello Garcia Trevisan e Vanessa Giroto.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química pela oportunidade e política de incentivo à produção acadêmica.
- À todos aqueles que cruzaram a estrada da minha vida, deixando suas marcas e pegadas... os nomes de vocês talvez não estejam citados aqui, mas com certeza estão gravados no meu coração,
- À todos aqueles que partiram e deixaram saudades. Acredito que o reencontro é apenas uma questão de tempo...
- À CAPES, pela bolsa de estudo e oportunidade de viver integralmente o dia-a-dia de um laboratório de pesquisas.

**“A mente que abre a uma  
nova ideia jamais volta  
ao seu tamanho  
original.”**

*Albert Einstein*

## RESUMO

O mercado farmacêutico tem crescido muito nos últimos anos, com isso diversos produtos tem sido alvo de adulterações. Sendo assim, este trabalho teve como principal objetivo o estudo da formulação farmacêutica Cialis<sup>®</sup> o qual tem sido um dos alvos de falsificações. Este fármaco tem como princípio ativo a Tadalafila uma substância farmacêutica derivada do Sildenafil (Viagra) e do Vardenafil (Levitra). A Tadalafila é um potente inibidor seletivo da PDE5 (fosfodiesterase tipo 5), é amplamente empregado no tratamento de disfunção erétil e de hipertensão pulmonar arterial. Neste trabalho foi empregado o eletrodo de carbono vítreo para avaliar o comportamento da Tadalafila frente a processos de oxi-redução. Em um primeiro momento, foram realizados estudos cinéticos para a determinação do coeficiente de transferência de carga ( $\alpha$ ), o número de elétrons ( $n$ ) envolvidos na reação de oxidação da Tadalafila, o coeficiente de difusão ( $D$ ) e a constante heterogênea de transferência de elétrons ( $K$ ). Com a finalidade de quantificar a Tadalafila foi estabelecida uma nova metodologia analítica para a formulação farmacêutica (Cialis<sup>®</sup>) utilizando as técnicas de Voltametria de Pulso Diferencial e de Onda Quadrada, os limites de quantificação obtidos foram  $2,71 \times 10^{-6}$  e  $3,72 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Posteriormente, foram realizados estudos de possíveis interferentes presentes na formulação farmacêutica na proporção de 1:1 e 1:10. Os dados eletroquímicos obtidos foram comparados com dados de cromatografia líquida, os quais apresentaram uma boa correlação, indicando que o método eletroquímico proposto pode ser empregado no controle destas formulações.

Palavras-chaves: Técnicas eletroquímicas, Tadalafila, Controle de Qualidade, parâmetros cinéticos.

## ABSTRACT

The pharmaceutical market has grown in recent years and many products have been target of adulteration. The present work reports the study of the Cialis ® which has been one target of forgery. This drug has as active substance the Tadalafil, derived from Sildenafil (Viagra) and Vardenafil (Levitra). The Tadalafil is a potent selective PDE5 inhibitor (phosphodiesterase type 5), and is widely used to treat erectile dysfunction and pulmonary arterial hypertension. In this work, was employing glassy carbon electrode as working electrode to evaluate the oxidation-reduction processes of tadalafil. Initially was executed kinetic studies to determine the charge transfer coefficient ( $\alpha$ ), the number of electrons ( $n$ ) involved in the oxidation reaction, the diffusion coefficient ( $D$ ) and heterogeneous electron transfer constant ( $K'$ ). For quantify the Tadalafil was developed a new analytical methodology for pharmaceutical formulations (Cialis ®) using the techniques of differential pulse voltammetry and Square Wave, the limits of quantification obtained were  $2.71 \times 10^{-6}$  to  $3.72 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>, respectively. Studies were carried out with interferences present in the pharmaceutical formulation in the ratio 1:1 and 1:10. The electrochemical data were compared with liquid chromatography results, presenting a good correlation, indicating that the proposed electrochemical method can be used to control that pharmaceutical formulation.

Keywords: Electrochemical techniques, Tadalafil, Quality Control, kinetic parameters.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ANVISA</b>	- <i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
<b>ATR-FTIR</b>	- <i>Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
<b>CCDC</b>	- <i>Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
<b>CG-MS</b>	- <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>
<b>CYP3A</b>	- <i>Citocromo P450</i>
<b>DOSY</b>	- <i>Diffusion-ordered spectroscopy</i>
<b>DMF</b>	- <i>Dimetilformamida</i>
<b>DPV</b>	- <i>Differential Pulse Voltammetry</i>
<b>ECS</b>	- <i>Eletrodo de Calomelano Saturado</i>
<b>EDR</b>	- <i>Eletrodo de Disco Rotatório</i>
<b>FDA</b>	- <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FRX</b>	- <i>Fluorecencia de Rayos X</i>
<b>GCE</b>	- <i>Glassy Carbon Electrode</i>
<b>GMPc</b>	- <i>Guanosina cíclico monofosfato</i>
<b>GPES</b>	- <i>General Purpose Electrochemical System</i>
<b>IUPAC</b>	- <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>LC-MS/MS</b>	- <i>Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>
<b>LD</b>	- <i>Limit of Detection</i>
<b>LQ</b>	- <i>Limit of Quantification</i>
<b>MCR</b>	- <i>Multivariate Curve Resolution</i>
<b>PDE5</b>	- <i>Fosfodiesterase tipo 5</i>
<b>SCE</b>	- <i>Saturated Calomel Electrode</i>
<b>SWV</b>	- <i>Square Wave Voltammetry</i>
<b>HPLC</b>	- <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>UHPLC-DAD</b>	- <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection</i>
<b>UPLC-ESI/Q-Tof/MS</b>	- <i>High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry</i>
<b>UV</b>	- <i>Ultraviolet</i>

**VSC**

*-Video Spectral Comparator*

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	- Coeficiente de Transferência de Carga	—
$D$	- Coeficiente de Difusão	$\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$
$C$	- Concentração	$\text{mol.L}^{-1}$
$K'$	- Constante Heterogênea de Transferência de Elétrons	$\text{mol}^{-1}.\text{L.s}^{-1}$
$n$	- Número de elétrons	—
$\theta$	- Graus	—
$j$	- Densidade de Corrente	$\text{A.cm}^2$
$A$	- Área	$\text{cm}^2$
$V$	- Volts	V
$E$	- Potencial	Volts
$i$	- Corrente	A
$v$	- Velocidade de Varredura de Potencial	$\text{V.s}^{-1}$
$i_p$	- Corrente de pico	A
$\eta$	- Sobrepotencial	V
$T$	- Temperatura ambiente	K
$F$	- Constante de Faraday	$\text{C.mol}^{-1}$
$R$	- Constante dos Gases ideais	$\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$
$E_{1/2}$	- Potencial de meia onda	Volts
$i_L$	- Corrente Limite	A
$t$	- Tempo	S
$\omega$	- Velocidade de Rotação	$\text{rad.s}^{-1}$
$\nu$	- Viscosidade Cinemática	$\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$
$n$	- Número de réplicas	—
$i_K$	- Corrente Cinética	A
$I_d$	- Corrente Difusional	A
$s$	- Desvio Padrão	—
$S_{\text{agrupado}}$	- Desvio Padrão Agrupado	—
$\bar{x}$	- Média	—
$J_i(x,t)$	- Fluxo de Espécies por Área em um Determinado Tempo	$\text{A.cm}^2$
$\partial c/\partial x$	- Gradiente de Concentração da Espécie em Função da Área	—

***D<sub>i</sub>*** - Constante de Proporcionalidade entre o fluxo e o gradiente de concentração, conhecido como o coeficiente de difusão.  $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura da Tadalafila e sua forma comercializada no Brasil.....	20
Figura 2 –	Estrutura do carbono vítreo.....	25
Figura 3 –	Estrutura do carbono vítreo obtida por microscopia eletrônica de varredura de: (a) 10 e (b) 100 ppi (poros por polegada linear nominal).....	26
Figura 4 –	Espectro FTIR-ATR da Tadalafila.....	35
Figura 5 –	Difratograma da matéria prima do padrão de Tadalafila fornecido pela indústria farmacêutica Eurofarma (—). Difratograma da molécula de Tadalafila simulado a partir do software Mercury (—).....	37
Figura 6 –	Voltamogramas cíclicos do carbono vítreo, nas condições otimizadas (pH=7,00, tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> e velocidade de varredura 40 mVs <sup>-1</sup> ): (a) na ausência e (b) na presença de Tadalafila, 200 µmol.L <sup>-1</sup> .....	38
Figura 7 –	(A) Voltamogramas do GCE na presença de Tadalafila em função do pH em diferentes eletrólitos suporte, empregando a técnica de Voltametria de Onda Quadrada. (B).....	39
Figura 8 –	Relação pH vs. potencial de oxidação, e pH vs. corrente de pico de oxidação da Tadalafila. (Diferentes eletrólitos suporte 0,1 mol.L <sup>-1</sup> , ácido sulfúrico (pH 1), tampão acetato (pH 4), tampão fosfato (pH 7, 10,12) e hidróxido de sódio (pH 13), 200 µmol.L <sup>-1</sup> de Tadalafila).....	40
Figura 9 –	Mecanismo de oxidação da molécula de Tadalafila, com transferência de um próton e perda de um elétron (n=1e <sup>-</sup> ).....	41
Figura 10 –	(A) Voltamogramas cíclicos para o GCE em tampão fosfato (pH 7), contendo 200 µmol.L <sup>-1</sup> de Tadalafila, em diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 20, 40, 60, 80, 100, 120,140, 160, 180 e 200 mV.s <sup>-1</sup> ). (B) Relação linear entre densidade de corrente e raiz quadrada da velocidade.....	42
Figura 11 –	Voltamograma linear para o GCE em tampão fosfato pH 7, 200 µmol.L <sup>-1</sup> de Tadalafila, e v = 1 mV.s <sup>-1</sup> .....	44
Figura 12 –	Relação linear entre sobrepotencial (η) vs. logaritmo da corrente (log i), relação de Tafel.....	45
Figura 13 –	Relação linear entre E (potencial) e ln[(iL-i)/i], relação de Nernst.....	46

Figura 14 –	(A) Cronoamperogramas para o GCE em tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (pH 7), em diferentes concentrações de Tadalafila (0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 e 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> ) aplicando um potencial de 730 mV vs. ECS, durante 180 segundos. (B) Relação linear entre corrente (i) vs. o inverso da raiz quadrada do tempo (t <sup>-1/2</sup> ) obtida a partir dos cronoamperogramas em diferentes concentrações de Tadalafila.....	48
Figura 15 –	Linearização dos coeficientes angulares (Slope) das diferentes retas obtidas através das medidas de cronoamperometria vs. concentração de Tadalafila (0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 e 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> ).....	49
Figura 16 –	Voltamogramas para o GCE-RDE obtidos em diferentes velocidades de rotação (0, 50, 100, 200, 400, 600, 700, 800, 900 e 1000 rpm), na presença de 200 µmol.L <sup>-1</sup> de Tadalafila, em tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (pH 7). v = 10 mV.s <sup>-1</sup> , no intervalo de potencial entre 0,2 a 0,9 V.....	50
Figura 17 –	Diagrama de Levich, para a reação de oxidação da Tadalafila em eletrodo de carbono vítreo.....	51
Figura 18 –	Relação de Koutecký-Levich, linearização entre o inverso da corrente limite (i <sub>L</sub> <sup>-1</sup> ) vs. o inverso da raiz quadrada da velocidade de rotação (ω <sup>1/2</sup> ).....	53
Figura 19 –	(A) Voltamogramas cíclicos para o GCE, v=50 mV.s <sup>-1</sup> , no intervalo de 0 a 1,2 V; em diferentes concentrações de Tadalafila (40, 80, 119, 157, 196, 234 e 272 µmol.L <sup>-1</sup> ). (B) Curva analítica.....	55
Figura 20 –	(A) Voltamogramas de pulso diferencial para GCE, em diferentes concentrações de tadalafiala (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 215, 235, 250, 270 e 290 µmol.L <sup>-1</sup> ). (B) Curva analítica apresentando duas faixas lineares com seus respectivos coeficientes de correlação de 0,997 e 0,994.....	57
Figura 21 –	(A) Voltamogramas de onda quadrada realizadas no intervalo de 0,5 a 1,0 V; em diferentes concentrações de Tadalafila (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 215, 235, 250, 270 e 290 µmol.L <sup>-1</sup> ). (B) Curva analítica.....	59
Figura 22 –	Estudo de possíveis interferentes na determinação de Tadalafila na proporção 1:1 e 1:10 do analito:interferente.....	63
Figura 23 –	(A) Voltamogramas para a formulação farmacêutica (Cialis®) em tampão	

	fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (pH 7) empregando a técnica de Voltametria de Pulso Diferencial, (B) empregando a técnica de Voltametria Onda Quadrada.....	64
Figura 24 –	(A) Cromatogramas obtidos em diferentes concentrações de Tadalafila (5, 10, 30, 50,70, 90 e 100 µg.mL <sup>-1</sup> ) com um intervalo de corrida de 0 a 15 minutos e um tempo de retenção de 7,3 min. (B) Curva analítica apresentando um coeficiente de correlação de 0,998.....	66
Figura 25 –	Cromatograma (HPLC-UV/DAD) para a formulação Cialis®, apresentando um tempo de retenção de 7,3 minutos.....	67

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1	TADALAFILA .....	19
2.2	VOLTAMETRIA .....	22
2.3	ELETRODO DE CARBONO VÍTREO .....	24
3	<b>OBJETIVO</b> .....	27
3.1	OBJETIVO GERAL .....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
4	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	29
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES .....	29
4.2	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO .....	30
4.2.1	<b>Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho</b> .....	30
4.2.2	<b>Difração de raio X de pó</b> .....	31
4.3	ESTUDOS ELETROQUÍMICOS .....	31
4.4	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	32
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	34
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA TADALAFILA .....	34
5.1.1	<b>Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho</b> .....	34
5.1.2	<b>Difração de raio X de pó</b> .....	35
5.2	ESTUDO ELETROQUÍMICO .....	36
5.2.1	<b>Efeito do pH</b> .....	37
5.2.2	<b>Estudo da Velocidade de Varredura de Potencial</b> .....	40
5.2.3	<b>Determinação do número de elétrons</b> .....	43
5.2.3.1	Relação de Tafel .....	44
5.2.3.2	Relação de Nernst .....	45
5.2.4	<b>Cronoamperometria</b> .....	46
5.2.5	<b>Análise Hidrodinâmica</b> .....	49
5.2.6	<b>Parâmetros analíticos</b> .....	53
5.2.6.1	Voltametria Cíclica .....	54

5.2.6.2	Voltametria de Pulso Diferencial .....	56
5.2.6.3	Voltametria de Onda Quadrada .....	58
5.2.6.4	Relação analítica das técnicas eletroquímicas .....	60
5.2.7	<b>Análise de Interferentes</b> .....	62
5.3	<b>QUANTIFICAÇÃO EM FORMULAÇÕES DE Cialis®</b> .....	63
5.3.1	<b>Quantificação de Tadalafila por Voltametria</b> .....	63
5.3.2	<b>Quantificação de Tadalafila por HPLC</b> .....	65
5.4	<b>TESTE ESTATÍSTICO</b> .....	67
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

A sociedade contemporânea vive uma terceira revolução industrial, chamada técnico-científica, datada aproximadamente de 1950 em diante. Diferencia-se das outras duas anteriores por ter como principais matérias-primas o conhecimento, a criatividade e a inovação. Por meio disso buscam-se novas formas de produção, novas maneiras de se lucrar inventando-se novas tecnologias.<sup>1</sup>

Atualmente um dos grandes problemas desta nova modernidade tem sido o grande número de medicamentos falsificados que está aumentando nos últimos anos, tornando-se um negócio lucrativo de bilhões de dólares que ameaça a efetiva prestação de serviço de saúde.<sup>2</sup> Assim, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) medicamentos falsificados são aqueles que são deliberados e fraudulentamente mal etiquetado em relação à identidade e/ou a fonte.

Na busca de manter a sua margem de lucro, os fabricantes de produtos farmacêuticos falsificados continuarão a desenvolver engenhosas maneiras de burlar os sistemas de regulação. Portanto, os esforços incansáveis devem continuar na implantação e desenvolvimento de pesquisa de novos métodos analíticos que sejam de baixo custo, de fácil execução e eficientes para detectar medicamentos falsificados em diferentes estágios de sua existência. Infelizmente, essa situação está longe de ser melhorada devido à falta de medidas estratégicas e eficientes amplamente adequadas que permita ações rápidas das agências reguladoras com base em análise científica, a preços acessíveis em todo a cadeia de fornecimento de princípios ativos.<sup>3</sup>

Assim a química analítica tem um papel importante no desenvolvimento de novos métodos instrumentais para a análise, quantificação e controle de novas formulações. Os métodos mais empregados atualmente em produtos farmacêuticos para análise em laboratório estão distribuídos nas seguintes categorias básicas: cromatografia, espectrofotometria de infravermelho e Raman, difração de raios X e ressonância magnética nuclear. Cabe ressaltar que entre tantas técnicas, a mais empregada é a cromatografia a qual apresentam algumas desvantagens no processo de análise como derivatização ou procedimentos de extração no preparo da amostra. A qual possui um alto custo de aquisição de instrumentação e de funcionamento. Assim o uso das técnicas eletroquímicas podem ser alternativas interessantes, especialmente aquelas baseadas em técnicas eletroanalíticas, devido a sua simplicidade instrumental, rapidez, sensibilidade, portabilidade além de ter um custo moderado.<sup>4</sup> Dessa

forma a eletroquímica tem muitas vantagens, tornando-se uma atraente escolha para a análise farmacêutica. Portanto, este trabalho tem como principal objetivo desenvolver uma nova metodologia analítica para controle de qualidade e determinação de Tadalafila (Cialis®) em formulações farmacêuticas, uma vez que este produto tem sido alvo de grande número de falsificações e adulterações.<sup>5</sup> O método proposto é desenvolvido a partir de técnicas eletroquímicas utilizando o eletrodo de carbono vítreo (GCE - *Glassy Carbon Electrode*) como eletrodo de trabalho, eletrodo de calomelano saturado (SCE - *Saturated Calomel Electrode*) com KCl como eletrodo de referência, e eletrodo de platina como contra eletrodo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O levantamento bibliográfico foi realizado sobre os principais pontos envolvidos neste projeto como estudos sobre o analito em questão, a Tadalafila, técnicas de voltametria e eletrodo de carbono vítreo.

### 2.1 TADALAFILA

Nos últimos anos alguns medicamentos inibidores seletivos, da enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) tem sido lançados no mercado, tais como o Sildenafil (Viagra), Vardenafil (Levitra) e a Tadalafila (Cialis). Sendo que o primeiro inibidor da PDE5 aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos foi o Sildenafil em março de 1998,<sup>6</sup> o Vardenafil em março de 2003 e em novembro desse mesmo ano foi aprovado a Tadalafila.<sup>7</sup>

No mercado farmacêutico brasileiro são comercializadas, na forma de comprimidos perorais, as especialidades farmacêuticas Viagra<sup>®</sup> (Pfizer) – contendo a sildenafil na forma do sal citrato, e Cialis<sup>®</sup> (Eli Lilly) – contendo a Tadalafila na forma de base.<sup>8</sup>

A fórmula química da Tadalafila é  $C_{22}H_{19}N_3O_4$ , e seu nome oficial segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) é (6*R*,12*aR*)-6-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-metil-2,3,6,7,12,12*a*-hexahidropirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-*b*]indol-1,4-diona. Sua massa molecular é 389,41 g.mol<sup>-1</sup>. Os comprimidos de Tadalafila são revestidos e têm cor amarela.<sup>9</sup> A Tadalafila tem uma estrutura que apresenta diferentes grupos funcionais como aminas e cetonas; os quais podem sofrer processos de oxidação e/ou redução (FIGURA 1).

**Figura 1** - Estrutura da Tadalafila e sua forma comercializada no Brasil.



Fonte: ORTIZ, R. S.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R. 2010, p. 389.

A Tadalafila é um potente inibidor seletivo da Fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), uma enzima encontrada principalmente nas paredes das artérias do pênis e dos pulmões e responsável pela degradação do guanosina cíclico monofosfato (GMPc) no corpo cavernoso. A estrutura química da Tadalafila possui certa semelhança à estrutura do GMPc, e compete com esse pela ligação à enzima PDE5.<sup>10</sup> Dessa forma, como é um medicamento que atua tanto no pênis quanto no pulmão, este medicamento foi aprovado pelo FDA em 2003 para o tratamento de disfunção erétil,<sup>11-13</sup> e em 2009 para o tratamento de hipertensão pulmonar arterial.<sup>14-22</sup>

A estrutura química e o perfil farmacocinético de tadalafil diferem significativamente com os de sildenafil e vardenafil, embora eles sejam classificados na mesma categoria farmacológica. Após a administração oral de uma dose de 20 mg à indivíduos saudáveis, a Tadalafila é rapidamente absorvida com o pico de concentração plasmática de 378 ng/mL em aproximadamente 2 h, sendo que o tempo de meia vida-vida no plasma é de 17,5 h e sua eficácia é mantida por um máximo de 36 a 48 h. Neste sentido, a Tadalafila é o medicamento preferido como uma alternativa terapêutica para o tratamento de disfunção erétil em homens, pois proporciona um tempo de ereção maior que o sildenafil e o vardenafil que são de 12 horas.<sup>12,13,23</sup> Essa droga é predominantemente metabolizada pelo citocromo P450 (CYP3A) no fígado, sendo eliminada principalmente nas fezes e urina.<sup>24,25</sup>

Entretanto, vale ressaltar que tal medicamento causa efeitos colaterais como dor de cabeça, rubor facial, náusea, dispepsia, dor abdominal, distúrbios visuais, dores musculares, hipertensão, taquicardia e, raramente, ataque cardíaco. Portanto os medicamentos inibidores da PDE5 são fármacos sujeitos a prescrição médica.<sup>7,26</sup>

Apesar dos efeitos colaterais a Tadalafila é um medicamento amplamente empregado no Brasil para o tratamento de disfunção erétil, alcançando grande sucesso no mercado. Não obstante o seu alto preço e do constrangimento associado com a doença, esses fatos tem levado as pessoas a comprar este medicamento na internet, e como consequência temos um grande número de versões falsificadas desse medicamento com apreensões desde 2005 até os dias atuais.<sup>27-29</sup>

Neste contexto, de acordo com o relatório da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 1998 a 2012, foram registrados 126 casos de produtos falsificados sendo que 93 são de medicamentos, e 38 (41%) deste são falsificações do Cialis®.<sup>27</sup> Tais dados devem ser apenas uma pequena amostra do mercado real, uma vez que o número de apreensões deve ser bem maior. Além do aspecto criminal, o comércio ilegal desses produtos pode causar sérios problemas de saúde. Uma vez que a produção de drogas ilícitas não tem nenhuma inspeção governamental com controle de qualidade adequado, o que geralmente conduz a comprimidos com doses diferentes dos especificados nas embalagens.<sup>2</sup>

Nos últimos anos, vários trabalhos foram publicados relatando casos de identificação de Tadalafila e análogos em formulações farmacêuticas, e em suplementos alimentares como adulterantes.<sup>2,5,30-34</sup> Neste sentido a literatura também relata diversos trabalhos empregando a quantificação de Tadalafila, tais como o processamento de imagem e análise estatística, utilizando imagens de alta resolução obtidas a partir de um comparador espectral de vídeo VSC 5000 (VCS - *Video Spectral Comparator*),<sup>5</sup> usando imagens de microscopia de Raman com o método quimiométrico de resolução de curvas multivariadas (MCR - *Multivariate Curve Resolution*),<sup>35</sup> eletroforese capilar,<sup>36</sup> aplicação de espectrometria de fluorescência de raios X (FRX - *Fluorecencia de Rayos X*),<sup>37</sup> utilização de espectrometria de absorção e emissão atômica,<sup>38</sup> a utilização de espectroscopia de Raman com ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e difusão ordenada de espectroscopia de RMN 2D (DOSY - *Diffusion-Ordered Spectroscopy*),<sup>39</sup> utilização de espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier com reflexão total atenuada (FTIR/ATR- *Fourier Transform Infrared Spectroscopy Attenuated Total Reflection*) combinado com técnicas de análise multivariada,<sup>30</sup> cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (UV - *Ultraviolet*),<sup>9,10</sup> cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência,<sup>40</sup> aplicação da técnica de cromatografia líquida de ultra-alta pressão com arranjo de díodos (UHPLC/DAD - *Ultra High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*),<sup>8</sup> cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa sequencial (CG/MS - *Gas Chromatography Mass Spectrometry*),<sup>7</sup> a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por

espectrometria de massa com ionização (LC/ESI/MS/MS – *Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*),<sup>33,41</sup> cromatografia líquida com espectrometria de massa tandem (LC/MS/MS - *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*),<sup>32,42</sup> cromatografia líquida de ultra-alta pressão com detecção por arranjo de díodos acoplado com ionização por eletrospray e espectrometria de massas no modo de íon positivo e tempo de vôo (UPLC/ESI/Q-ToF/MS - *High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry*).<sup>2</sup>

Tais técnicas apresentam alto custo de instrumentação e manutenção, quando comparadas as técnicas eletroquímicas. Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo desenvolver um método eletroquímico para a determinação do princípio ativo Tadalafila em formulações farmacêuticas empregando eletrodo de carbono vítreo.

## 2.2 VOLTAMETRIA

A voltametria é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica constituída de pelo menos dois eletrodos. O potencial é aplicado entre os dois eletrodos em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente. A curva corrente vs. potencial obtida é chamada de voltamograma.<sup>43</sup>

As técnicas mais utilizadas atualmente são as voltamétricas, a voltametria cíclica, a de pulso diferencial e a de onda quadrada. Na voltametria cíclica tem-se a aplicação de um potencial contínuo em função do tempo, tanto no sentido anódico quanto no catódico. E as técnicas de Voltametria de Pulso, onde a perturbação do potencial do eletrodo não é uma função linear do tempo do experimento, cujas respostas de corrente obtidas dependem de como estes pulsos são aplicados. Portanto, é exatamente a diferença na maneira de aplicar os pulsos de potencial é que define as características básicas de cada uma destas técnicas.<sup>44</sup> Sendo que as técnicas de voltametria de pulso mais utilizada são a Voltametria de Pulso Diferencial (DPV - *Differential Pulse Voltammetry*) e a Voltametria de Onda Quadrada (SWV - *Square Wave Voltammetry*).<sup>45</sup> A técnica de Voltametria de Onda quadrada tem recebido

maior atenção nos últimos anos devido a sua rapidez e aos limites de detecção que podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas, sendo empregada para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos.<sup>46-48</sup> Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanismo do processo de transferência de elétrons em estudo.<sup>49</sup> Uma grande vantagem dessa técnica consiste na possibilidade da análise ser realizada diretamente na amostra, sem a necessidade de etapas de purificações ou de separações prévias, além de tornar possível a análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas.<sup>44</sup>

As técnicas eletroanalíticas demonstram ser excelentes para a determinação de compostos farmacêuticos em diferentes matrizes. Muitos dos constituintes ativos das formulações, em contraste com os excipientes, podem ser facilmente oxidados ou reduzidos. A seletividade destes métodos é excelente, porque normalmente a substância a analisar pode ser prontamente identificada pelo seu potencial de oxidação ou redução. Neste sentido vale ressaltar que o avanço das técnicas eletroquímicas no campo da análise de medicamentos é devido sua simplicidade, baixo custo, e baixo tempo relativo de análise em comparação com outras técnicas como cromatográficas e espectroscópicas.<sup>19</sup>

Lembrando que atualmente tem se utilizado diferentes tipos de eletrodos para medições eletroanalíticas, como o eletrodo de mercúrio,<sup>50</sup> eletrodos sólidos,<sup>51,52</sup> eletrodos modificados,<sup>53</sup> e eletrodos de pasta de carbono.<sup>54-56</sup> Entretanto, os eletrodos sólidos comercializados atualmente podem ou não ser aplicados diretamente para a determinação de uma determinada substância química sem necessidade de nenhum tratamento da superfície eletrodica. A dependência ou não de modificação na superfície eletródica está relacionada com a ocorrência de uma interação do analito com a superfície do eletrodo para que ocorra a transferência do elétron. Quando não há a necessidade de modificação o sistema apresenta uma grande vantagem, pois a execução das medidas será mais rápida e o método proposto será de fácil execução, levando a uma maior confiabilidade nos dados. Assim este trabalho tem como objetivo utilizar o eletrodo de carbono vítreo para determinação do princípio ativo Tadalafila em formulações farmacêuticas de Cialis®.

### 2.3 ELETRODO DE CARBONO VÍTREO

Os materiais carbonosos naturais e sintéticos podem ser constituídos de camadas de planos de hexágonos de carbono arranjados em orbitais  $sp^2$  com diferentes graus de ordenação, tendo a estrutura básica semelhante a da grafite, ou formados por ligações  $sp^3$  (estrutura do diamante) ou, ainda, pela mistura de ligações  $sp^3$  e  $sp^2$ , como, por exemplo, os carbonos tipo diamante. Dentre os diversos compostos a base de carbono, pode se ressaltar os carbonos poliméricos, os quais apresentam estrutura básica similar à do grafite, e podem apresentar-se como adsorventes poderosos, com uma grande área superficial interna, na forma de carbono vítreo monolítico.<sup>57</sup>

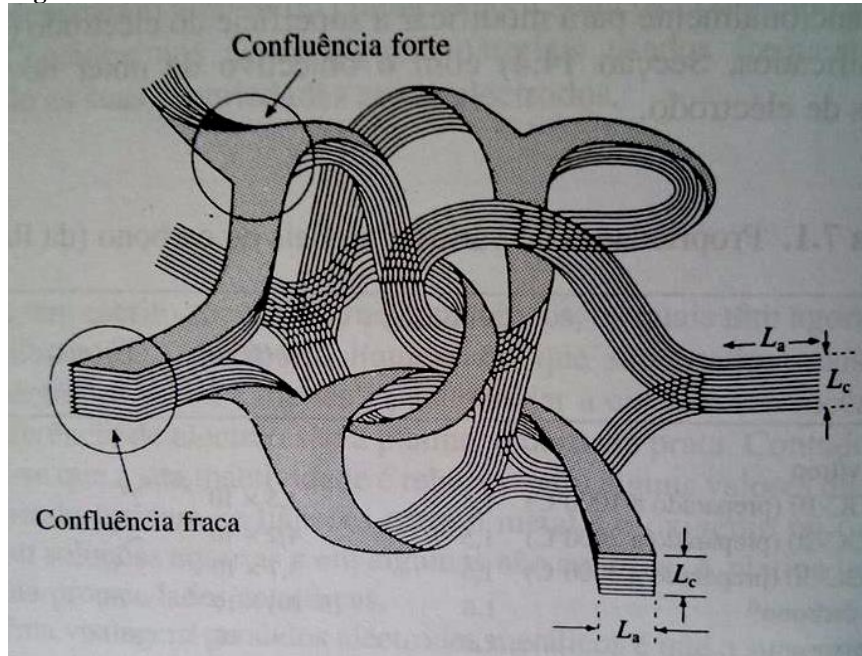
O Carbono vítreo é um material que se caracteriza por ser isotrópico, não grafítizável; obtido, normalmente, pelo tratamento térmico entre 1000 a 1400°C, na ausência de oxigênio (tratamento de carbonização), de determinados polímeros termorrígidos, destacando-se as resinas fenólicas e furfurílicas. Neste sentido vale destacar que para a obtenção do carbono vítreo é necessário que as matérias-primas ao serem carbonizadas apresentem um teor residual em carbono da ordem de 50% em massa, em relação ao precursor inicial. O uso destas resinas é atribuído ao fato de seus teores residuais em carbono estarem em torno de 50% e, também, devido aos seus elevados graus de ligações cruzadas. Na carbonização, o teor residual em carbono é a quantidade de material resultante após a eliminação de possíveis átomos de oxigênio, enxofre, hidrogênio e nitrogênio e de parte do carbono das moléculas do precursor polimérico.<sup>58</sup>

O carbono vítreo pode estar na forma monolítica, isento de poros de transporte ou na forma reticulada, como espumas ricas em poros de transporte, conhecidas como carbono vítreo reticulado. Sendo que este é o mais empregado para desenvolvimento de superfícies eletródicas, como o eletrodo de carbono vítreo.<sup>59</sup> Apesar do nome, esse material não é um vidro do ponto de vista de sua estrutura cristalográfica, pois o arranjo dos átomos de carbono apresenta uma ordenação a longa distância em duas direções. O nome vítreo deve-se ao aspecto brilhante que o material adquire quando recebe polimento e também pelo fato de sua fratura ser semelhante à do vidro.<sup>58</sup>

Esse material pertence à classe dos materiais frágeis e as suas propriedades mecânicas são influenciadas pelo volume e dimensões de seus poros. Dentre os vários estudos realizados para a proposição de um modelo estrutural que explicasse as características do carbono vítreo,

o proposto por Jenkins e Kawamura<sup>58</sup> (1976 apud FERRARI, 1998) foi o mais simplificado, onde  $L_c$  representa a altura do empilhamento de planos (FIGURA 2).

**Figura 2** - Estrutura do carbono vítreo.

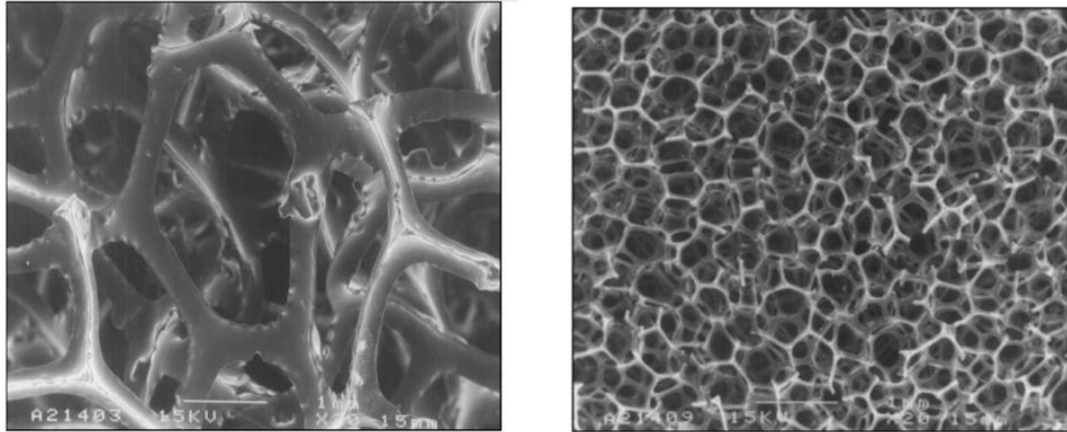


Fonte: FERRARI, P. E.; REZENDE, M. C., 1998, p. 30.

Este modelo veio a ser confirmado e complementado por Rousseaux e Tchoubar, que fizeram medidas de difração de raios-X e estudos por microscopia eletrônica de transmissão.<sup>59</sup> Em 2004 novos estudos também foram realizados por microscopia eletrônica de varredura por Friedrich et al. confirmando a estrutura em forma de colmeia do carbono vítreo (FIGURA 3).<sup>60</sup>

Tais estudos mostraram que o carbono vítreo não é totalmente amorfo, ou melhor, ele possui uma estrutura de planos de carbono, que se assemelha a fitas entrelaçadas, apresentando ordenação bidirecional desses planos e arranjo ao acaso na terceira direção.

**Figura 3** – Estrutura do carbono vítreo obtida por microscopia eletrônica de varredura de: (a) 10 e (b) 100 ppi (poros por polegada linear nominal).



(a) 1 mm —

(b) 1 mm —

Fonte: FRIEDRICH, J. M. et al., 2004, p. 204.

Este material apresenta propriedades semicondutoras, reduzida densidade, alta resistência à corrosão e estrutura rígida de área superficial elevada. O carbono vítreo reticulado também apresenta a menor resistividade elétrica específica entre os materiais carbonosos, em torno de  $40 \times 10^{-6} \Omega\text{m}$ . E tem aproximadamente de 96 a 98% do volume consistindo em poros abertos devido às matrizes porosas usadas como substratos de ancoragem.<sup>61</sup>

Portanto, a partir das características elétricas, entende-se o porquê deste material ser amplamente estudado sendo aplicado em diversas áreas principalmente como eletrodos na área analítica, para a determinação de metais,<sup>62-66</sup> e compostos orgânicos.<sup>51, 67,68</sup>

### 3 OBJETIVO

Este projeto tem como objetivo avaliar o comportamento eletroquímico da Tadalafila frente à diferentes valores de pH, determinar parâmetros cinéticos e analíticos como faixa linear, limite de detecção e quantificação.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a quantificação de Tadalafila em formulação farmacêutica (Cialis<sup>®</sup>), empregando técnicas eletroquímicas e avaliar os parâmetros cinéticos para um melhor entendimento do processo de oxidação.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O trabalho tem como objetivos específicos as seguintes etapas:

- a) Avaliação do pH utilizando diferentes tipos de eletrólito frente ao processo de oxidação do analito.
- b) Determinação de parâmetros cinéticos relacionados ao processo de oxidação do analito, como número de elétrons ( $n$ ), coeficiente de difusão ( $D$ ), coeficiente de transferência de carga ( $\alpha$ ) e a constante de velocidade de reação ( $K$ ).
- c) Determinação do analito empregando as técnicas de Voltametria Cíclica, Pulso Diferencial e Onda Quadrada, e determinação dos parâmetros analíticos como faixa linear, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).
- d) Estudo de possíveis interferentes, ou excipientes presentes na formulação.
- e) Determinação do analito empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), e determinação dos parâmetros analíticos como faixa linear, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

- f) Determinação de Tadalafila em formulações farmacêuticas empregando as técnicas de Voltametria Pulso Diferencial e Onda Quadrada, e por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).
- g) Aplicação de teste  $t$ , para comprovar a correlação entre os valores encontrados.

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Esta seção tem como principal importância trazer todo o conteúdo referente à parte experimental deste projeto, tais como reagentes e concentrações, bem como os equipamentos utilizados e toda instrumentação.

### 4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Neste trabalho, o fármaco Tadalafil, 99% de pureza, (lote 195749) foi obtido por doação do Laboratório Eurofarma Ltd., Brasil. Antes de iniciar o estudo foi obtido o espectro de infravermelho no UV e no visível do fármaco, e difração de raio X de pó, seguido da comparação do resultado obtido com a literatura.<sup>69</sup> A solução estoque de Tadalafil de concentração  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  foi preparada em solvente dimetilformamida ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ ) e armazenada em geladeira. Os excipientes farmacêuticos empregados (99% de pureza) foram estearato de magnésio (Indukern, Brasil, lote C216000), lauril sulfato de sódio (BASF, Brasil, lote 8625338), celulose microcristalina (Blanver, Brasil, lote 135000020), lactose monohidratada (M Cassab, Brasil, lote 1320013819), dióxido de titânio (Blanver, Brasil, lote 160833), Hidroxi Propil Metil Celulose (Blanver, Brasil, lote 208846), Hipromelose (Blanver, Brasil, lote 1006000367), Dióxido de silício (Blanver, Brasil, lote 178288), Óxido de Ferro III (Blanver, Brasil, lote 163953) e Croscamelose Sódica (Ache, Brasil, lote 8510051061). As soluções dos excipientes foram preparadas a uma concentração de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , pela solubilização em dimetilformamida e filtração em papel filtro.

Todas as outras soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico, não sendo aplicado nenhum processo de purificação. Todas as soluções foram preparadas empregando-se água deionizada, proveniente de um sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore®, Bedford, MA, USA), resistividade de  $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ . A solução de  $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$  de ácido sulfúrico (pH 1) foi preparada utilizando como componentes o ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Vetec). A solução de  $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$  de tampão acetato (pH 4) foi preparada utilizando como componente o ácido acético ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ , Sigma Aldrich). A solução de  $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$  de tampão fosfato (pH 7) foi preparada utilizando como componente o fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Vetec). A solução de  $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$  de tampão fosfato (pH 10 e 12) foi preparada

utilizando como componente o fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Vetec). A solução de  $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$  de hidróxido de sódio (pH 13) foi preparada utilizando como componente o hidróxido de sódio (NaOH, Sigma Aldrich). O ajuste do pH das soluções foi realizado utilizando soluções  $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$  de HCl ou NaOH de acordo com a necessidade.

Todas essas soluções tiveram seus valores de pH ajustados utilizando um pHmetro (Marconi). O pHmetro foi diariamente calibrado com soluções tampão comerciais de pH 4,0 e 7,0 (Vetec). Todos os experimentos foram executados em temperatura ambiente.

Os solventes acetonitrila e metanol empregados na análise por cromatografia possuem grau HPLC. O acetato de sódio e o ácido fórmico empregados no preparo das soluções apresentam grau analítico da Sigma Aldrich.

## 4.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

A caracterização do fármaco Tadalafila fornecido pela indústria farmacêutica Eurofarma foi realizada por Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho e por Difração de raio X de pó, com a finalidade de confirmar a cristalinidade, pureza e a presença de grupamentos característicos do princípio ativo em questão.

### 4.2.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados com um espectrômetro Thermo Scientific, modelo Nicolet iS50 FT-IR, acoplado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR - *Attenuated Total Reflection*), modelo Gladi ATR, Pike Technologies. As análises foram realizadas com um cristal de diamante. Foram realizados 50 scans de interferogramas proporcionando uma resolução espectral de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . As análises começaram com a aquisição de um espectro de fundo com o acessório ATR sozinho na posição correta no compartimento de amostra. Os espectros obtidos foram corrigidos pela subtração automática do espectro de fundo e registrados no intervalo entre  $4000\text{-}525 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.2 Difração de raio X de pó

Ensaio de Difractometria de Raio X de pó foram realizados utilizando um difratômetro Ultima IV - Rigaku, operando a 40 KV e 30 mA, com fonte de radiação de Cu K $\alpha$ . As medições de  $2\theta$  variaram entre 5° e 35° ( $\pm 0,02$ ).

#### 4.3 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS

Para as medidas eletroquímicas de Cronoamperometria, Voltametria Linear, Voltametria Cíclica, Voltametria de Pulso Diferencial e Voltametria de Onda Quadrada, foi utilizado o potenciostato/galvanostato Autolab® PGSTAT 128N (Eco Chemie). A aquisição dos dados e o gerenciamento do potenciostato foram realizados por um microcomputador e mediante programa computacional (GPES - *General Purpose Electrochemical System*). Os parâmetros instrumentais seguintes foram utilizados para registrar os voltamogramas de pulso diferencial: 100 mV de amplitude do pulso, tempo de modulação de 0,4 segundos, intervalo de tempo de 0,9 segundos e 10,5 mV de intervalo de potencial. Os parâmetros instrumentais empregados para a técnica de onda quadrada foram: 10 mV de amplitude da onda quadrada, 60 Hz de frequência e 10 mV de intervalo de potencial.

A célula eletroquímica utilizada para as medidas eletroquímicas foi uma célula convencional de vidro de 100 mL contendo três eletrodos. Os estudos foram realizados utilizando o eletrodo de carbono vítreo (GCE) (RDE 0008, com 4,0 mm de diâmetro) como eletrodo de trabalho, um eletrodo de calomelano saturado (ECS) como referência e um fio de platina como contra-eletrodo. Como eletrólito suporte foi utilizado 45 mL de uma solução Tampão de concentração 0,10 mol.L<sup>-1</sup> e 5 mL do solvente dimetilformamida. Os tampões utilizados foram ácido sulfúrico (pH 1), tampão acetato (pH 4), tampão fosfato de sódio monobásico (pH 7), tampão fosfato de sódio dibásico (pH 10 e 12) e hidróxido de sódio (pH 13).

A determinação de Tadalafila em formulações através de medidas eletroquímicas foi realizada através da solubilização do fármaco em dimetilformamida. Foram solubilizados 75 mg de Cialis® em 5 mL de dimetilformamida (DMF – *Dimethylformamide*) e 500  $\mu$ L da solução foram adicionados ao eletrólito suporte (50 mL) para posterior quantificação. Em

seguida foram realizadas medidas eletroquímicas empregando as técnicas de pulso diferencial e onda quadrada. O medicamento Cialis® (20 mg, Eli Lilly do Brasil Ltda, lote C096214) foi adquirido em farmácias comercial da cidade de Alfenas-MG. Foram preparadas cinco amostras diferentes.

Para realizar as medidas de estudo cinético foi empregado um disco rotatório (Modelo 616, EG&G PARC) com o eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de calomelano saturado como referência. O eletrodo de carbono vítreo utilizado foi do tipo RDE 0008, com 4,0 mm de diâmetro sobre um cilindro de teflon. Cabe ressaltar que antes de iniciar qualquer análise o eletrodo de carbono vítreo era polido com sílica alumina e posteriormente lavado com água e posteriormente com álcool isopropanol em banho ultrassom por 5 minutos. Foram realizadas medidas de Voltametria Linear no intervalo entre 0,2 a 0,9 V; a corrente foi medida em uma solução contendo 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de Tadalafila, com uma velocidade de varredura de potencial de 10  $\text{mV.s}^{-1}$ , em função da velocidade de rotação. As medidas foram realizadas em diferentes rotações 50, 100, 200, 400, 600, 700, 800, 900 e 1000 rpm. A corrente limite foi estabelecida no potencial de 840 mV.

#### 4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As análises foram realizadas em um cromatógrafo (Shimadzu LC-PDA), com uma coluna LC-18 (250 mm x 4,6 mm de diâmetro, 5 mm) da Supelco (Bellefonte, EUA), sendo o detector SPD-10 UV-DAD.

A fase móvel empregada foi acetonitrila (A) e uma solução aquosa (B) contendo 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  de acetato de amônio e 0,2% (v/v) de ácido fórmico. O gradiente de eluição foi programado da seguinte forma: foi mantido a 35% dentro dos primeiros 10 minutos, depois aumentou linearmente para 80% durante aproximadamente 5 min, em seguida A foi mantida em 80% durante mais 5 min. A coluna foi lavada com 100% de acetonitrila durante 5 min, e depois foi acondicionada durante 10 minutos com a fase móvel inicial para a próxima injeção.

A taxa de fluxo foi mantida a 1 mL/min e a temperatura da coluna foi 30°C. Volume de injeção foi 5  $\mu\text{L}$ . O comprimento de onda de detecção foi fixado em 292 nm.<sup>33,69</sup> A construção da curva analítica foi realizada em diferentes concentrações (5, 10, 30, 50,70, 90 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) utilizando o solvente metanol.

A determinação de Tadalafila em formulações através de medidas por cromatografia foram realizadas através da solubilização do fármaco em metanol, com filtração posterior em Membranas Filtrantes Whatman (25 mm, PVDF, 0,45 micron) e em seguida adicionado nos vial de amostragem. Foram solubilizados 0,008g do fármaco em 10 mL de metanol. Foram preparadas cinco amostras, as quais foram analisadas em triplicata.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as medições foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão (desvio padrão, SD). As análises de correlação e de regressão foram realizadas através do software OriginLab 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, EUA). A magnitude da correlação entre os resultados eletroquímicos e HPLC foram feitos empregando o teste *t* com 99% de confiança.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo traz todos os resultados e conclusões preliminares obtidos referentes a este projeto, o qual se trata da determinação de Tadalafila em formulação farmacêutica.

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA TADALAFILA

A caracterização tem como finalidade comparar a matéria-prima fornecida pela Industria Farmacêutica Eurofarma com dados presentes na literatura de modo a mostra a cristalinidade da amostra.

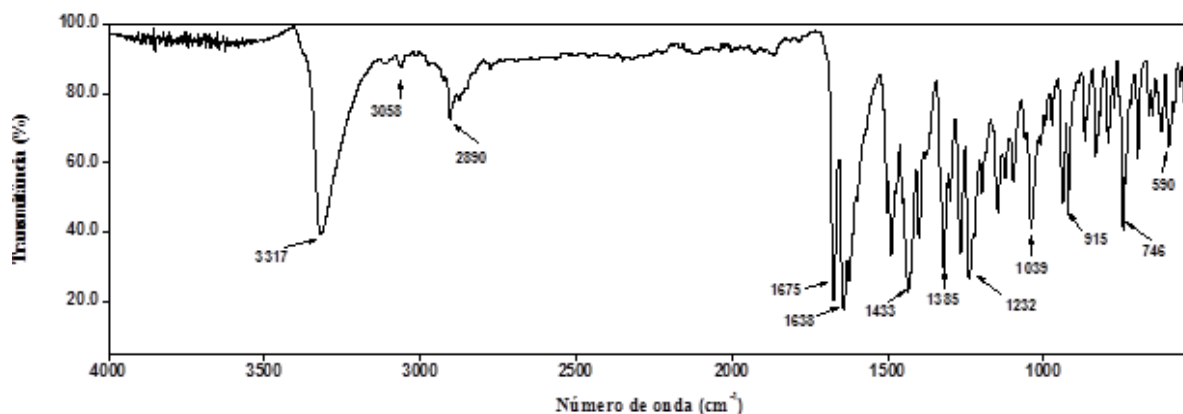
#### 5.1.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

Uma das técnicas apropriadas para identificar compostos orgânicos é a espectroscopia de absorção na região do infravermelho com reflexão atenuada total, uma vez que é uma técnica não destrutiva permitindo a reutilização de sua amostra. O espectro de infravermelho de um composto químico permite a obtenção de informações características bem como o tipo de ligações envolvidas devido aos diferentes tipos de vibrações que as ligações químicas podem sofrer, dando origem a bandas. Desta forma esta técnica permite a obtenção de informações estruturais sobre os grupos químicos que levam à caracterização física de sólidos farmacêuticos.<sup>73,74</sup> Assim a espectroscopia na região do infravermelho tem extensa aplicação na identificação dos compostos orgânicos e esta técnica foi empregada para verificar a presença de grupos funcionais característicos da molécula de Tadalafila.

A Tadalafila é caracterizada por picos principais de absorção a  $3317\text{ cm}^{-1}$  (estiramento de N-H, amina secundária),  $3058\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H, aromático),  $2890\text{ cm}^{-1}$  (Estiramento C-H,  $\text{CH}_3$  alifático simétrico),  $1675\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial de C=O, amida),  $1632\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular de N-H, amina),  $1433$  e  $1385\text{ cm}^{-1}$  (deformação de C=C aromático),  $1232\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-N) deformação axial,  $1243\text{ cm}^{-1}$  (estiramento simétrico de C-O-C),

1039 e 915  $\text{cm}^{-1}$  (C-H do anel benzeno) deformação angular no plano, 746  $\text{cm}^{-1}$  (C-H do anel benzeno) deformação angular fora do plano e 590  $\text{cm}^{-1}$  (C-C do anel benzeno) deformação angular fora do plano (FIGURA 4).<sup>70-73,75,76</sup>

**Figura 4** - Espectro FTIR-ATR da Tadalafila.



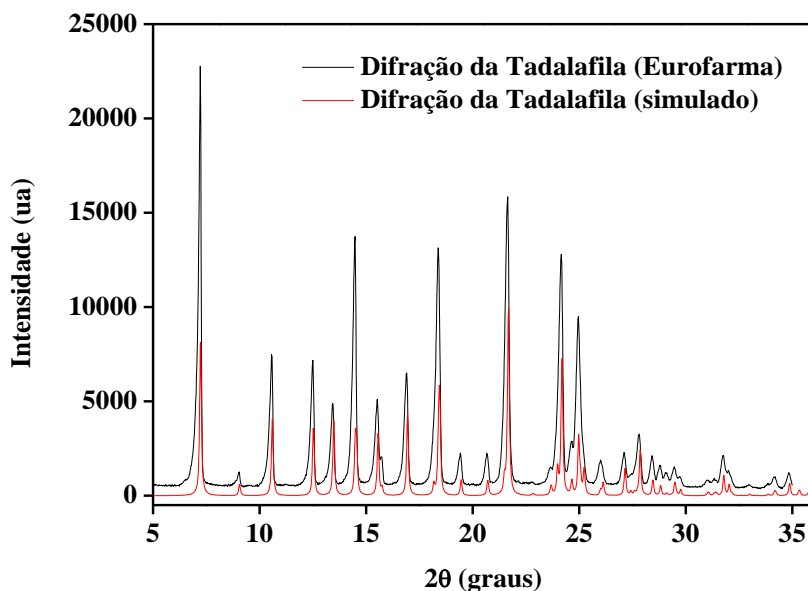
Fonte: Do autor.

### 5.1.2 Difração de raio X de pó

Difração de raio X de pó é uma técnica poderosa para a identificação de fases sólidas e determinação do grau de cristalinidade,<sup>77,78,79</sup> desta forma ela foi utilizada para avaliar a natureza de nossa amostra de Tadalafila.

A Figura 5 mostra o padrão de difração da molécula de Tadalafila (—) obtido a partir do monocristal,<sup>80</sup> simulado pelo Mercury, um software de acesso gratuito que faz parte do banco de dados do CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*), e o padrão de difração obtido da matéria prima fornecida pela indústria farmacêutica Eurofarma (—), o qual adotamos como sendo o padrão para realizar todo o estudo. De acordo com os dados fornecidos foi possível realizar uma comparação entre os difratogramas confirmando que a matéria prima fornecida é realmente a Tadalafila, uma vez que o picos de difração apresentados pela Tadalafila se sobrepõem aos picos obtidos no difratograma simulado pelo programa Mercury. Assim os maiores picos de difração foram obtidos em 7,24 – 21,59 – 14,49 – 18,47 e 24,19 20 respectivamente (FIGURA 5).

**Figura 5** – Difratoograma (—) da matéria prima do padrão de Tadalafila fornecido pela indústria farmacêutica Eurofarma. Difratoograma (—) da molécula de Tadalafila simulado a partir do software Mercury.

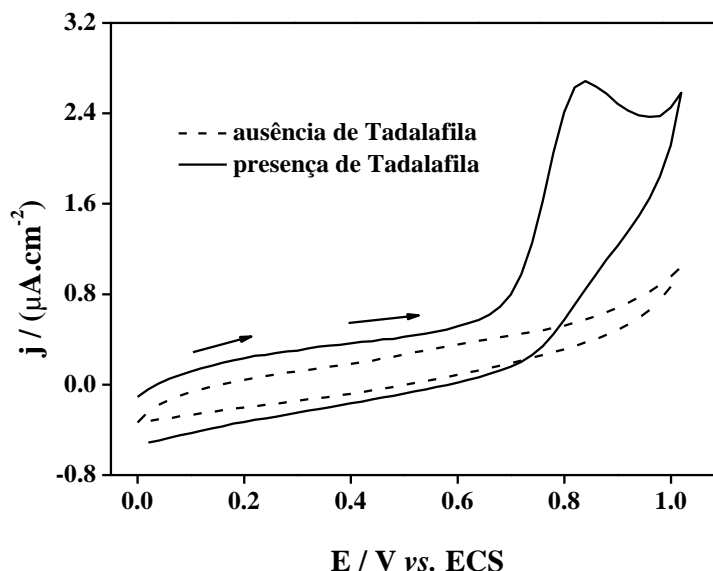


Fonte: Do autor.

## 5.2 ESTUDO ELETROQUÍMICO

Inicialmente foram realizadas medidas utilizando a técnica de voltametria cíclica, verificando que a molécula de Tadalafila apresenta apenas um pico de oxidação gerando uma corrente de pico anódica e que a reação inversa de redução ocorre em proporções muito pequenas não sendo possível sua avaliação (FIGURA 6). Portanto a molécula de Tadalafila apresenta um pico irreversível em 0,83 V vs. ECS. Este comportamento é semelhante ao observado para diversas moléculas orgânicas com atividade farmacológica. Este fato pode ser explicado devido as moléculas terem uma alta densidade eletrônica e conseqüentemente uma alta estabilidade, além da alta interação da molécula com a superfície eletródica dificultando os processos inversos, e vice-versa.<sup>81-86</sup>

**Figura 6** - Voltamogramas cíclicos do carbono vítreo, nas condições otimizadas (pH 7,00, tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura 40 mVs<sup>-1</sup>): (a) na ausência e (b) na presença de Tadalafila, 200 μmol.L<sup>-1</sup>.



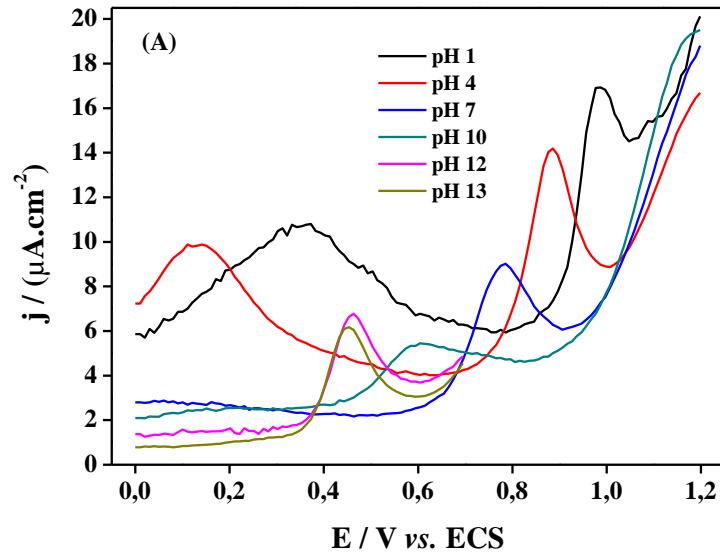
Fonte: Do autor.

### 5.2.1 Efeito do pH

Avaliando o efeito do pH no processo de oxidação da molécula de Tadalafila. Foi realizado um estudo empregando diferentes tipos de eletrólito suporte de concentração 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Os eletrólitos suporte empregados foram ácido sulfúrico (pH 1), tampão acetato (pH 4), tampão fosfato monobásico (pH 7), tampão fosfato dibásico (pH 10), tampão fosfato dibásico (pH 12) e NaOH (pH 13). Deste modo verificou-se uma relação considerável entre o potencial de oxidação da molécula com o pH do meio, uma vez que valores maiores de pH diminuíram o potencial de oxidação. Os potenciais de oxidação em diferentes pH 1, 4, 7, 10, 12 e 13 foram 0,977V; 0,886V; 0,775V; 0,584V; 0,453V e 0,453V, respectivamente (FIGURA 7). Apesar de eletrólitos alcalinos favorecerem a reação de oxidação devido ao menor potencial, optou-se em realizar as medidas posteriores em pH 7, de modo a garantir que o analito em questão não sofresse nenhuma reação que levasse a sua degradação. De acordo com a Figura 8, pode se observar que em pH 12 temos o início de uma inflexão a qual

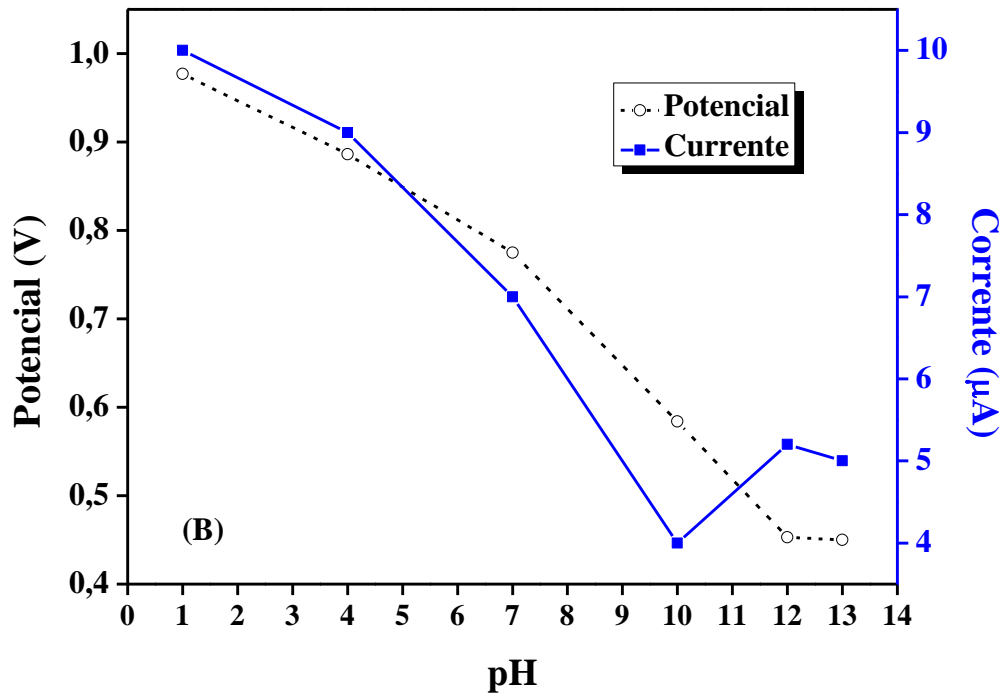
sugere que o pka da molécula seja próximo de 12, o qual é relatado na literatura para aminas.<sup>87</sup>

**Figura 7** - Voltamogramas do GCE na presença de Tadalafila em função do pH em diferentes eletrólitos suporte, empregando a técnica de Voltametria de Onda Quadrada.



Fonte: Do autor.

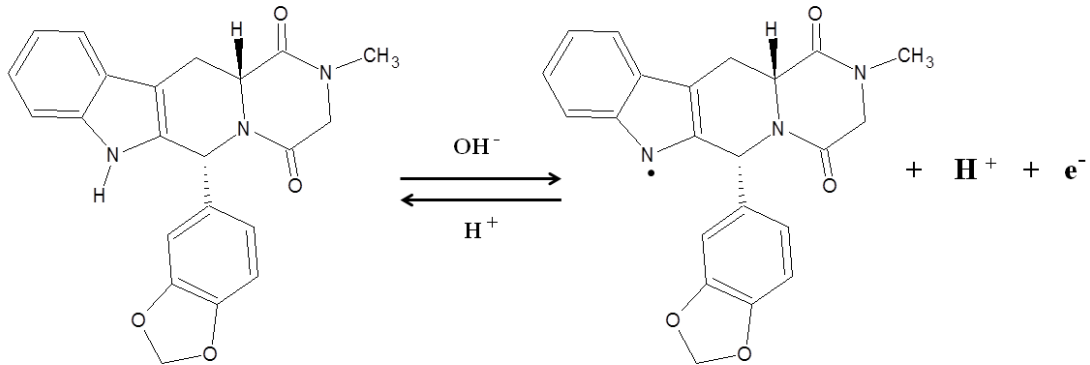
**Figura 8** - Relação pH vs. potencial de oxidação e pH vs. corrente de pico de oxidação da Tadalafila. (Diferentes eletrólitos suporte 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, ácido sulfúrico (pH 1), tampão acetato (pH 4), tampão fosfato (pH 7, 10 e 12) e hidróxido de sódio (pH 13), 200 μmol.L<sup>-1</sup> de Tadalafila).



Fonte: Do autor.

Durante o processo de oxidação da Tadalafila, o potencial de oxidação diminui com o aumento do pH, indicando que o GCE teve uma melhor atividade electrocatalítica para a oxidação da Tadalafila em pH mais básico. A redução do potencial para maiores valores de pH pode ser devido a desprotonação da molécula Tadalafila como pode ser observado na Figura 9, o qual esta relacionado a transferência de elétrons.<sup>87</sup> Assim, um pH de 7 foi escolhido devido a maior semelhança com o pH fisiológico, o qual levou a um sinal analítico bom em um potencial baixo, quando comparado ao sinal obtido em pH 1.

**Figura 9** - Mecanismo de oxidação da molécula de Tadalafil, com transferência de um próton e perda de um elétron ( $n=1e^-$ ).



Fonte: Do autor.

### 5.2.2 Estudo da Velocidade de Varredura de Potencial

É importante ressaltar que o movimento de íons entre o ânodo e o cátodo em soluções eletrolíticas pode ocorrer de diferentes maneiras. Os principais processos são a migração na qual os íons se movem devido à influência de um campo elétrico e ocorre apenas em espécies carregadas, devido à existência de dipolos, ou dipolos induzidos em espécies neutras; e a difusão que é devido a um gradiente de concentração. Desta forma, os íons solvatados movem-se com velocidades diferentes, de acordo com seu tamanho e carga. A difusão é descrita pela Lei de Fick: <sup>43,88</sup>

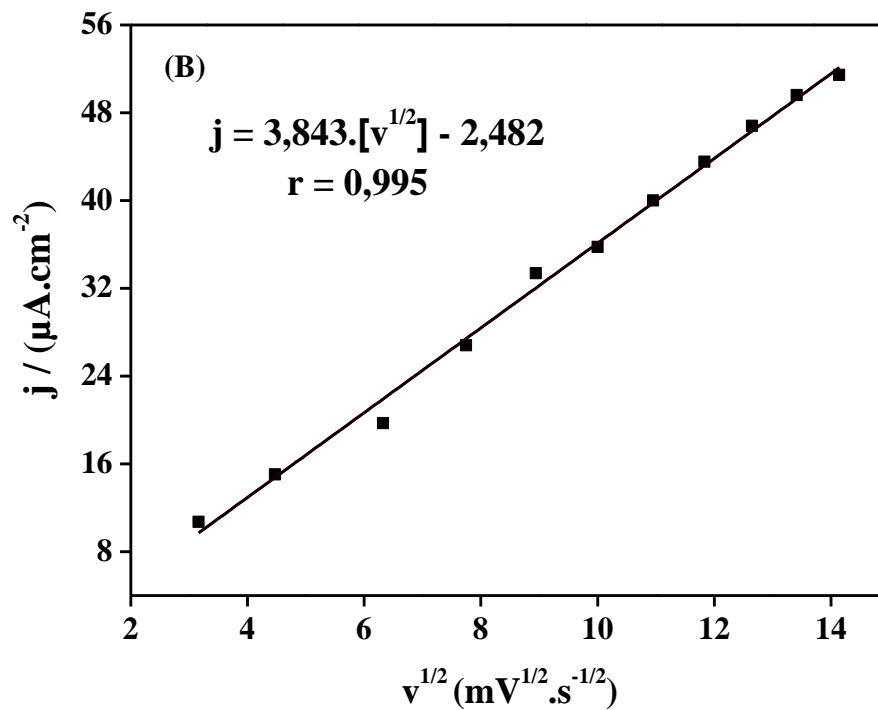
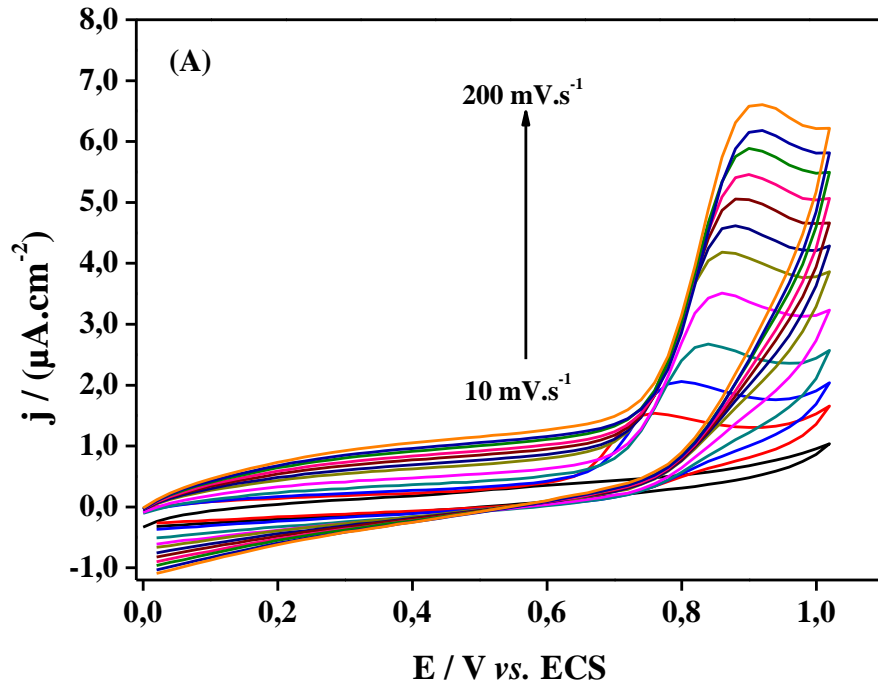
$$J_i(x,t) = -D_i \frac{\partial c_i}{\partial x} \quad (1)$$

onde  $J_i$  é o fluxo de espécies  $i$  de concentração  $c_i$  na direção  $x$ , e  $\partial c/\partial x$  é o gradiente de concentração,  $D_i$  é uma constante de proporcionalidade entre o fluxo e o gradiente de concentração, conhecido como o coeficiente de difusão. <sup>43,88</sup>

Neste sentido uma forma de avaliar se a reação na superfície do eletrodo é controlada pela difusão das espécies, ou seja, pelo transporte de massa, é através da variação da velocidade de varredura de potencial. Medidas foram realizadas em diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e desta forma avaliamos a variação da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade, de acordo a relação de Nernst (Equação 2). Observa-se na Figura 10A que o pico de oxidação da Tadalafila desloca gradualmente para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade

de varredura de potencial, o que sugere uma limitação cinética para a reação de oxidação.<sup>89</sup> Entretanto, em seguida plotou-se um gráfico entre raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) versus corrente de pico ( $i_p$ ). Observou-se que a corrente de pico da oxidação da Tadalafila em eletrodo de carbono vítreo é proporcional a raiz quadrada da velocidade, apresentando um coeficiente de correlação de 0,995 (Figura 10B). Esta observação indica também uma limitação difusional no processo de eletrooxidação da Tadalafila, na superfície do eletrodo de carbono vítreo.

**Figura 10** - (A) Voltamogramas cíclicos para o GCE em tampão fosfato (pH 7) contendo  $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de Tadalafila, em diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e  $200 \text{ mV.s}^{-1}$ ). (B) Relação linear entre densidade de corrente e raiz quadrada da velocidade.



Fonte: Do autor.

Em seguida realizou-se uma avaliação da equação de Nernst para este sistema totalmente irreversível baseando-se na linearização entre a corrente de pico ( $i_p$ ) e a raiz quadrada da velocidade ( $v^{1/2}$ ), veja a equação 2 a seguir:

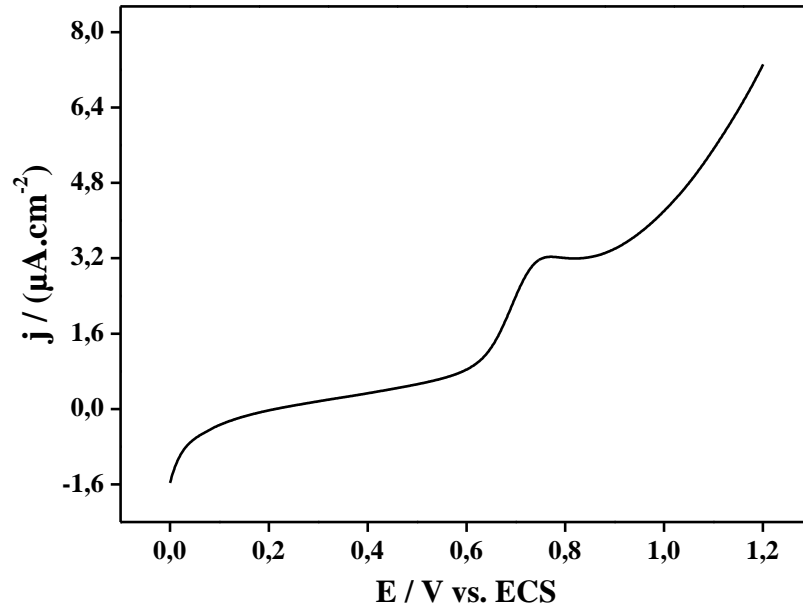
$$i_p = (2,99 \times 10^5) \alpha^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (2)$$

onde  $D$  é o coeficiente de difusão da Tadalafila,  $v$  é a velocidade de varredura de potencial,  $C$  é a concentração de Tadalafila ( $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ),  $i_p$  é a corrente de pico e  $\alpha$  é o coeficiente de transferência de carga. O valor do coeficiente de transferência de carga ( $\alpha$ ) foi determinado pela relação de Tafel na seção 5.2.3.1 como sendo 0,7. A linearização entre  $i_p$  versus  $v^{1/2}$ , apresentou um coeficiente de correlação de 0,9981 e um coeficiente angular de 3,843 (Figura 9B). Desta forma foi possível realizar a determinação do coeficiente de difusão ( $D$ ) baseando-se no coeficiente angular da reta. O coeficiente de difusão ( $D$ ) obtido para a Tadalafila foi de  $5,33 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  semelhante ao descrito na literatura para outras moléculas orgânicas.<sup>90</sup>

### 5.2.3 Determinação do número de elétrons

A determinação do número de elétrons foi realizada baseando-se em um sistema quase estacionário. Desta forma foi empregado a análise de uma curva semi-logarítmica registrada por Voltametria Linear a uma velocidade de varredura de  $1 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  (FIGURA 11). A partir desta medida a uma velocidade muito baixa seguiu-se para à aplicação da relação de Tafel e Nernst considerando sistemas irreversíveis.

**Figura 11** - Voltamograma linear para o GCE em tampão fosfato – pH 7, 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de Tadalafila, e  $v = 1 \text{ mV.s}^{-1}$ .



Fonte: Do autor.

### 5.2.3.1 Relação de Tafel

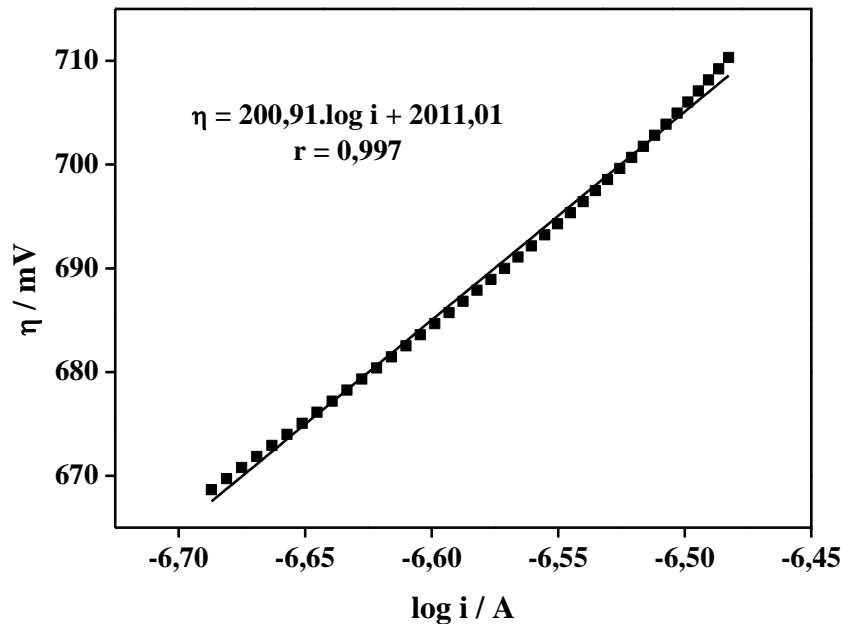
A relação de Tafel é aplicada em uma pequena região linear da curva de polarização representada graficamente em diagramas de sobrepotencial ( $\eta$ ) versus logaritmo da corrente ( $\log i$ ).<sup>43</sup> Essas medidas são realizadas em velocidades muito baixas ( $1 \text{ mV.s}^{-1}$ ), ou seja, em estado quase estacionário como mencionado. A vantagem da representação gráfica de Tafel está em que à parte das curvas de polarização em que é válida a equação torna-se uma reta. A relação de Tafel foi obtida no intervalo entre 668 e 710 mV apresentando um coeficiente de correlação de 0,997 e um coeficiente angular de  $200,91 \text{ mV.s}^{-1}$  (FIGURA 12). Desta forma é possível obter os coeficientes necessários à aplicação da equação de Tafel (Equação 3):

$$\eta = \frac{2,3RT}{\alpha F} \log i_0 + \frac{2,3RT}{(1-\alpha)F} \cdot \log i \quad (3)$$

onde  $R$  é a constante dos gases ideais,  $8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ,  $T$  é a temperatura em Kelvin, 298,  $\alpha$  é o coeficiente de transferência de carga e  $F$  é a constante de Faraday,  $96500 \text{ C.mol}^{-1}$ .<sup>43</sup> Neste sentido o valor de  $\alpha$  foi determinado através do coeficiente angular da equação da reta obtida

através da linearização de  $\eta$  versus  $\log i$ . O valor encontrado para  $\alpha$  foi de 0,7 indicando o favorecimento da reação de oxidação da Tadalafila em termos de barreira energética.

**Figura 12** - Relação linear entre sobrepotencial ( $\eta$ ) vs. logaritmo da corrente ( $\log i$ ), relação de Tafel.



Fonte: Do autor.

### 5.2.3.2 Relação de Nernst

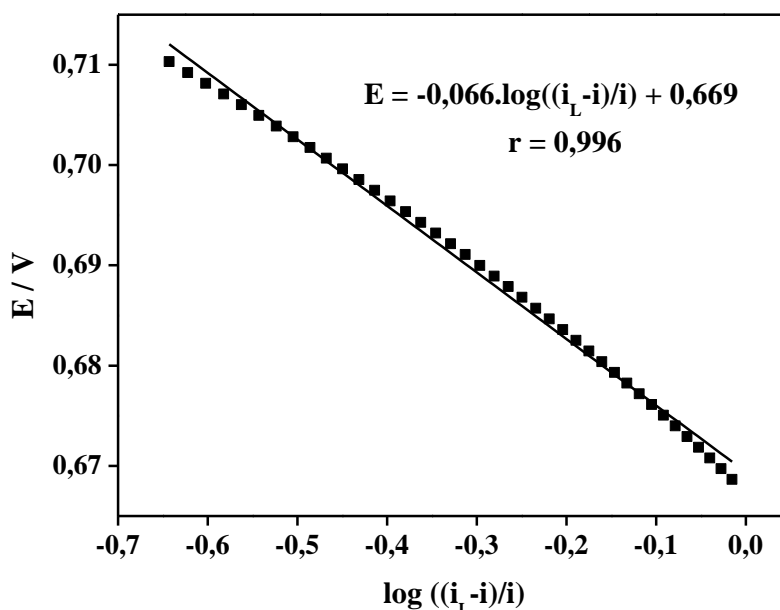
Considerando o sistema quase estacionário (FIGURA 11) a relação de Nernst também foi avaliada. De acordo com equação de Nernst (Equação 4) temos a seguinte relação:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{\alpha nF} \cdot \log \frac{i_L - i}{i} \quad (4)$$

em que  $E$  (V) é o potencial do eletrodo,  $E_{1/2}$  (V) é o potencial de meia onda de oxidação,  $n$  é o número de elétrons implicados na reação de oxidação no eletrodo,  $i$  (A) é a corrente possível em cada potencial durante a varredura,  $i_L$  (A) é a corrente de estado estacionário limitante, para uma reação reversível no elémetrodo,  $R$  é a constante dos gases ideais,  $8,314 \text{ J.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $T$  é a temperatura em Kelvin, 298, e  $F$  é a constante de Faraday,  $96500 \text{ C.mol}^{-1}$ . A inclinação, da relação linear entre potencial ( $E$ ) em função de  $\log [(i_L - i)/i]$  em determinado intervalo de potencial é igual a  $RT/\alpha nF$ , e portanto podemos determinar o número de elétrons envolvidos

na reação do eletrodo.<sup>43</sup> A análise da curva semi-logarítmica foi realizada entre o intervalo de 668 a 710 mV para o pico de oxidação da Tadalafila, sendo linear com um coeficiente de correlação de  $r = 0,996$  e um coeficiente angular de  $-0,066$  (FIGURA 13). Assim o número de elétrons encontrado foi de 1,0 o qual está relacionado à transferência de um próton, conforme mostrado na Figura 9.

**Figura 13** - Relação linear entre o potencial (E) e  $\ln[(i_L-i)/i]$ , relação de Nernst.



Fonte: Do autor.

#### 5.2.4 Cronoamperometria

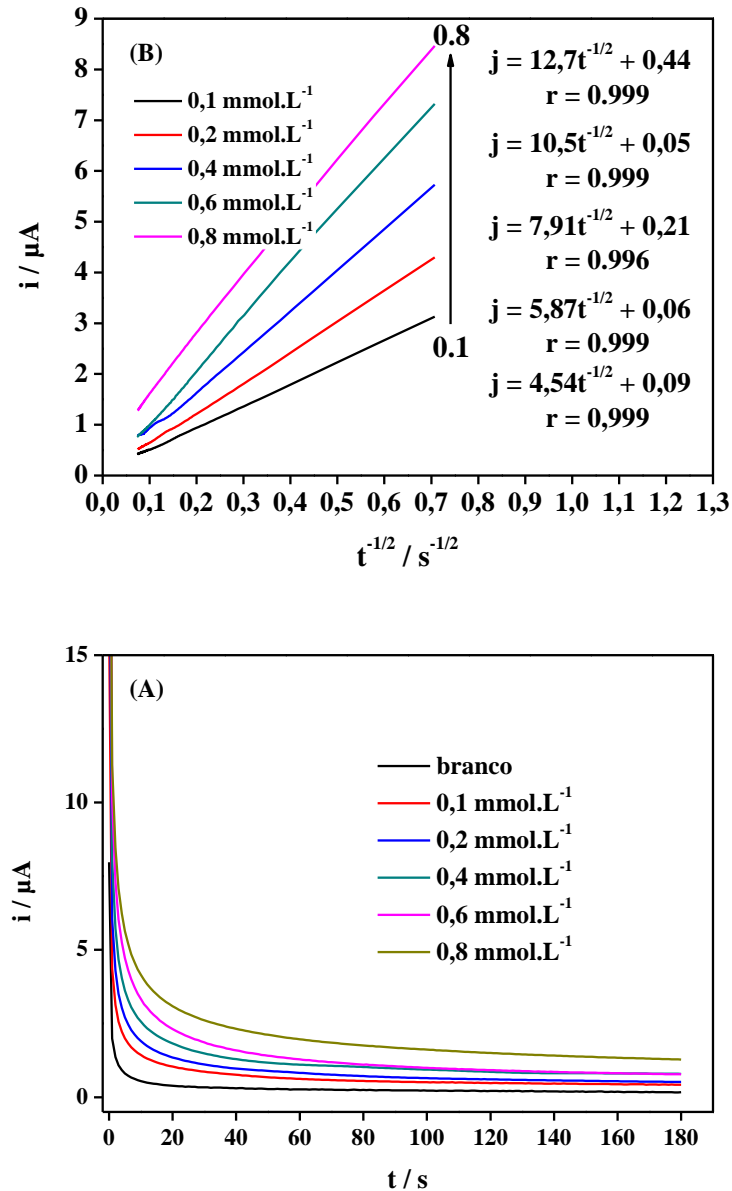
Após a determinação de alguns parâmetros como coeficiente de transferência de carga ( $\alpha$ ), número de elétrons ( $n$ ) e coeficiente de difusão ( $D$ ). Medidas de cronoamperometria em diferentes concentrações também foram realizadas para determinar o coeficiente de difusão da Tadalafila e fazer uma correlação entre os dados. A Figura 14A mostra os cronoamperogramas que foram obtidos em diferentes concentrações (0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 e 0,8 mmol.L<sup>-1</sup>) de Tadalafila em função da aplicação de um potencial de 730 mV durante 180

segundos. Neste sistema a resposta de corrente depende da difusão das moléculas e pode ser descrito pela equação de Cottrell (Equação 4).<sup>88</sup>

$$i(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (4)$$

onde  $i$  (A) é a corrente,  $F$  é a constante de Faraday (96500 C.mol<sup>-1</sup>),  $A$  é a área do eletrodo (0,1257cm<sup>2</sup>),  $C$  é a concentração de Tadalafila (espécie eletroativa),  $D$  é o coeficiente de difusão e  $t$  (s) é o tempo.<sup>43</sup> Assim a partir das medidas de cronoamperometria é possível realizar a linearização da equação de Cottrell, através da relação entre corrente ( $i$ ) vs. o inverso da raiz quadrada do tempo ( $t^{-1/2}$ ) em diferentes concentrações (FIGURA 14B).

**Figura 14** - (A) Cronoamperogramas para o GCE em tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7), em diferentes concentrações de Tadalafila (0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 e 0,8 mmol.L<sup>-1</sup>) aplicando um potencial de 730 mV vs. ECS, durante 180 segundos. (B) Relação linear entre corrente (*i*) vs. o inverso da raiz quadrada do tempo (*t*<sup>-1/2</sup>) obtida a partir dos cronoamperogramas em diferentes concentrações de Tadalafila.

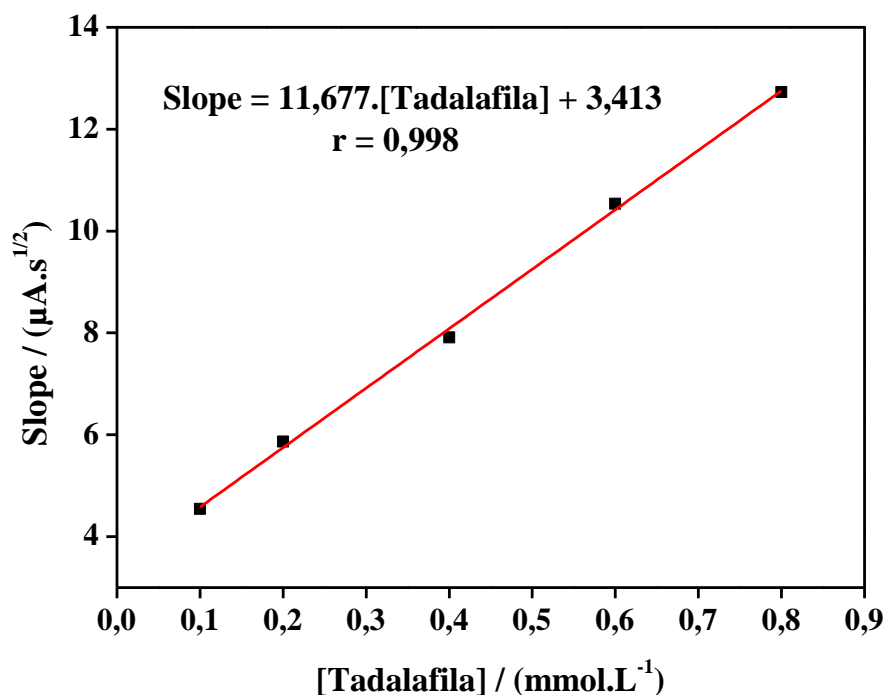


Fonte: Do autor.

Desta forma a linearização entre corrente (*i*) vs. o inverso da raiz quadrada do tempo (*t*<sup>-1/2</sup>) obtida a partir dos cronoamperogramas em diferentes concentrações de Tadalafila (0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 e 0,8 mmol.L<sup>-1</sup>) nos fornece diferentes retas com seus respectivos coeficientes angulares. Assim podemos obter uma relação linear entre os coeficientes angulares (*Slope*) vs.

a concentração de Tadalafila como mostrado na Figura 15. A linearização apresentou um coeficiente de correlação de 0,998 e um coeficiente angular de 11,677. Através do coeficiente angular foi possível à determinação do coeficiente de difusão da Tadalafila utilizando a equação de Cottrell (Equação 4). O coeficiente de difusão obtido foi de  $2,9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , mostrando estar na mesma ordem de grandeza do valor encontrado anteriormente, na seção 5.2.5. No entanto este resultado é mais confiável, pois temos um sistema quase estacionário quando realizamos medidas utilizando a técnica de Cronoamperometria.<sup>91-95</sup>

**Figura 15** - Linearização dos coeficientes angulares (Slope) das diferentes retas obtidas através das medidas de cronamperometria vs. concentração de Tadalafila (0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mmol.L<sup>-1</sup>).



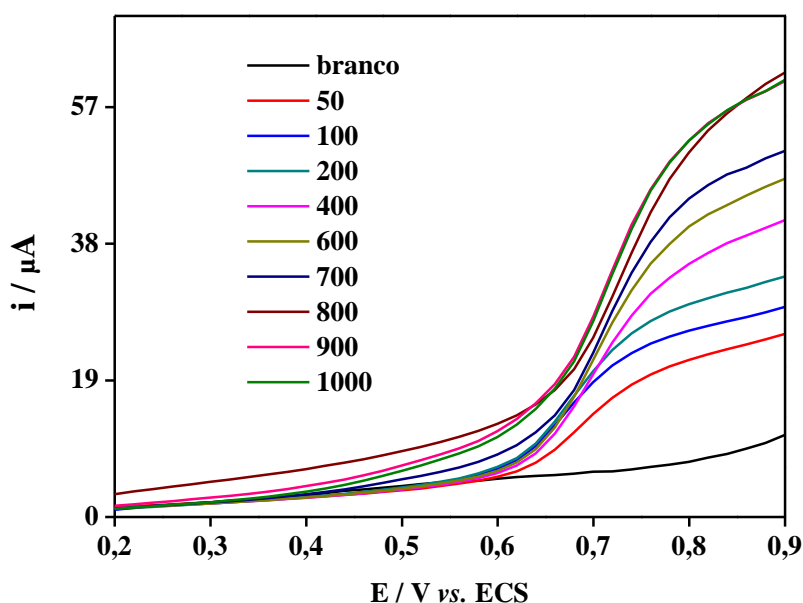
Fonte: Do autor.

### 5.2.5 Análise Hidrodinâmica

Medidas de voltametria empregando o Eletrodo de Disco Rotatório (RDE) foram utilizadas para avaliar a cinética da reação entre as moléculas eletroativas de Tadalafila e a superfície eletródica de carbono vítreo. A corrente foi medida em diferentes velocidades de

rotação e a corrente limite foi estabelecida no potencial de 840 mV. A Figura 16 mostra os voltamogramas obtidos pela técnica de voltametria linear em função da velocidade de rotação, os quais apresentam um comportamento sigmoidal.<sup>42</sup>

**Figura 16** - Voltamogramas para GCE-RDE obtidos em diferentes velocidades de rotação (0, 50, 100, 200, 400, 600, 700, 800, 900 e 1000 rpm), na presença de 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de Tadalafila, em tampão fosfato 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ , (pH 7),  $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ , no intervalo de potencial entre 0,2V e 0,9 V.



Fonte: Do autor.

Em seguida usando os voltamogramas hidrodinâmicos da Figura 16, realizou-se a linearização entre a corrente limite ( $i_L$ ) vs. raiz quadrada da velocidade de rotação ( $\omega^{1/2}$ ). Tal linearização é chamada de Relação de Veniamin Grigorievich Levich, na qual mostra que a relação entre a corrente limite ( $i_L$ ) e a raiz quadrada da velocidade de rotação ( $\omega^{1/2}$ ) do eletrodo deve ser linear para processos puramente difusionais, de acordo com a seguinte equação (Equação 5).

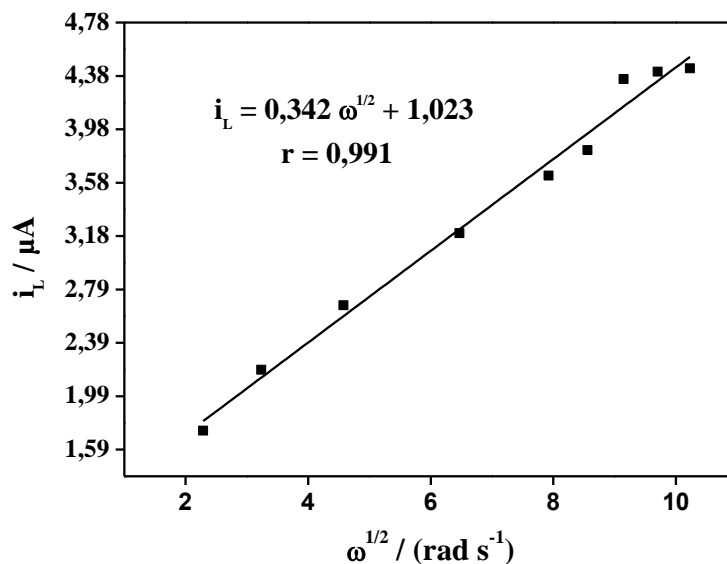
$$i_L = i_{Lev} = 0,62nFAc_o v^{-1/6} D^{2/3} \omega^{1/2} \quad (5)$$

onde  $i_L$  é a corrente limite no voltamograma (A),  $n$  é o número de elétrons transferidos ( $n=1$ ),  $F$  é a constante de Faraday (96500  $\text{C.mol}^{-1}$ ),  $A$  é a área do eletrodo (0,1257  $\text{cm}^2$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão ( $2,9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ ),  $\omega$  é a velocidade de rotação ( $\text{rad.s}^{-1}$ ),  $\nu$  é a viscosidade cinemática da solução ( $0,009 \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ ),<sup>43</sup> e  $c_o$  é a concentração das espécies eletroativas (200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).<sup>89</sup>

Esta equação estabelece que a corrente limite difusional é diretamente proporcional à raiz quadrada da velocidade angular de rotação do eletrodo, quando os demais parâmetros permanecem constantes.<sup>88</sup>

A partir dos valores de corrente limite difusional para as curvas de polarização mostradas na Figura 16 e da Equação 5, foi possível, construir o diagrama de Levich para a reação de oxidação da Tadalafila apresentados na Figura 17. Desta forma a linearização da Equação de Levich, apresentou um coeficiente de correlação de 0,991; o qual mostra que a corrente limite aumenta com o aumento da velocidade de rotação do eletrodo, mas em altas taxa de rotação ela se mantém constante desviando da linearidade (FIGURA 17). Pode-se observar que em velocidades acima de 800 rpm a corrente limite torna-se constante e que no diagrama de Levich para valores nulos de  $\omega^{1/2}$ , as retas apresentam um valor de corrente limite diferente de zero, indicando que a reação de oxidação da Tadalafila neste material não obedece ao comportamento de Levich. Nota-se um desvio do comportamento linear em altas velocidades de rotação sugerindo que a etapa determinante de velocidade do processo de oxidação seja mista entre uma limitação difusão e cinética da reação química.<sup>88,89,96,98</sup>

**Figura 17** - Diagrama de Levich para a reação de oxidação da Tadalafila em eletrodo de carbono vítreo.



**Fonte:** Do autor.

Neste sentido apesar de não haver uma relação totalmente linear seguindo a equação de Levich, sob estas condições, há uma correlação linear entre o inverso da corrente limite e o inverso da raiz quadrada da velocidade de rotação (FIGURA 17). Esta correlação é chamada

de Relação de Koutecký-Levich, a qual segue a Equação 6. A relação de Koutecký-Levich trás algo a mais, ou seja, ela divide a corrente medida ( $i$ ) em duas componentes, a corrente difusional ( $i_d$ ) devido a difusão das moléculas e a corrente cinética ( $i_k$ ) gerada considerando uma limitação cinética no processo de transferência eletrônica.<sup>42,88</sup>

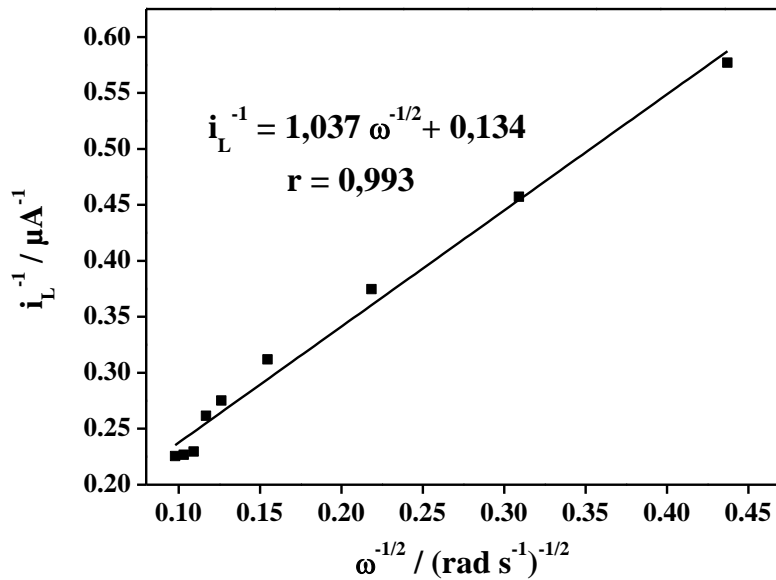
$$\frac{1}{i} = \frac{1}{i_k} + \frac{1}{i_d} = \frac{1}{I_{lim}} = \frac{1}{nFAk' C} + \frac{1}{0,62nFA\nu^{-1/6}D^{2/3}\omega^{1/2}C} \quad (6)$$

onde  $I_{lim}$  é a corrente limite no voltamograma (A),  $C$  é a concentração das espécies eletroativas de Tadalafila ( $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ),  $n$  é o número de elétrons transferidos ( $n=1$ ),  $F$  é a constante de Faraday ( $96500 \text{ C.mol}^{-1}$ ),  $A$  é a área do eletrodo ( $0,1257 \text{ cm}^2$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$ ),  $\omega$  é a velocidade de rotação ( $\text{rad.s}^{-1}$ ),  $\nu$  é a viscosidade cinemática da solução ( $0,009 \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ ) e  $k'$  é a constante de velocidade da reação ( $\text{mol}^{-1}.\text{L.s}^{-1}$ ) entre a Tadalafila e a superfície eletródica.<sup>43,88</sup>

Em um diagrama de Koutecky-Levich, a inclinação da reta apresenta relação direta com o número de elétrons ( $n$ ) envolvidos na reação de oxidação da Tadalafila, de acordo com a Equação 6. Assim através da linearização da equação de Koutecký-Levich, é possível determinar o valor da constante de velocidade da reação de transferência eletrônica levando em consideração o efeito difusional e a limitação cinética, conhecida como constante heterogênea de transferência eletrônica ( $k'$ ).<sup>89,91,98</sup>

A partir do coeficiente angular da relação de Koutecky-Levich foi estimada a constante de velocidade heterogênea. A linearização apresentou um coeficiente de correlação de 0,993 e um coeficiente linear de 0,134 (FIGURA 18). O valor de  $k'$  foi calculado a partir do coeficiente linear da reta, sendo que o valor encontrado foi  $0,675 \text{ mol}^{-1}.\text{L.s}^{-1}$ .<sup>96,99</sup> Este valor nos indica que temos um fluxo de  $4,06 \times 10^{23}$  moléculas por segundo sendo oxidadas em um litro de solução.

**Figura 18** - Relação de Koutecký-Levich, linearização entre o inverso da corrente limite ( $i_L^{-1}$ ) vs. o inverso da raiz quadrada da velocidade de rotação ( $\omega^{-1/2}$ ).



Fonte: Do autor.

## 5.2.6 Parâmetros analíticos

A quantificação da Tadalafila engloba a determinação de alguns parâmetros analíticos como Faixa Linear, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), empregando as técnicas de Voltametria Cíclica, Voltametria de Pulso Diferencial e Voltametria de Onda Quadrada.

Por definição, o limite de detecção é a menor quantidade de um analito que um método pode detectar, porém, sem adequadas precisão e exatidão. Também, pode ser definido como sendo a menor quantidade detectável estatisticamente diferente do branco. O limite de quantificação expressa a real quantidade do analito na amostra com precisão e exatidão consideráveis.<sup>100</sup> Matematicamente, o LD é obtido a partir da seguinte equação:

$$LD = \frac{3 \times std}{m} \quad (7)$$

onde, *std* é o desvio padrão absoluto de dez leituras do branco e *m* é o coeficiente angular da equação da curva analítica. O LQ, por sua vez, é calculado a partir da equação 8.

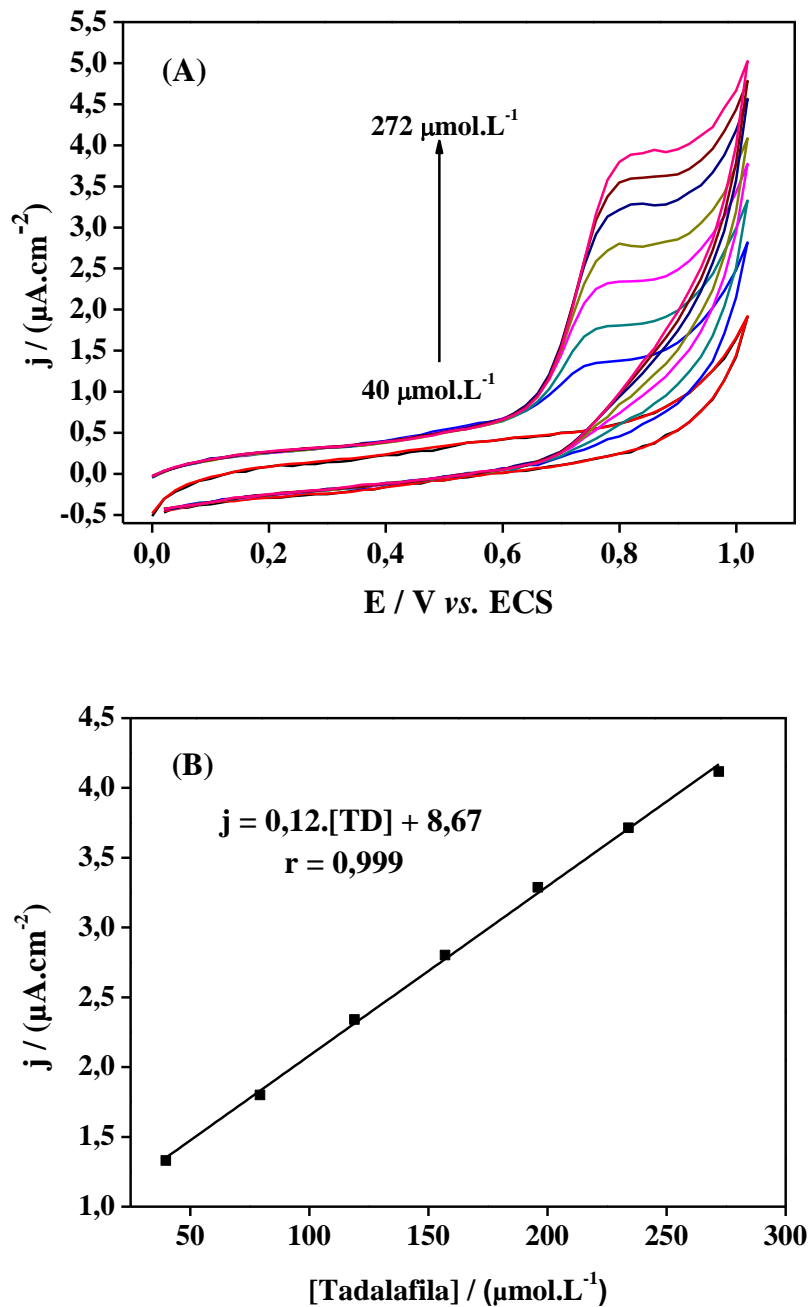
$$LQ = \frac{10 \times std}{m} \quad (8)$$

### 5.2.6.1 Voltametria Cíclica

A técnica de voltametria cíclica é extremamente importante uma vez que ela faz uma varredura de potencial no sentido anódico e catódico (FIGURA 19A). Através desta técnica é possível identificar claramente que a molécula de Tadalafila apresenta apenas um pico de oxidação, sobre o eletrodo de carbono vítreo, em aproximadamente 0,83V; indicando um processo irreversível.

Foram realizadas medidas voltamétricas em diferentes concentrações de Tadalafila para a construção da curva analítica. A faixa de concentração estudada foi de 40 a 272  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , o limite de detecção e quantificação foram de  $4,77 \times 10^{-7}$  e  $1,59 \times 10^{-6}$   $\text{mol.L}^{-1}$ , apresentando um coeficiente de correlação de 0,999 (FIGURA 19B).

**Figura 19** - (A) Voltamogramas cíclicos para o GCE,  $v=50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , no intervalo de 0 a 1,2 V; em diferentes concentrações de Tadalafila (40, 80, 119, 157, 196, 234 e  $272 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). (B) Curva analítica apresentando uma faixa linear com seu respectivo coeficiente de correlação de 0,999.



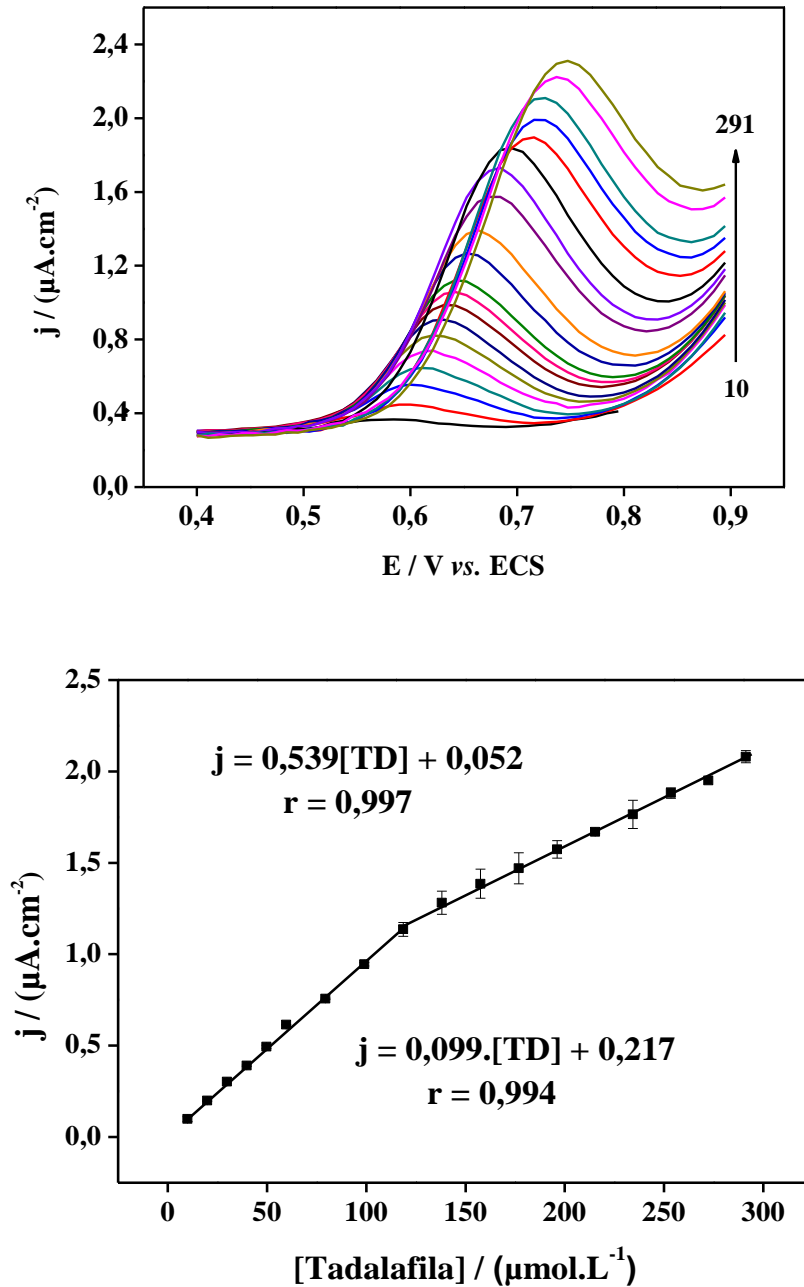
Fonte: Do autor.

## 5.2.6.2

## Voltametria de Pulso Diferencial

A curva analítica empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial foi realizada utilizando-se de 10 à 291  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (FIGURA 20A). A curva apresentou duas faixas lineares, a primeira de maior sensibilidade encontra-se entre 10 e 120  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  com um limite de detecção e quantificação de  $8,12 \times 10^{-7}$  e  $2,71 \times 10^{-6}$   $\text{mol.L}^{-1}$  respectivamente, e um coeficiente de correlação de 0,997. A segunda faixa linear encontra-se entre 120 e 291  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  com um limite de detecção e quantificação de  $1,43 \times 10^{-6}$  e  $4,75 \times 10^{-6}$   $\text{mol.L}^{-1}$  respectivamente, e um coeficiente de correlação de 0,994 (FIGURA 20B). Desta forma, observa-se claramente que a técnica de pulso diferencial é mais sensível que a voltametria cíclica uma vez que seu limite de detecção é menor. Assim pode-se afirmar que a dupla camada elétrica não afeta de maneira significativa o processo de interação da molécula com a superfície do eletrodo.

**Figura 20** - (A) Voltamogramas de pulso diferencial para GCE, em diferentes concentrações de Tadalafila (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 215, 235, 250, 270 e 290  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). (B) Curva analítica apresentando 2 faixas lineares com seus respectivos coeficientes de correlação.



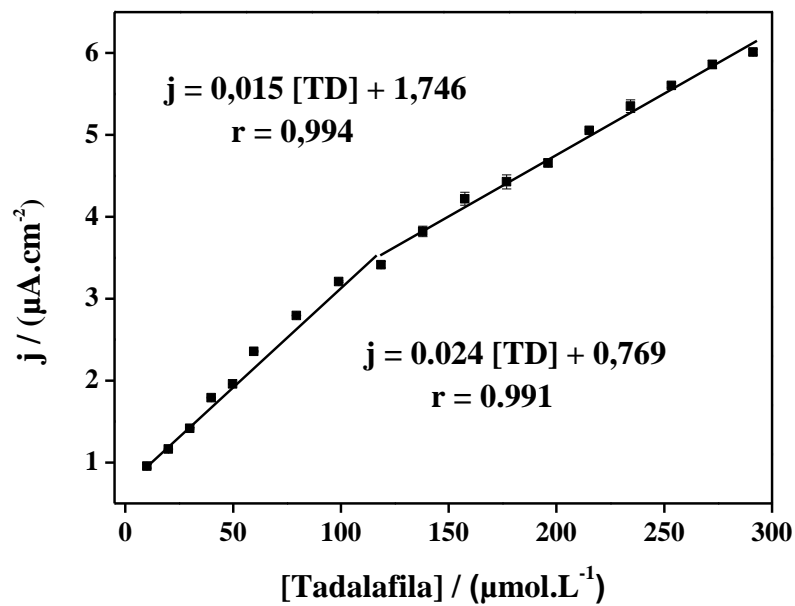
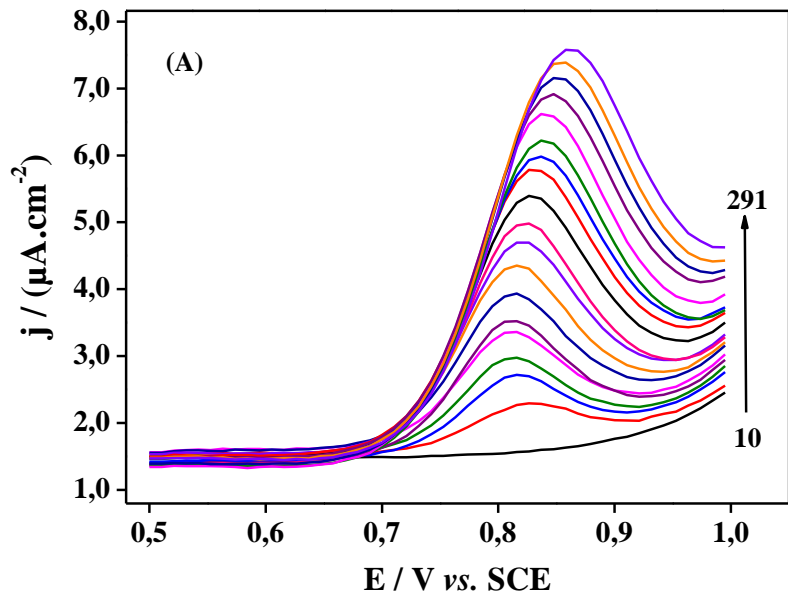
Fonte: Do autor.

O fato de existirem duas faixas lineares de concentração versus densidade de corrente de pico pode ser atribuído que no primeiro seguimento de reta o efeito predominante é o difusional e no segundo o efeito predominante é a cinético do processo de oxidação da Tadalafila.

#### 5.2.6.3 Voltametria de Onda Quadrada

A curva analítica empregando a técnica de voltametria de onda quadrada foi realizada em diferentes concentrações monitorando a corrente de pico anódica (FIGURA 21A). A curva apresentou duas faixas lineares, a primeira de maior sensibilidade encontra-se entre 10 e 120  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  com um limite de detecção e quantificação de  $1,12 \times 10^{-7}$  e  $3,72 \times 10^{-7}$   $\text{mol.L}^{-1}$  respectivamente, e um coeficiente de correlação de 0,991. A segunda faixa linear encontra-se entre 120 e 291  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  com um limite de detecção e quantificação de  $2,0 \times 10^{-7}$  e  $6,66 \times 10^{-6}$   $\text{mol.L}^{-1}$  respectivamente, e um coeficiente de correlação de 0,994 (FIGURA 21B). Desta forma observa-se claramente que a técnica de Voltametria de Onda Quadrada é mais sensível que a Voltametria cíclica e de Pulso diferencial uma vez que seu limite de detecção é menor, indicando assim mais uma vez que o processo de adsorção e estabilização do analito na superfície do eletrodo não depende da dupla camada elétrica.

**Figura 21** - (A) Voltamogramas de onda quadrada realizadas no Intervalo de 0,5 a 1,0 V em diferentes concentrações de Tadalafila (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 215, 235, 250, 270 e 290  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). (B) Curva analítica.



Fonte: Do autor.

Observa-se o efeito semelhante com relação a presença de duas faixas lineares de concentração versus densidade de corrente de pico observado na voltametria de pulso diferencial, com o ponto de inflexão na mesma concentração. Indicando assim que a partir da concentração de  $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$  o processo é limitado predominantemente pela transferência de elétron. Comparando-se o efeito de deslocamento do pico de oxidação da Tadalafila observa-se um efeito mais pronunciado nos resultados obtidos pela Voltametria de Pulso Diferencial este efeito pode ser atribuído às características da técnica.

#### 5.2.6.4 Relação analítica das técnicas eletroquímicas

A Tabela 1 mostra os parâmetros analíticos determinados para as técnicas de Voltametria Cíclica, Pulso Diferencial e Onda Quadrada; frente ao processo de eletrooxidação da Tadalafila. Desta forma pode se observar que as três técnicas apresentam um coeficiente de correlação próximo de 1 para suas respectivas curvas analíticas. Os limites de detecção e quantificação evidenciam que as técnicas utilizadas podem ser empregadas em análises com baixo teor de Tadalafila. Sendo que a técnica mais rápida e sensível é a de onda quadrada, com LQ de  $3,72 \times 10^{-7} \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

**TABELA 1** - Parâmetros analíticos das técnicas eletroquímicas.

PARÂMETROS ANALÍTICOS	Técnica Eletroquímica		
	Voltametria Cíclica	Voltametria de Pulso Diferencial	Voltametria de Onda Quadrada
Potencial de Medida (mV)	761	611	806
Faixa Linear ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	40 a 272	10 a 120	10 a 120
Coefficiente Angular ( $\mu\text{A.cm}^{-2}/\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	0,12	0,093	0,24
Coefficiente Linear ( $\mu\text{A.cm}^{-2}$ )	8,67	0,217	7,68
Coefficiente de correlação	0,9985	0,9973	0,9918
LD ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	$4,77 \times 10^{-7}$	$8,12 \times 10^{-7}$	$1,12 \times 10^{-7}$
LQ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	$1,59 \times 10^{-6}$	$2,71 \times 10^{-6}$	$3,72 \times 10^{-7}$
Repetibilidade da corrente de pico (%R.S.D.)	$8,0 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-5}$
Repetibilidade do potencial de pico (% R.S.D.)	0,21	0,18	0,10
Reprodutibilidade da corrente de pico (% R.S.D.) *	$7,2 \times 10^{-4}$	$8,2 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$
Reprodutibilidade do potencial de pico (% R.S.D.) *	0,32	0,21	0,19

Nota: \*Foram preparadas três amostras com concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , as quais foram analisadas em triplicata (n=3).

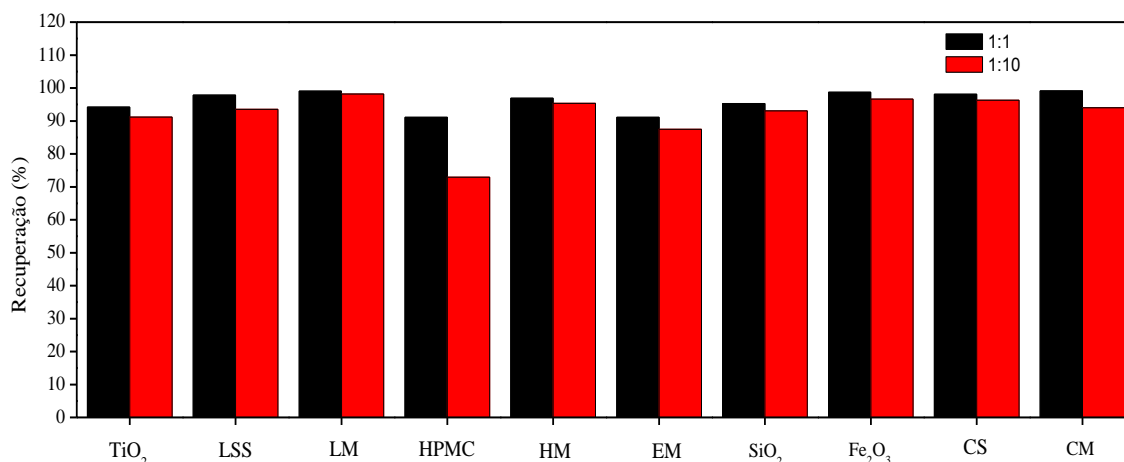
### 5.2.7 Análise de Interferentes

Os interferentes avaliados foram os diversos excipientes presentes na formulação farmacêutica (Cialis<sup>®</sup>), desta forma avaliou-se as seguintes substâncias, Dióxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>), Lauril Sulfato de Sódio (LSS), Lactose Mono-hidratada (LM), Hidroxi Propil Metil Celulose (HPMC), Hipromelose (HM), Estearato de Magnésio (EM), Dióxido de silício (SiO<sub>2</sub>), Óxido de Ferro III (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), Croscamelose Sódica (CS) e Celulose Microcristalina (CM), veja a Figura 21. Este estudo foi realizado empregando o sinal do padrão como parâmetro de comparação e foi realizado na proporção 1:2,5 e 1:25 (m/m) de analito em relação ao interferente, empregando a técnica de pulso diferencial.

Estudos foram feitos tendo como referência o sinal do padrão (0,1 mL de Tadalafila 0,01 mol.L<sup>-1</sup> em tampão fosfato (pH 7)). O estudo de cada interferente foi realizado separadamente adicionando 0,1 e 1 mL de cada interferente na solução de Tadalafila. Adotou-se como interferência na determinação de Tadalafila um percentual de recuperação do sinal analítico menor que 90% ou maior que 110%.<sup>101</sup>

Analisando a Figura 22 verifica-se que apenas a Hidroxi Propil Metil Celulose causou uma interferência no sinal maior que 10 % na proporção 1:10, fato que se deve a formação de uma película na superfície eletrodica tornando indisponíveis os sítios eletroativos para que o analito se oxida.

**Figura 22** - Estudo de possíveis interferentes na determinação de Tadalafila na proporção 1:1 e 1:10 do analito:interferente.



Fonte: Do autor.

### 5.3 QUANTIFICAÇÃO EM FORMULAÇÕES DE Cialis®

Após todo estudo relacionado ao processo de oxidação, como influência do pH, coeficiente de transferência de carga, número de elétrons envolvidos no processo de oxidação, faixa linear, limite de quantificação e detecção, este tópico traz a aplicação do método eletroquímico na determinação de Tadalafila em formulação farmacêutica.

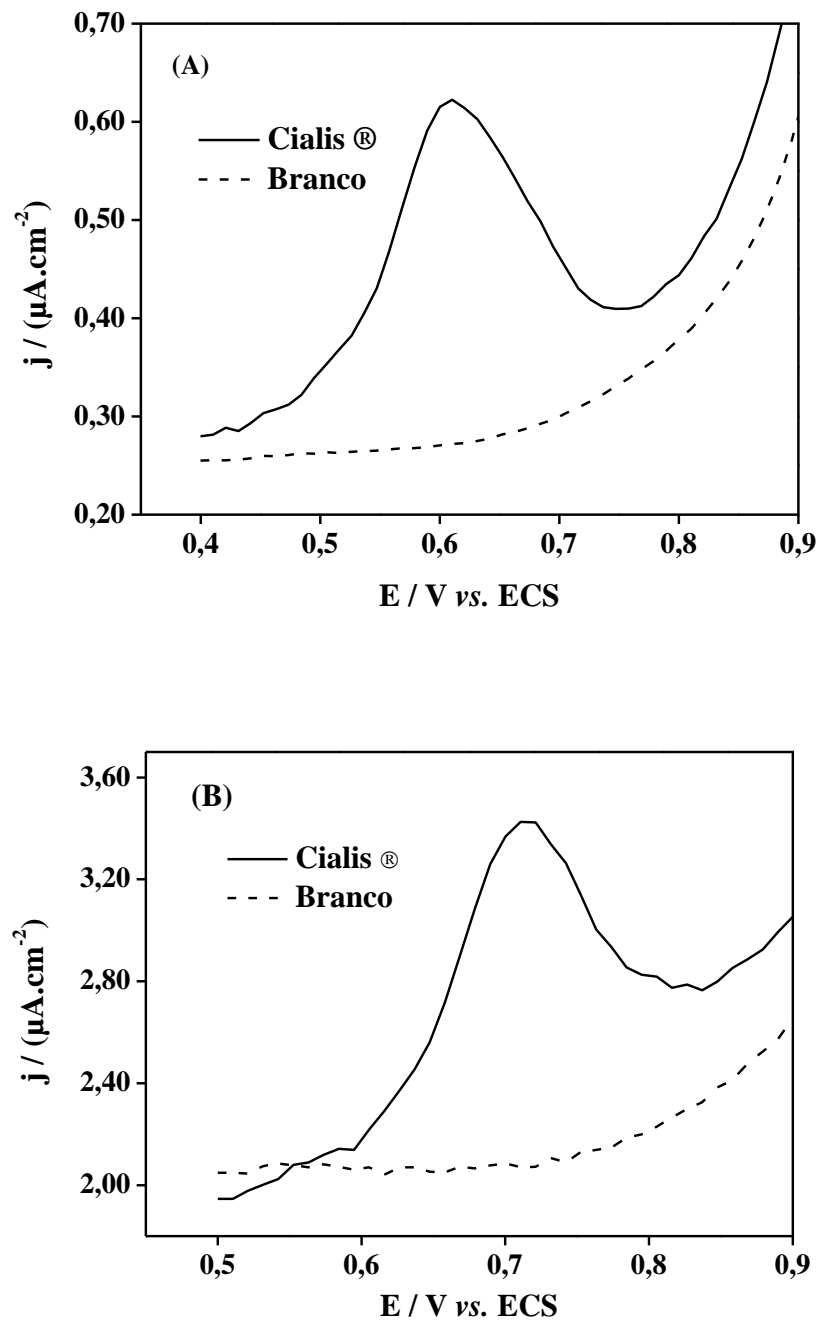
#### 5.3.1 Quantificação de Tadalafila por Voltametria

A determinação de Tadalafila em formulações foi realizada inicialmente através do método desenvolvido empregando as técnicas de Voltametria de Pulso Diferencial e Onda Quadrada. A quantificação foi realizada sem nenhum tratamento mais específico da amostra e os resultados foram satisfatórios.

A Figura 23A mostra a determinação de Tadalafila na amostra de Cialis® pela técnica de Voltametria de Pulso Diferencial com um pico de oxidação em aproximadamente 600 mV. A Figura 23B mostra a determinação de Tadalafila na amostra de Cialis®, pela técnica de

Voltametria de Onda Quadrada apresentando um pico de oxidação em aproximadamente 700 mV.

**Figura 23** - Voltamogramas para a formulação farmacêutica (Cialis®) em solução-tampão fosfato 0,1mol.L<sup>-1</sup> (pH 7) empregando (A) Voltametria de Pulso Diferencial e (B) Voltametria de Onda Quadrada (Branco : 45 mL de sol. tampão fosfato 0,1 mol.L (pH 7) e 5 mL de DMF).



Fonte: Do autor.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos na determinação de Tadalafila em formulações farmacêuticas pelas técnicas de Voltametria de Pulso Diferencial, Onda Quadrada e Cromatografia. O valor encontrado de Tadalafila está próximo de 20 mg por comprimido em acordo com o estabelecido pelo fabricante. Assim o método proposto apresenta-se satisfatório para a determinação do analito em questão.

**TABELA 2** - Determinação da concentração de Tadalafila em formulação farmacêutica (Cialis®).

<b>Amostra</b>	<b>Voltametria de Pulso Diferencial</b>	<b>Voltametria de Onda Quadrada</b>	<b>HPLC</b>
<b>1</b>	19,4	20,1	19,3
<b>2</b>	19,3	19,4	19,2
<b>3</b>	20,0	19,5	19,3
<b>4</b>	19,5	20,1	19,1
<b>5</b>	19,6	19,3	19,1
<b>Média</b>	19,7	19,6	19,2
<b>Desvio Padrão</b>	0,4	0,3	0,1

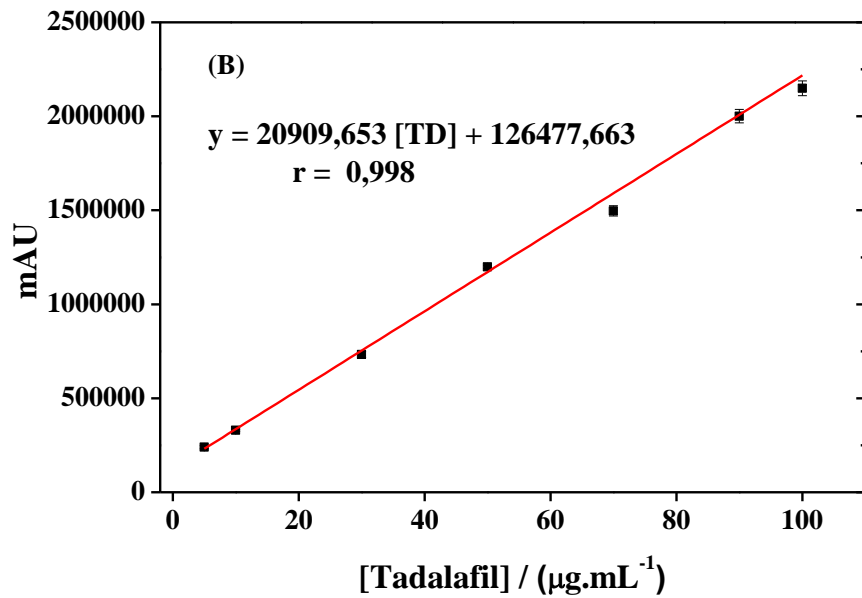
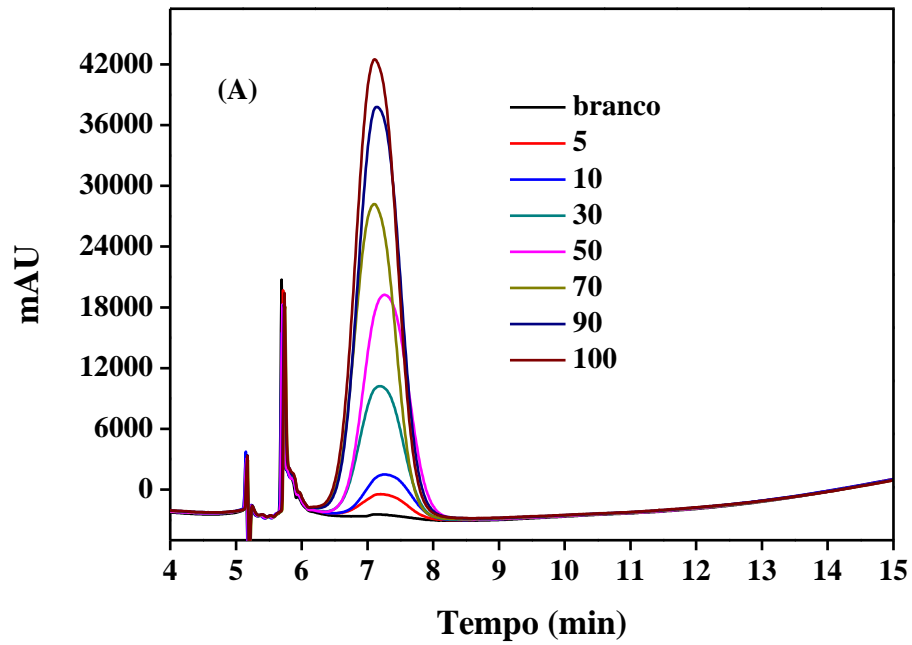
Nota: Foram preparadas 5 amostras as quais foram analisadas em triplicata (n=3).

### 5.3.2 Quantificação de Tadalafila por HPLC

Após realizar o desenvolvimento do método eletroquímico e verificar sua aplicabilidade em amostras de Cialis®, as mesmas amostras também foram analisadas por UPLC de modo a comparar os dados obtidos.

A linearidade do método foi avaliada de 5 – 100 µg.mL<sup>-1</sup>, como pode ser observado na Figura 24A. A equação de regressão para soluções de Tadalafila foi: mAU = 20298,91[TD] + 134506,51 com valor de r = 0,998 (FIGURA 24B). Analisando a Figura 24B pode-se ver claramente que a molécula de Tadalafila apresenta um tempo de retenção de aproximadamente 7,3 minutos.

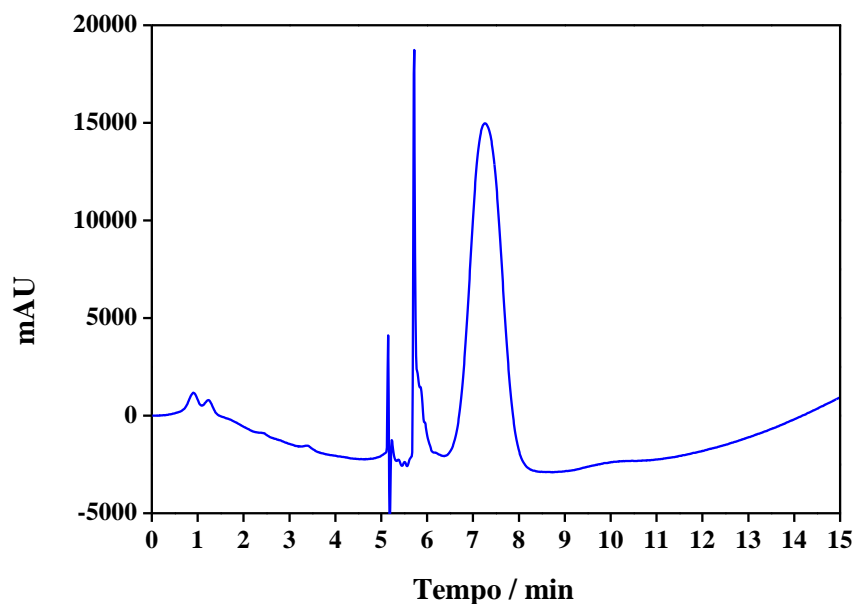
**Figura 24** - (A) Cromatogramas obtidos em diferentes concentrações de Tadalafila (5, 10, 30, 50, 70, 90 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) com intervalo de corrida de 0 a 15 minutos e tempo de retenção de 7,3min. (B) Curva analítica.



Fonte: Do autor.

A Figura 25 mostra um exemplo de quantificação de Tadalafila em formulação de Cialis<sup>®</sup>, onde pode ser observado um pico de retenção em aproximadamente 7,5 minutos o qual refere ao analito em questão.

**Figura 25** - Cromatograma (HPLC) para a formulação de Cialis<sup>®</sup> que apresenta tempo de retenção de 7,3 minutos.



Fonte: Do autor.

#### 5.4 TESTE ESTATÍSTICO

Para a validação da metodologia desenvolvida e dos dados obtidos foi realizada a aplicação do teste *t* para a comparação dos dois métodos. O método aplicado se baseia na comparação de medidas repetidas e avalia se os três grupos de medidas fornecem resultados “idênticos” ou “diferentes”, a um determinado nível de confiança de 99%.<sup>101</sup> Os valores de concentração obtido para cinco amostras estão dispostas na Tabela 2.

O teste *t* foi aplicado para os três conjuntos de dados, sendo que a comparação foi feita entre as medidas obtidas entre a técnica de voltametria de pulso diferencial e a técnica de cromatografia; e entre a técnica de voltametria de onda quadrada e a técnica de cromatografia. Assim a partir dos dados obtidos (TABELA 2), foi possível determinar o desvio padrão

agrupado ( $S_{agrupado}$ ) fazendo uso de ambos grupos de dados. Este é calculado a partir da seguinte equação (7):

$$S_{agrupado} = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1-1) + s_2^2(n_2-1)}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (7)$$

onde  $n_1$  e  $n_2$  são os números de medidas, com médias de  $\bar{x}_1$  e  $\bar{x}_2$ , e seus respectivos desvio padrão  $S_1$  e  $S_2$ . Em seguida foi calculado o valor de  $t$ . Este foi determinado pela equação 8:

$$t_{calculado} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{S_{agrupado}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \quad (8)$$

onde  $n_1$  e  $n_2$  são os números de medidas, com médias de  $\bar{x}_1$  e  $\bar{x}_2$ , e o  $S_{agrupado}$  calculado pela equação 7.

A comparação dos dados entre a técnica de voltametria de pulso diferencial e a técnica de cromatografia foi realizada, sendo que o valor de  $S_{agrupado}$  encontrado foi de 0,211; o valor de  $t_{calculado}$  foi de 2,758. Já na comparação dos dados entre a técnica de voltametria de onda quadrada e a técnica de cromatografia, o valor de  $S_{agrupado}$  encontrado foi de 0,269; o valor de  $t_{calculado}$  foi de 2,717. Assim para ambas as análises o valor de  $t_{tabelado}$  foi de 3,355 com 99% de confiança e 8 graus de liberdade ( $n_1 + n_2 - 2$ ).<sup>101</sup> Este valor de  $t_{tabelado}$  é maior que o valor de  $t_{calculado}$  para ambas, mostrando que os resultados obtidos pelos diferentes métodos são considerados iguais, e que o método proposto é satisfatório quando comparado ao método cromatográfico já estabelecido pela literatura.<sup>33,69</sup>

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo apresenta a primeira caracterização do processo de oxidação da Tadalafila através de medidas eletroquímicas. Em um primeiro momento os resultados mostraram que o processo de oxidação da Tadalafila sofre grande influencia do pH, e assim escolheu-se o tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7) para a realização de todo o estudo. A Tadalafila apresentou um processo de oxidação totalmente irreversível com um sinal em 830 mV. Estudos cinéticos foi possível determinar o coeficiente de transferência de carga ( $\alpha = 0,7$ ), o número de elétrons ( $n = 1$ ) e o coeficiente de difusão ( $D = 2,9 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>). E através de medidas hidrodinâmicas em eletrodo rotatório foi possível verificar que a etapa determinante na velocidade de oxidação da Tadalafila se deve a processos difusionais e também a uma limitação cinética da reação química, uma vez que a constante de velocidade heterogênea da reação,  $k'$ , determinada é igual a 0,567 mol<sup>-1</sup>.L.s<sup>-1</sup>. Em um segundo momento através foi realizado estudos quantitativos empregando as técnicas de Voltametria Ciclica, Pulso Diferencial e Onda Quadrada. Os limites de quantificação obtidos foram  $1,59 \times 10^{-6}$ ,  $2,71 \times 10^{-6}$  e  $3,72 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> respectivamente. Assim a técnica de Onda Quadrada foi utilizada para a determinação de Tadalafila em formulações farmacêuticas e os dados obtidos foram comparados com a técnica de cromatografia apresentando uma boa correlação. O valor encontrado de Tadalafila na formulação foi de aproximadamente 20 mg por comprimido estando em concordância com o estabelecido pelo fabricante, indicando que o medicamento não está adulterado. Assim os resultados mostram que o método desenvolvido utilizando a técnica de Onda Quadrada nas condições otimizadas (tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH = 7) é muito sensível para a determinação de tal composto e pode ser aplicado no controle de qualidade em formulações farmacêuticas de Cialis®.

## REFERÊNCIAS

- 1 SEVCENKO, N. **A corrida para o século XXI: no loop da montanha russa**. 1 ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2001.
- 2 ORTIZ, R. S. et al. Profiling counterfeit Cialis, Viagra and analogs by UPLC-MS. **Forensic Science International**, v. 229, n. 1-3, p. 13-20, 2013.
- 3 NUHU, A. A. Recent analytical approaches to counterfeit drug detection. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 5, p. 6-13, 2011.
- 4 GUPTA, V. K. et al. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals - A review. **Analytical Biochemistry**, v. 408, n. 2, p. 179-196, 2011.
- 5 JUNG, C. R. et al. A new methodology for detection of counterfeit Viagra(R) and Cialis(R) tablets by image processing and statistical analysis. **Forensic Science International**, v. 216, n. 1-3, p. 92-96, 2013.
6. COHEN, J. S. Should Patients be Given an Initial Low Test Dose of Sildenafil? **Drug Safety**, v. 23, n. 1, p. 1-9, 2000.
- 7 NIKOLAOU, P. et al. Development and validation of a GC/MS method for the determination of tadalafil in whole blood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 3, p.577-581, 2011.
- 8 ORTIZ, R. S.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R. Determinação de citrato de sildenafila e de Tadalafila por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 389-393, 2010.
- 9 CHENG, C. L.; CHOU, C. H. Determination of tadalafil in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 822, n. 1-2, p. 278-284, 2005.
- 10 SHAKYA, A. K. et al. Validated liquid chromatographic-ultraviolet method for the quantitation of tadalafil in human plasma using liquid-liquid extraction. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 852, n. 1-2, p. 403-408, 2007.

11 EARDLEY, I. D. et al. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. **Journal of Sexual Medicine**, v. 7, n. 1-2, p. 524-540, 2010.

12 GIULIANO, F.; VARANESE, L. Tadalafil: a novel treatment for erectile dysfunction. **European Heart Journal Supplements**, v. 4, (Supplement H) H24 – H31, 2002.

13 GIULIANO, F. Phosphodiesterase type 5 inhibition in erectile dysfunction: an overview. **European Heart Journal Supplements**, v. 4, (Supplement H) H7 – H12, 2002.

14 FALK, J. A.; PHILIP, K. J.; SCHWARZ, E.R. The emergence of oral tadalafil as a once-daily treatment for pulmonary arterial hypertension. **Vascular Health and Risk Management**, v. 6, p. 273-280, 2010.

15 GALIÈ, N. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 119, n. 22, p. 2894-2893, 2009.

16 KLINGER, J. R. Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 5, n. 3, p. 315-328, 2011.

17 ROSENZWEIG, E. B. Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 11, n. 1, p. 127-132, 2010.

18 FREY, M. K.; LANG, I. Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 13, n. 5, p. 747-755, 2012.

19 OUDIZ, R. J. et al. Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a double-blind 52-week uncontrolled extension study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 60, n. 8, p. 768-774, 2012.

20 BARST, R. J. et al. Tadalafil monotherapy and as add-on to background bosentan in patients with pulmonary arterial hypertension. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 30, n. 6, p. 632-43, 2011.

21 ARIF, S. A.; POON, H. Tadalafil: a long-acting phosphodiesterase-5 inhibitor for the treatment of pulmonary arterial hypertension. **Clinical Therapeutics**, v. 33, n. 8, p. 993-1004, 2011.

22 FREY, M. K.; LANG, I. Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 13, n. 5, p. 747-755, 2012.

23 PORST, H. IC-351 (Tadalafil, Cialis): update on clinical experience. **International Journal of Impotence Research**, v. 14, (Supplement 1), p. S57–S64, 2002.

24 RING, B. J. Effect of Tadalafil on Cytochrome P450 3A4–mediated Clearance: Studies in Vitro and in Vivo. **Nature**, v. 77, n. 1, p. 63-75, 2005.

25 SUSSMAN, D. O. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Efficacy of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 104, n. 3 (Supplement 4), p. S11-S15, 2004.

26 LATIES, A. M. Vision disorders and phosphodiesterase type 5 inhibitors: a review of the evidence to date. **Drug Safety**, v. 32, n. 1, p. 1-18, 2009.

27 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Produtos Falsificados de 1999/2012. 2013. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/o0N>>. Acesso em: 30 set. 2013.

28 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Lote falsificado do medicamento Cialis é apreendido. 2012. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/Up6>> Acesso em: 30 set. 2013.

29 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Lote falsificado do medicamento Cialis é apreendido**. 2013. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/ccwV>> Acesso em: 30 set. 2013.

30 ORTIZ, R. S. et al. Counterfeit Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: can the same pharmaceutical powder mixture be used to falsify two medicines? **Forensic Science International**, v. 226, n. 1-3, p. 282-289, 2013.

31 BOGUSZ, M. J. et al. Application of LC–ESI–MS–MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 554-564, 2006.

32 LIANG, Q. et al. Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 2, p. 305-311, 2006.

33 ZOU, P. et al. Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid

chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, n. 1-2, p. 113–122, 2006.

34 SINGH, S. et al. Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 13-28, 2009.

35 KWOK, K.; TAYLOR, L. S. Analysis of counterfeit Cialis (R) tablets using Raman microscopy and multivariate curve resolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 66, p. 126-135, 2012.

36 ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Validated Method for Tadalafil Analysis in Pharmaceutical Preparations by Capillary Electrophoresis. **Chromatographia**, v. 60, n. 3-4, p. 187-191, 2004.

37 ORTIZ, R. S. et al. Fingerprinting of sildenafil citrate and tadalafil tablets in pharmaceutical formulations via X-ray fluorescence (XRF) spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 58, p. 7-11, 2012.

38 MOHAMED, S. K. Microdetermination of sildenafil, tadalafil and vardenafil drugs employed in the erectile dysfunction therapy in pharmaceutical formulations and urine samples of diabetic patients type-II in taif area, saudia arabia using atomic emission and atomic absorption spectrometry. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1037 – 1046, 2013.

39 TREFI, S. et al. Analysis of illegally manufactured formulations of tadalafil (Cialis) by 1H NMR, 2D DOSY 1H NMR and Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 1, p. 103-113, 2008.

40 FARTHING, C.A. et al. A simple and sensitive HPLC fluorescence method for determination of tadalafil in mouse plasma. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 878, n. 28, p. 2891-2895, 2010.

41 RAMAKRISHNA, N.V. S. et al. Quantitation of tadalafil in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionization. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 809, n. 2, p. 243-249, 2010.

42 MA, B. et al. Rapid analysis of tadalafil in human blood plasma and seminal plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 77, p. 149-157, 2013.

43 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: fundamentals and applications**, 2. ed. Estados Unidos: John Wiley, 2001.

44 SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

45 EL-MAALI, N. A. Voltammetric analysis of drugs. **Bioelectrochemistry**, v. 64, n. 1, p. 99-107, 2004.

46 SINGH, A. K.; GUPTA, V.K.; GUPTA, B. Chromium(III) selective membrane sensors based on Schiff bases as chelating ionophores. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, n. 1, p. 171-178, 2007.

47 JAIN, R.; DWIVEDI, A.; MISHRA, R. Adsorptive stripping voltammetric behavior of nortriptyline hydrochloride and its determination in surfactant media. **Langmuir**, v. 25, n. 17, p. 10364-10369, 2009.

48 SOUZA, D. et al. Voltametria de Onda Quadrada. Segunda parte: aplicações. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 790-797, 2004.

49 ACUÑA, J. A. et al. Electrochemical behaviour of droxicam: kinetic study in aqueous-organic media. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 4, p. 617-624, 2002.

50 ALVAREZ-LUEJE, A. et al. Voltammetric reduction of finasteride at mercury electrode and its determination in tablets. **Talanta**, v. 75, n. 3, p. 691-696, 2008.

51 NIGOVIC, B. Adsorptive stripping voltammetric determination of azithromycin at a glassy carbon electrode modified by electrochemical oxidation. **Analytica Sciences**, v. 20, n. 4, p. 639-643, 2004.

52 SARTORI, E. R. et al. Square-wave voltammetric determination of propranolol and atenolol in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 81, n. 4-5, p. 1418-1424, 2010.

53 GOYAL, R. N. et al. Differential pulse voltammetric determination of atenolol in pharmaceutical formulations and urine using nanogold modified indium tin oxide electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 1, p. 65-70, 2006.

54 CERVINI, P.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. Determination of atenolol at a graphite-polyurethane composite electrode. **Talanta**, v. 72, n. 1, p. 206-209, 2007.

55 RADI, A. Determination of pantoprazole by adsorptive stripping voltammetry at carbon paste electrode. **IL Farmaco**, v. 58, n. 7, p. 535-539, 2003.

56 TORRES, R. F. et al. Electrochemical oxidation of cisatracurium on carbon paste electrode and its analytical applications. **Talanta**, v. 53, n. 6, p. 1179-1185, 2001.

57 GONÇALVES, E. S. Efeito do tratamento térmico na microestrutura, turbostraticidade e superfície de carbono vítreo reticulado analisado por XPS , espalhamento raman e voltametria cíclica. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 158-164, 2009.

58 FERRARI, P. E.; REZENDE, M. C. Carbono Polimérico: Processamento e Aplicação. **Polímeros**, v. 8, n. 4, São Carlos Oct./Dec. p. 23-30, 1998.

59 ROUSSEAU, F.; TCHOUBAR, D. Structural evolution of a glassy carbon as a result of thermal treatment between 1000 and 2700 °C I: Tridimensional configuration of a glassy carbon. **Carbon**, v. 15, n. 2, p. 63-68, 1977.

60 FRIEDRICH, J. M. et al. Reticulated vitreous carbon as an electrode material. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 561, p. 203-217, 2004.

61 WANG, J. Reticulated vitreous carbon-a new versatile electrode material. **Electrochimica Acta**, v. 26, n. 12, p. 1721-1726, 1981.

62 DE OLIVEIRA, M. F. et al. Simultaneous determination of zinc, copper, lead, and cadmium in fuel ethanol by anodic stripping voltammetry using a glassy carbon-mercury-film electrode. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, n. 1, p. 135-140, 2004.

63 MÜLAZIMOĞLU, I. E. AND SOLAK, A. O. A novel apigenin modified glassy carbon sensor electrode for the determination of copper ions in soil samples. **Analytical Methods**, v. 3, n. 11, p. 2534-2539, 2011.

64 SANTOS, A. L. et al. Study of electrochemical oxidation and determination of albendazole using a glassy carbon-rotating disk electrode. **IL Farmaco**, v. 60, n. 8, p. 671-674, 2005.

65 WANG, Z.; LIU, E.; ZHAO, X. Glassy carbon electrode modified by conductive polyaniline coating for determination of trace lead and cadmium ions in acetate buffer solution. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 15, p. 5285-5289, 2011.

66 HWANG, G. H. et al. Determination of trace amounts of lead and cadmium using a bismuth/glassy carbon composite electrode. **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1432-1436, 2009.

67 ALEKSIĆ, M. M. et al. An extensive study of electrochemical behavior of brimonidine and its determination at glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 106, p. 75-81, 2013.

68 BAGHERI, A.; HOSSEINI, H. Electrochemistry of raloxifene on glassy carbon electrode and its determination in pharmaceutical formulations and human plasma. **Bioelectrochemistry**, v. 88, p. 164-170, 2012.

69 ZHU, X. et al. Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, n. 1-2, p. 89–95, 2005.

70 ABDEL-AZIZ, A. A. M. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**. v. 36, p. 287-329, 2011.

71 PRASANNA, T. V. Murthy Design and evaluation of solid dispersed tadalafil tablets. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 12, p. 4738-4744, 2007.

72 VYAS, V. Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407. **Acta Pharmaceutica**, v. 59, p. 453-461, 2009.

73 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectral de compostos orgânicos**. 7. ed. São Paulo: LTC, 2009.

74 BUGAY, D. E. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 43-65, 2001.

75 VYAS, V. et al. Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407. **Acta Pharmaceutica**, v. 59, n. 4, p. 453-461, 2009.

76 PRASANNA, V. Design and evaluation of solid dispersed Tadalafil tablets. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 12, p. 4738-4744, 2007.

77 STEPHENSON, G. A.; FORBES, R. A.; REUTZEL-EDENS, S. M. Characterization of the solid state: quantitative issues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 67-90, 2001.

78 PHADNIS, N. V.; CAVATUR, R. K.; SURYANARAYANAN, R. Identification of drugs in pharmaceutical dosage forms by X-ray powder diffractometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 7, p. 929-943, 1997.

79 VERONEZ, I. P.; DANIEL, J. S. P.; GARCIA, J. S.; TREVISAN, M. G. Characterization and compatibility study of desloratadine. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 603, n. 3, p. 2407-2414, 2013.

80 DAUGAN, A. et al. The Discovery of Tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor C1=NC2=C(C=C1)N(C(=O)N2)C3=CC=CC=C3 analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 21, p. 4533-4542, 2003.

81 ALGHAMDI, A. F. Electrochemical oxidation behavior of hydrochlorothiazide on a glassy carbon electrode and its voltammetric determination in pharmaceutical formulation and biological fluids. **Journal of Food and Drug Analysis**, p. 1-7, 2014.

82 TERADAL, N. L. et al. Fabrication of electrochemical sensor based on green reduction of graphene oxide for an antimigraine drug, rizatriptan benzoate. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 196, n. , p. 596-603.

83 LUBOMÍR ŠVORC et al. Rapid and sensitive electrochemical determination of codeine in pharmaceutical formulations and human urine using a boron-doped diamond film electrode. **Electrochimica Acta**, v. 87, n. 1, p. 503-510, 2013.

84 MARCO, J. P. et al. Development of a simple, rapid and validated square wave voltammetric method for determination of promethazine in raw material and pharmaceutical formulation using DNA modified multiwall carbon nanotube paste electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 251–259, 2013.

85 BAGHERI, A.; HOSSEINI, H. Electrochemistry of raloxifene on glassy carbon electrode and its determination in pharmaceutical formulations and human plasma. **Bioelectrochemistry**, v. 88, p. 164–170, 2012.

86 PISOSCHI, A. M. et al. Electrochemical methods for ascorbic acid determination. **Electrochimica Acta**, v. 121, n. 1, p. 443–460, 2014.

87 ÖZDEN, Z.; DURMUŞ; E. DINÇ, Electrochemical oxidation behavior of ezetimibe and its adsorptive stripping determination in pharmaceutical dosage forms and biological fluids. *Research on Chemical Intermediates*, v. 39, n. 6, p. 1-16, 2013.

88 WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 3 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

89 KAMYABI, M. A.; AGHAJANLOO, F. Electrocatalytic oxidation and determination of nitrite on carbon paste electrode modified with oxovanadium (IV)-4-methyl salophen. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 614, n. 1-2, p. 157-165, 2008.

90 AZEVEDO, L. F. M. et al. Electrochemical Oxidation, Adsorption and Quantification of 1,2-Benzopyrone Employing a Glassy Carbon Electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, n. 3, p. 469-477, 2014.

91 BENVIDI, P.; KAKOOLAKI, H. R.; ZARE, R.; VAFAZADEH, R. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at a Co(II) complex multi-wall carbon nanotube modified carbon paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 5, p. 2045-2050, 2011.

92 C. COUGNON, Modelling by impedance measurements of screen printing electrodes containing different ratio of poly(vinyl chloride) and cellulose acetate. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 20, p. 4142-4147, 2006.

93 WANG, L.; Liu, H. Electrochemical Reduction of Coumarins at a Film Modified Electrode and Determination of Their Levels in Essential Oils and Traditional Chinese Herbal Medicines. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3538-3550, 2009.

94 MAZLOUM-ARDAKANI, M. et al. Electrochemical behavior of dopamine at a [1,1'-binaphthalene]-4,4'-diol modified carbon nanotube paste electrode and the simultaneous determination of dopamine, folic acid and uric acid. **Analytical Methods**, v. 5, n. 24, p. 6982-6989, 2013.

95 MAJIDI, M. R.; JOUYBAN, A.; ASADPOUR-ZEYNALI, K. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at overoxidized polypyrrole film modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 21, p. 6248-6253, 2007.

96 NASSEF, H. M.; RADI, A.; O'SULLIVAN, C. K. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at o-aminophenol grafted modified glassy carbon electrode: Reusable hydrazine amperometric sensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 592, n. 2, p. 139-146, 2006.

97 LEDDY, J.; BARD, A. J.; MALOY, J. T.; SAVÉANT, J. M. Kinetics of film-coated electrodes: Effect of a finite mass transfer rate of substrate across the film solution interface at steady state. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 187, n. 2, p. 205-227, 1985.

98 GOLABI, S. M.; ZARE, H. R. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at a chlorogenic acid (CGA) modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 465, n. 2, p. 168-176, 1999.

99 ABBASPOUR, A.; KAMYABI, M. A. Electrocatalytic oxidation of hydrazine on a carbon paste electrode modified by hybrid hexacyanoferrates of copper and cobalt films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 576, n. 1, p. 73-83, 2005.

100 ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. Recommendation for definition, estimation and use of the detection limit. **Analyst**. v. 112. p. 199, 1987.

101 HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005