



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

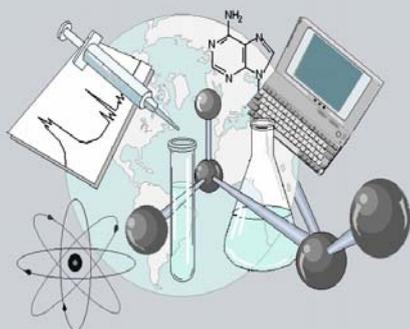
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Desenvolvimento de método voltamétrico para  
determinação de piridoxina em fármacos”**

Dissertação apresentada por  
**Solange Maria Cottica** ao Programa  
de Pós-Graduação em Química do  
Departamento de Química do Centro  
de Ciências Exatas da Universidade  
Estadual de Maringá como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de  
Mestre em Química

**CE**



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, FEVEREIRO/2007**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

C848d Cottica, Solange Maria  
Desenvolvimento de método voltamétrico para  
determinação de piridoxina em fármacos / Solange  
Maria Cottica. -- Maringá : [s.n.], 2007.  
48 f. : il. tabs., grafs.

Orientador : Prof. Dr. Jorge Nozaki (in  
memorian)  
Orientador : Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer  
Co-Orientadora : Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Shizuko  
Nakatani

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual  
de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Química,  
2007.

1. Análise eletroquímica. 2. Voltametria. 3.  
Piridoxina. 4. Eletrodo modificado. I. Universidade  
Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em  
Química. II. Título.

CDD 21.ed. 543.0871

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

---

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

## *“Desenvolvimento de Método Voltamétrico para Determinação de Piridoxina em Fármacos”*

Dissertação apresentada por  
**Solange Maria Cottica** ao Programa de  
Pós-Graduação em Química do  
Departamento de Química do Centro de  
Ciências Exatas da Universidade Estadual  
de Maringá como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Mestre em  
Química.

**Orientadores:** Prof. Dr. Jorge Nozaki (*in memorian*)

Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer

**Co-Orientadora:** Profa. Dra. Helena Shizuko Nakatani

**MARINGÁ – 2007**

*“O Futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos”*

*(Eleanor Roosevelt)*

*À memória de minha mãe Tereza,  
Exemplo de lealdade e honestidade.  
Sempre sinto sua presença.  
Onde estiver, obrigada pelos seus ensinamentos,  
Amor e carinho dedicados.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida.

Ao Prof. Dr. Jorge Nozaki *in memoriam*, exemplo de bondade, serenidade e humanismo.

À Profa. Dra. Helena S. Nakatani pela acolhida, amizade e pela valiosa contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jesuí V. Visentainer pela “adoção” e pelo apoio prestado.

Ao meu esposo Michel pelo amor, carinho, incentivo e apoio incondicional. Obrigada por ter acreditado na realização de mais este sonho.

Ao meu pai Silvestre e aos meus irmãos Roberto e Adriano, pela base forte que é a família.

Ao meu sogro Miguel, pelas caronas na boléia do caminhão.

Às amigas de república Mary, Elídia, Rose e Edi, pela força nos momentos de crise, saudades e choro, e também pelas alegrias compartilhadas.

Às amigas Ângela e Marcela, pela receptividade, incentivo e amizade.

Aos colegas do laboratório do Bloco 18, pelo apoio e cooperação recebidos durante a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Química da UEM, professores, funcionários, colegas do curso de Pós-Graduação e a todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 – <i>VITAMINA B<sub>6</sub></i> .....	3
1.2 – <i>MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE PIRIDOXINA (PN)</i> .....	5
1.2.1 – <i>Determinações cromatográficas de PN</i> .....	5
1.2.2 – <i>Determinações espectrofotométricas de PN</i> .....	5
1.2.3 – <i>Determinações microbiológicas de PN</i> .....	6
1.2.4 – <i>Determinações voltamétricas de PN</i> .....	6
1.3 - <i>VOLTAMETRIA</i> .....	8
1.3.1 – <i>Principais Métodos Voltamétricos</i> .....	10
1.3.2 – <i>Eletrodos de Trabalho</i> .....	11
1.4 – <i>VALIDAÇÃO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS</i> .....	13
<b>2 – PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>16</b>
2.1 – <i>SOLUÇÕES E REAGENTES</i> .....	16
2.2 – <i>EQUIPAMENTOS</i> .....	17
2.3 – <i>MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO</i> .....	17
2.4 – <i>PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS FARMACÊUTICAS</i> .....	17
2.5 – <i>DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE PIRIDOXINA</i> .....	18

<b>3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	20
<b>3.1 – MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO</b> .....	20
3.1.1 – <i>Escolha do reagente precursor</i> .....	22
3.1.2 – <i>Tempo de eletrodeposição</i> .....	23
3.1.3 – <i>Concentração dos reagentes precursores</i> .....	25
<b>3.2 – ELETRÓLITO DE SUPORTE</b> .....	27
<b>3.3 – FORÇA IÔNICA DO MEIO</b> .....	29
<b>3.4 – ESTUDO DA VELOCIDADE DE VARREDURA</b> .....	30
<b>3.5 – EFEITO DO pH</b> .....	32
<b>3.6 – CURVA ANALÍTICA</b> .....	35
<b>3.7 – ESTUDO DE INTERFERENTES</b> .....	38
<b>3.8 – DETERMINAÇÃO DE PIRIDOXINA EM FÁRMACOS</b> .....	39
<b>4 – CONCLUSÕES</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1.	Parâmetros utilizados no potenciostato para determinação de piridoxina.....	19
TABELA 2.	Escolha do eletrólito de suporte para a determinação de piridoxina.....	27
TABELA 3.	Estudo da força iônica para determinação de piridoxina.....	29
TABELA 4.	Estudo da velocidade de varredura para determinação de piridoxina.....	31
TABELA 5.	Estudo do pH para determinação de piridoxina.....	33
TABELA 6.	Melhores condições para determinação voltamétrica de piridoxina no eletrodo modificado.....	35
TABELA 7.	Parâmetros médios obtidos a partir de quatro curvas de calibração.....	37
TABELA 8.	Interferência de compostos na determinação de piridoxina.....	38
TABELA 9.	Determinação de piridoxina em fármacos pelo método voltamétrico proposto.....	43

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1.	Formas estruturais da vitamina B <sub>6</sub> .....	3
FIGURA 2.	Esquema de cela eletroquímica com seus respectivos eletrodos.....	8
FIGURA 3.	Processo de transferência de elétron em um eletrodo.....	10
FIGURA 4.	Curva de calibração utilizada no teste de recuperação.....	15
FIGURA 5.	Voltamograma cíclico do Eletrodo de Carbono Vítreo (ECV) antes e após a eletrodeposição.....	21
FIGURA 6.	Voltamograma cíclico do ECV após eletrodeposição em diferentes precursores.....	22
FIGURA 7.	Voltamograma cíclico do ECV durante eletrodeposição a diferentes tempos.....	23
FIGURA 8.	Variação na corrente do ECV a cada varredura pelo excesso de complexo depositado.....	24
FIGURA 9.	Voltamograma cíclico do ECV com e sem agitação magnética.....	25
FIGURA 10.	Variação do perfil voltamétrico do eletrodo modificado com diferentes concentrações de CrCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O e K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ].....	26
FIGURA 11.	Voltamograma cíclico do eletrodo modificado com CrHCF em diferentes eletrólitos.....	28
FIGURA 12.	Variação da corrente com a força iônica do meio após adição de piridoxina.....	29
FIGURA 13.	Variação da corrente em 0,88 V com a raiz quadrada da velocidade de varredura.....	30
FIGURA 14.	Voltamograma do eletrodo modificado com CrHCF em diferentes velocidades de varredura.....	31
FIGURA 15.	Variação da corrente com a adição de PN em diferentes velocidades de varredura.....	32
FIGURA 16.	Variação da corrente com o pH no eletrodo modificado com CrHCF, após adição de PN.....	33
FIGURA 17.	Voltamograma do eletrodo modificado com CrHCF para adições sucessivas de PN.....	34

FIGURA 18. Curva analítica para determinação de piridoxina no intervalo de concentração linear.....	35
FIGURA 19. Curva de linearidade.....	36
FIGURA 20. Adição de padrão e ensaio de recuperação para determinação de PN em Seis-B <sup>®</sup> .....	40
FIGURA 21. Adição de padrão e ensaio de recuperação para determinação de PN em Dramin <sup>®</sup> B <sub>6</sub> .....	41
FIGURA 22. Adição de padrão e ensaio de recuperação para determinação de PN em Citoneurin <sup>®</sup> .....	42

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**PN** – Piridoxina;

**HCF** – Hexacianoferrato;

**CrHCF** – Hexacianoferrato de cromo;

**DPR** – Desvio padrão relativo;

**s** – Estimativa do desvio padrão;

**coef. linear** – Coeficiente linear;

**coef. ang.** – Coeficiente angular;

**LD** – Limite de detecção;

**LQ** – Limite de quantificação;

**pH** – Potencial hidrogeniônico;

**ECV** – Eletrodo de Carbono Vítreo;

**i** – Corrente;

**E** – Potencial.

**v** – Velocidade de varredura

COTTICA, S. M., “Desenvolvimento de Método Voltamétrico para Determinação de Piridoxina em Fármacos”, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós – Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, 2007.

## RESUMO

Um eletrodo de carbono vítreo modificado com hexacianoferrato(II) de cromo(III) foi aplicado para a determinação de piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) em três diferentes fármacos, através da técnica de voltametria cíclica. A influência de vários parâmetros na resposta voltamétrica do eletrodo modificado foi analisada. A faixa linear de concentração encontrada foi de  $1,33 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> a  $1,32 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> da vitamina, com  $r = 0,9990$  e estimativa do desvio padrão relativo de 4,2%. Os limites de detecção e de quantificação obtidos foram de  $3,46 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e  $1,05 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. O método proposto para a determinação voltamétrica da vitamina B<sub>6</sub> apresentou uma boa exatidão e os resultados experimentais demonstraram que o eletrodo de carbono vítreo modificado com hexacianoferrato(II) de cromo(III) apresenta um grande potencial para análise de piridoxina em amostras reais. Além disso, apresenta vantagens como uma resposta rápida, um baixo limite de detecção, baixo custo e simplicidade no desenvolvimento e aplicação.

**Palavras-chave:** Voltametria; Eletrodo de carbono-vítreo modificado; Hexacianoferrato(II) de cromo(III); Piridoxina; Vitamina B<sub>6</sub>

## ABSTRACT

A CrHCF-modified vitreous carbon electrode was used to determine pyridoxine (vitamin B<sub>6</sub>) in three drugs by cyclic voltammetry. The influence of several parameters on the voltammetric electrode response was analyzed. The linear range found was from  $1.33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  to  $1.32 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  of vitamin, with  $r = 0.9990$  and relative standard deviation of 4.2%. The limits of detection and quantification were  $3.46 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  and  $1.05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , respectively. The voltammetric method proposed for the determination of vitamin B<sub>6</sub> presented good accuracy and the experimental results demonstrated that the CrHCF-modified vitreous carbon electrode has a large potential for the analysis of pyridoxine in real samples. Furthermore, it has the advantages of a fast response, a low detection limit, low cost, and simple development and application.

**Keywords:** Voltammetry; Modified vitreous carbon electrode; Chromium(III) hexacyanoferrate(II); Pyridoxine; Vitamin B<sub>6</sub>

## 1 - INTRODUÇÃO

As vitaminas são moléculas orgânicas pequenas, requeridas pelo corpo humano em quantidades mínimas a fim de realizar funções celulares específicas. A maioria das vitaminas não pode ser sintetizada pelos animais, ou o são em quantidades insuficientes para desempenhar seu papel, sendo necessária sua inclusão na dieta alimentar, ou até mesmo o uso de medicamentos. Como resultado da carência ou do excesso de vitaminas, podem ocorrer diversas doenças nos organismos que as necessitam, devido à alteração de reações que as vitaminas regulam no metabolismo, o que provoca um distúrbio no balanço metabólico (Berg, Tymoczko e Stryer, 2004).

A classificação das vitaminas é feita com relação à solubilidade destas em água ou em gordura, sendo divididas em hidrossolúveis, representadas pelas vitaminas do complexo B e ácido ascórbico (ou vitamina C), e em lipossolúveis, representadas pelas vitaminas A, D, E e K que são encontradas associadas aos lipídios dos alimentos naturais. Muitas das vitaminas hidrossolúveis são precursoras de coenzimas para as enzimas do metabolismo, ou seja, possuem atividade catalítica. Encontram-se inativas na forma livre, mas, ao sofrerem mudanças estruturais ou interações com outras moléculas, sua forma ativa (coenzima) é gerada (Berg, Tymoczko e Stryer, 2004).

No grupo das vitaminas hidrossolúveis, encontra-se a vitamina B<sub>6</sub>, responsável, principalmente, pela transferência de grupamentos de aminoácidos, atuando como coenzima (Berg, Tymoczko e Stryer, 2004). Sua carência provoca alterações na pele, no sistema nervoso e determinados tipos de anemia. A vitamina B<sub>6</sub> é normalmente utilizada na formulação de medicamentos sob a forma de piridoxina (PN) (Aniceto e Fatibello-Filho, 1999).

Devido à necessidade, em alguns casos, de ingerir a vitamina B<sub>6</sub> através de fármacos, é importante que sejam desenvolvidos métodos simples e eficientes para a determinação da mesma nesses meios, a fim de controlar a quantidade exata que está sendo ingerida. Na literatura, encontram-se vários métodos voltamétricos para a determinação de piridoxina, sendo o primeiro estudo do comportamento eletroquímico de PN realizado em 1975 por Söderhjelm e

Lindquist (Söderhjelm e Lindquist, 1975). As técnicas de voltametria englobam um conjunto de métodos que, através da medida de intensidade de corrente em função do potencial aplicado, trazem informações qualitativas e quantitativas do analito de interesse.

Recentemente, vários trabalhos envolvendo o uso de eletrodos modificados em voltametria foram publicados (Qu, Wu e Hu, 2004; Teixeira *et al*, 2003; Teixeira *et al*, 2004). A determinação de piridoxina foi proposta utilizando um eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanotubos de carbono (Qu, Wu e Hu, 2004). Da mesma forma, foi avaliada a resposta voltamétrica de PN em medicamentos com eletrodos de pasta de carbono modificados com hexacianoferrato(III) de cobre(II) (Teixeira *et al*, 2003) e com o complexo N,N'-etilenobis(salicilidenoaminato) de oxovanádio(IV) ([VO(Salen)]) (Teixeira *et al*, 2004).

A combinação do uso de um eletrodo de carbono vítreo modificado com complexos de ferricianeto pode ser um fator positivo na determinação de piridoxina, pois tais condições apresentaram boa seletividade para a PN (Qu, Wu e Hu, 2004; Teixeira *et al*, 2003). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo utilizar um eletrodo de carbono vítreo modificado com hexacianoferrato(II) de cromo(III) (CrHCF), para determinação voltamétrica da vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina) em fármacos. Assim como, verificar os melhores parâmetros a serem utilizados na modificação da superfície do eletrodo e na determinação de PN.

## 1.1 – VITAMINA B<sub>6</sub>

A vitamina B<sub>6</sub> pode ser encontrada em diferentes formas: com um grupo funcional aldeídico (Piridoxal), com uma amina primária (Piridoxamina), com um grupo álcool primário (Piridoxina) e, também, nas suas respectivas formas de 5-fosfato (Figura 1), sendo normalmente interconvertidas no organismo (Kall, 2003; Bisp *et al*, 2002). A piridoxina (PN), por ser a forma mais estável destes compostos, é a mais utilizada para a formulação de medicamentos a base de vitamina B<sub>6</sub> (Aniceto e Fatibello-Filho, 1999).

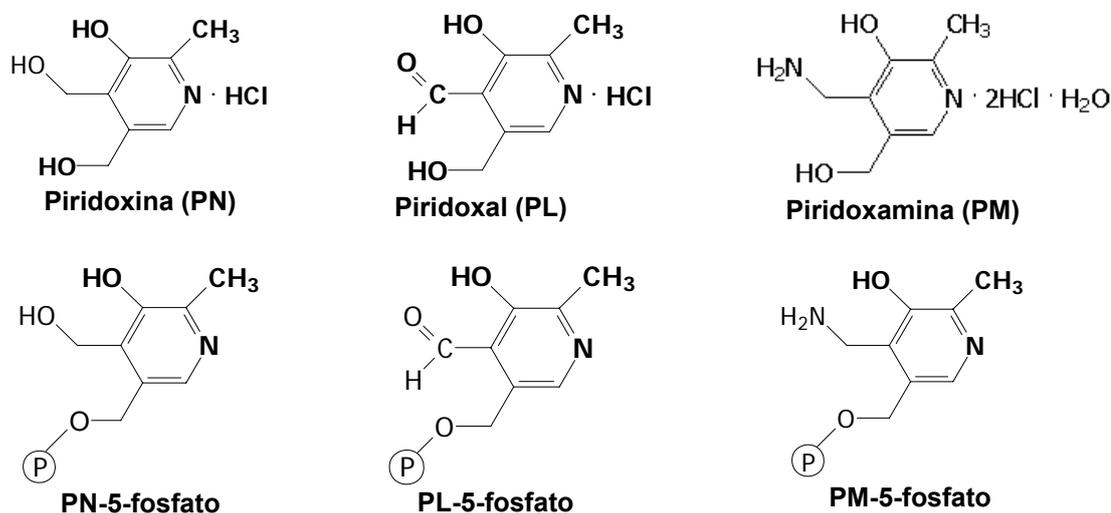


FIGURA 1. Formas estruturais da vitamina B<sub>6</sub> (Salvo *et al*, 2003).

A piridoxina é convertida no organismo por meio de fosforilação para piridoxal-5-fosfato, a qual atua como coenzima de aproximadamente 60 enzimas, principalmente aquelas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e proteínas (Aniceto e Fatibello-Filho, 1999). Em menor quantidade, PN é também fosforilada a piridoxamina-5-fosfato, uma coenzima das transaminases, descarboxilases, desaminases e de outras enzimas importantes no metabolismo protéico (Apsen Farmacêutica S/A). Dessa forma, PN atua diretamente, como coenzima e, indiretamente, na degradação de aminoácidos, onde um dos produtos finais é a

acetil coenzima A, utilizada na produção de energia e na síntese de proteínas, lipídios, entre outros (Korolkovas e Burckhalter, 1982).

Assim, a piridoxina atua sobre o sistema nervoso central e periférico como analgésico e calmante natural, auxiliando em convulsões, depressão e neuropatia. Age sobre a pele, auxiliando em lesões seborréicas da face como acne e eczema, e controla a retenção de líquidos no corpo. Além de atuar, também, sobre a hematopoese, que é a formação e desenvolvimento das células sanguíneas, sendo empregada no tratamento de anemia com reserva normal ou aumentada de ferro (anemia sideroblástica), observada especialmente em casos de alcoolismo (Aniceto e Fatibello-Filho, 1999; Korolkovas e Burckhalter, 1982; Augustin, 1994).

A piridoxina é encontrada, principalmente, associada às proteínas nos alimentos como peixes (atum, truta, salmão), nozes (amendoins, avelãs), cereais de grão integral (arroz, trigo, aveia), milho, feijão, banana, leite, aves, carne suína, etc. Determinadas ações realizadas com os alimentos, como por exemplo, o congelamento de vegetais, o cozimento de cereais e a moagem, podem reduzir a quantidade de PN em 25, 40 e 90 %, respectivamente (Rothenet, 2007). Além disso, apesar de ser relativamente estável ao calor (sublima a 205 °C), ela se decompõe por oxidação, luz ultra-violeta e por ambientes alcalinos (Windholz *et al*, 1976).

## **1.2 – MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE PIRIDOXINA (PN)**

Muitos métodos e técnicas analíticas vêm sendo desenvolvidas para a determinação de piridoxina em diferentes tipos de amostras como medicamentos, leite, massas e carnes. Dentre alguns trabalhos desenvolvidos, encontram-se os métodos cromatográficos, espectrofotométricos, microbiológicos e voltamétricos.

### **1.2.1- Determinações cromatográficas de PN**

A determinação de piridoxina por técnicas cromatográficas envolve o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a separação dos componentes da amostra (Kall, 2003; Marszall *et al*, 2005; Albalá-Hurtado *et al*, 1997; Esteve *et al*, 1998; Gatti, Gioia e Cavrini, 2004). Esta técnica necessita de uma cuidadosa preparação da amostra e exige a utilização de reagentes químicos de elevado grau de pureza, a fim de evitar a contaminação da coluna cromatográfica. Devido a isto, determinações cromatográficas de PN são extensivamente caras e demoradas.

### **1.2.2 – Determinações espectrofotométricas de PN**

As técnicas espectrofotométricas para a determinação de piridoxina não podem ser empregadas de forma direta. Os comprimentos de onda de absorção da PN são em torno de 250, 290 e 325 nm (Windholz, 1976), que são regiões de absorção muito próximas às observadas nos compostos geralmente encontrados com a piridoxina, o que provoca a sobreposição de bandas. Dessa forma, há a necessidade de associar estes métodos com algum tipo de derivatização do analito com reagentes específicos, deslocando sua banda de absorção para regiões que não sofrem interferências (Aniceto e Fatibello-Filho, 1999; Instituto Adolfo Lutz, 1985), ou ainda, a etapas de pré-separação e pré-concentração da PN (Canada, Reguera e Díaz, 2000), ambos utilizando um sistema de injeção em fluxo.

### 1.2.3 - Determinações microbiológicas de PN

A utilização de metodologia microbiológica para a determinação de piridoxina é empregada nos Métodos Oficiais da AOAC (Association of Official Analytical Chemistry – Official Method 985.32, 1984). No entanto, ensaios microbiológicos são bastante demorados e complexos, envolvem a utilização de meios de cultura, além do uso de autoclave.

### 1.2.4 – Determinações voltamétricas de PN

As técnicas voltamétricas, quando comparadas com os métodos cromatográficos, espectrofotométricos e microbiológicos, representam uma alternativa para a determinação de piridoxina, pois, apresentam um baixo custo, dispensam a exaustiva etapa de preparação de amostra e a utilização de reagentes com elevado grau de pureza, além de serem técnicas rápidas, diretas e de simples desenvolvimento.

Na literatura são relatados estudos utilizando um eletrodo de carbono vítreo para a determinação simultânea de PN e cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) através de métodos de calibração multivariados, sendo obtida uma faixa linear de  $10^{-3}$  a  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> de piridoxina (Hernández, Ribero e Goicoechea, 2003). Hernández *et al* (2003) justificam que esta faixa foi obtida devido à complexidade da mistura, e que pode ser melhorada na determinação individual destas vitaminas, chegando-se a um limite de quantificação de aproximadamente  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Por outro lado, a utilização de um eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado para a determinação de PN alcançou uma faixa linear mais ampla de  $5 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e um valor na ordem de  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> para o limite de detecção (Qu, Wu e Hu, 2004).

Também foram desenvolvidos eletrodos de pasta de carbono modificados com hexacianoferrato(III) de cobre(II) (Teixeira *et al*, 2003) e com o complexo [VO(Salen)] (Teixeira *et al*, 2004) para a determinação de piridoxina, sendo alcançados limites de detecção de  $4,1 \times 10^{-7}$  e  $3,7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Verifica-se, desta forma, que tanto o eletrodo de carbono vítreo modificado,

quanto o eletrodo de pasta de carbono modificado com filmes de hexacianoferrato(III) de cobre(II), apresentaram uma boa sensibilidade para a PN (Qu, Wu e Hu, 2004; Teixeira *et al*, 2003).

Filmes de hexacianoferratos (HCF) de metais de transição são compostos de valência mista insolúveis, os quais apresentam atividade catalítica e que podem ser gerados por eletrodeposição de soluções que contenham um hexacianoferrato(III) e um cátion metálico (Qu, Wu e Hu, 2004). Como exemplo de um complexo de HCF, pode-se citar o hexacianoferrato(II) de cromo(III) que apresenta uma estrutura cúbica de face centrada e que, quando depositado em um eletrodo de carbono vítreo e em solução de KCl, apresenta duplas de picos de oxidação-redução, sendo um deles observado em torno 0,88 V (Lin, Tseng e Shih, 1998). Este valor de potencial é próximo ao valor encontrado na literatura para a oxidação da PN em um eletrodo de carbono vítreo não modificado, 0,85 V (Qu, Wu e Hu, 2004). Isto, possivelmente, torna o eletrodo de carbono vítreo modificado com CrHCF aplicável para a determinação voltamétrica de piridoxina.

### 1.3 - VOLTAMETRIA

A voltametria engloba um grupo de métodos eletroanalíticos que trazem informações qualitativas e quantitativas do analito de interesse, através da relação da corrente medida em função de um potencial aplicado. Tais medidas podem ser realizadas em uma cela eletroquímica constituída por três eletrodos imersos em um eletrólito de suporte, sendo um deles o eletrodo de trabalho (micro-eletrodo), o segundo é um eletrodo de referência, e o terceiro é o eletrodo auxiliar (Aleixo, 2007) (Figura 2).

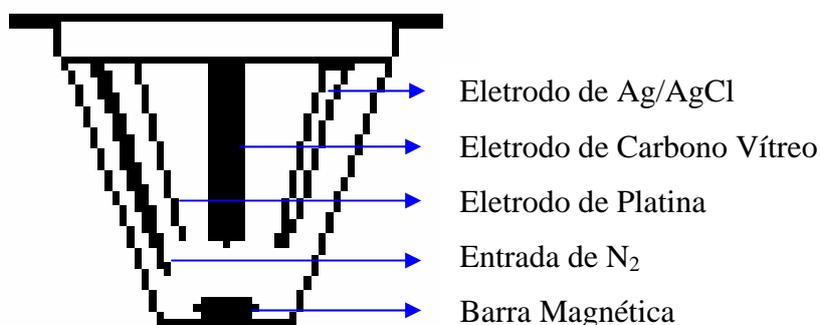


FIGURA 2. Esquema de cela eletroquímica com seus respectivos eletrodos.

Durante as medidas voltamétricas, uma diferença de potencial é aplicada entre os eletrodos de trabalho e de referência a uma velocidade constante. A corrente passa entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, e o potencial do eletrodo de referência é mantido constante. Esses eletrodos são conectados, internamente, pelas duas trajetórias condutoras em solução e, externamente, via contato elétrico. Dessa forma, o sinal (voltamograma) é obtido após passar por um amplificador operacional, que registra simultaneamente o potencial e a corrente resultante. Esta célula eletroquímica composta por três eletrodos pode ser utilizada em soluções diluídas, com alta resistência (como solventes orgânicos) e, também, com eletrólitos de suporte mais diluídos (Aleixo, 2007).

Na interface eletrodo/solução podem ocorrer dois processos que geram correntes, um processo faradaico (corrente faradaica), governado pela Lei de

Faraday, onde a extensão da reação química no eletrodo é proporcional à intensidade de corrente, e um processo não-faradaico (corrente capacitiva). O processo faradaico resulta de uma transferência direta de elétrons, da substância a ser determinada, entre os eletrodos de trabalho e o auxiliar, gerada por uma reação de oxidação-redução. O processo não-faradaico corresponde a uma corrente residual, a qual surge devido a mudanças de capacitância da dupla camada elétrica durante variações de potencial e pode ser eliminado diminuindo a área superficial ativa do eletrodo. Dessa forma, verifica-se que a sensibilidade do método aumenta com a diminuição da corrente capacitiva e com o aumento da corrente faradaica (Skoog, Holler e Nieman, 2001).

A corrente faradaica, resultante da transferência de elétrons entre a espécie eletroativa e o eletrodo de trabalho, depende do transporte de massa através da solução. O transporte de massa pode ocorrer devido à ação conjunta ou isolada das correntes de difusão, de convecção ou de migração. A corrente de difusão é gerada pelo movimento espontâneo das espécies eletroativas, que transitam entre a solução e a superfície do eletrodo, passando de uma região com alta concentração da espécie para uma região com uma baixa concentração, a fim de minimizar esta diferença. A corrente de convecção é originada pelo movimento físico da solução, ocasionado por uma agitação magnética, por exemplo, sendo eliminada ao manter-se a solução em repouso. A corrente de migração ocorre pelo movimento de espécies carregadas, que não são o analito, devido à ação de campos elétricos ou gradientes de potencial (Wang, 2000). Esta corrente pode ser eliminada utilizando-se uma alta concentração do eletrólito de suporte, pelo menos 100 vezes maior que a espécie eletroativa, o que também diminui a distância entre os íons solvatados e a superfície do eletrodo (Bard e Faulkner, 1980). Portanto, a corrente que corresponde à resposta do analito é a corrente de migração e sua participação no mecanismo de transferência de elétrons pode ser observada na Figura 3.

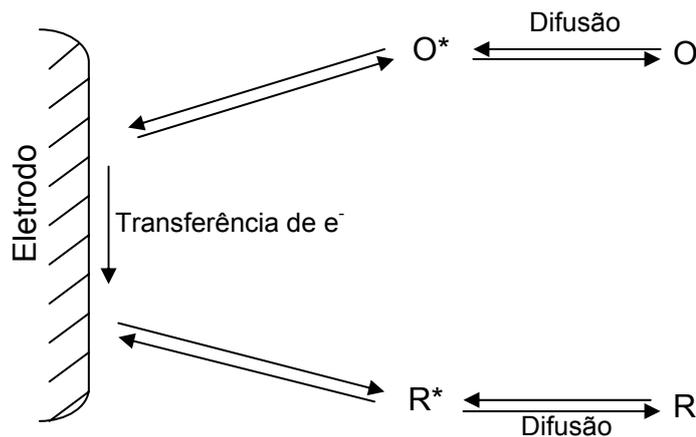


FIGURA 3. Processo de transferência de elétron em um eletrodo, onde O e R representam a espécie oxidada e reduzida, respectivamente, e O\* e R\* seus estados excitados.

### 1.3.1 – Principais Métodos Voltamétricos

Dentre os métodos voltamétricos, podem-se citar os de pulso, os de redissolução e a voltametria cíclica (C. Brett e A. Brett, 2000).

Nos métodos de pulso o potencial é aplicado em forma de pulsos sobre uma rampa de potencial linear, compensando a corrente capacitiva e melhorando a sensibilidade do método. São exemplos de técnicas de pulso a voltametria de onda quadrada e a de pulso diferencial, as quais alcançam determinações analíticas da ordem de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> (Aleixo, 2007).

Os métodos voltamétricos de redissolução também são amplamente conhecidos, sendo aplicados nos casos em que se exige uma sensibilidade menor que  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Como exemplos, pode-se citar a voltametria de redissolução anódica, na qual o analito é inicialmente reduzido na superfície do eletrodo de trabalho e depois oxidado, e a voltametria de redissolução catódica, onde a pré-concentração do analito é realizada através de sua oxidação, formando um fino filme no eletrodo, seguido de sua redução. Também é classificado como um método de redissolução, a voltametria adsortiva, na qual a pré-concentração é feita pela adsorção da espécie eletroativa na superfície do eletrodo, geralmente com a formação de complexos (Aleixo, 2007).

A voltametria cíclica é outro método voltamétrico muito utilizado, que pode alcançar determinações da ordem de  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Nesta técnica, uma varredura de potencial direta e inversa é realizada, na forma de ciclos, sendo possível observar os picos anódico e catódico da espécie eletroativa (quando existirem), ou seja, a forma oxidada e reduzida do analito, respectivamente (Bard e Faulkner, 1980). O pico anódico é observado quando a varredura corre do sentido negativo para o sentido positivo de potencial, enquanto que o pico catódico é observado na varredura que vai do potencial positivo para o mais negativo (Gosser, 1993). Dependendo dos parâmetros utilizados, a voltametria cíclica pode se classificar como uma técnica mais rápida que as de redissolução e de pulso, sendo muito empregada na modificação de eletrodos de trabalho, que é realizada para melhorar o sinal analítico, a faixa de detecção, a sensibilidade, assim como, a seletividade da técnica. Quando combinada com eletrodos de pequenas dimensões, pode alcançar limites de detecção da ordem de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>.

### **1.3.2 – Eletrodos de Trabalho**

O eletrodo de trabalho a ser empregado em qualquer análise voltamétrica é escolhido de acordo com a faixa de potencial a ser aplicada em um determinado eletrólito e, também, com a qualidade e pureza do material. Podem ser citados como eletrodos sólidos, os de metais e os de carbono (C. Brett e A. Brett, 2000).

Os eletrodos metálicos, como platina, ouro e prata, em certos valores de potencial aplicado, formam ligações com o oxigênio ou hidrogênio em soluções aquosas e em algumas soluções não aquosas. Este tipo de eletrodo apresenta um baixo sinal de fundo, devido à sua alta condutividade, e pode ser facilmente polido. As desvantagens do uso de eletrodos de metais é a corrosão ou outras reações que estes materiais podem sofrer dependendo do meio em que se encontram (C. Brett e A. Brett, 2000).

Os eletrodos de carbono são encontrados na forma de carbono vítreo, fibras de carbono, pasta de carbono e grafite. Apresentam uma grande área superficial ativa, podendo sofrer envenenamento por compostos orgânicos, como também, serem utilizados para sua determinação. A configuração dos carbonos

nestes materiais é  $sp^2$ , sendo diferenciados em sua estrutura pelo comprimento e espessura de microcristalites no plano e perpendicular ao plano, respectivamente (C. Brett e A. Brett, 2000). O eletrodo de carbono vítreo é um dos eletrodos de carbono que apresenta a maior resistividade, sendo amplamente utilizado devido às suas características isotrópicas, ou seja, apresenta as mesmas propriedades físicas em todas as direções (C. Brett e A. Brett, 2000).

Na modificação de eletrodos de trabalho ocorre a formação de uma camada eletroativa que atua como mediadora na transferência de elétrons, podendo ser realizada por diferentes métodos. A espécie eletroativa pode ser imobilizada através de uma reação química, obtendo-se um eletrodo quimicamente modificado. Por outro lado, esta espécie pode ser adsorvida na superfície do eletrodo, formando um eletrodo modificado por adsorção. Assim como, pode ser realizada a aplicação de potencial no eletrodo, favorecendo o recobrimento físico do mesmo com a espécie eletroativa e resultando em um eletrodo modificado por eletroadsorção ou eletrodeposição (C. Brett e A. Brett, 2000).

O desenvolvimento e utilização de eletrodos de trabalho com dimensões pequenas têm despertado o interesse da comunidade científica. Ultramicroeletrodos, que são eletrodos com uma superfície eletroquimicamente ativa menor que 50  $\mu\text{m}$ , apresentam uma menor corrente capacitiva, uma densidade de corrente (originada pelo transporte de massa) maior, baixos limites de detecção e uma melhor razão sinal-ruído. Além disso, podem ser utilizados em voltametria com altas velocidades de varredura, em análises *in vivo* e para volumes muito pequenos (Yun *et al*, 2006).

## 1.4 – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS

Cada vez mais é exigida e reconhecida a necessidade de comprovar a qualidade de medições químicas, através de sua comparação, rastreamento e confiabilidade (Ribani *et al*, 2004). Para tanto, um novo método desenvolvido deve passar por um sistema de avaliação, também conhecido como validação. Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003), a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade (seletividade), linearidade, intervalo de concentração, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados à análise (ANVISA, 2003).

A especificidade, também conhecida como seletividade, é verificada comparando-se os resultados de análise da substância a ser determinada na presença e na ausência de possíveis interferentes. Em voltametria, a resposta eletroquímica do analito pode ser inibida ou mascarada pela ação de interferentes através de adsorção destes na superfície do eletrodo, ou por competição pelos sítios ativos do eletrodo com a espécie de interesse, assim como, através de eletrólise do interferente em potencial próximo ao do analito (Morais, 2002). Dessa forma, é importante descartar a possibilidade de interferência de alguma espécie sobre a resposta voltamétrica da substância de interesse químico, ou verificar o limite de tolerância permitido deste interferente, a fim de obter-se um resultado confiável.

A linearidade e o intervalo de concentração podem ser determinados através de curvas de calibração e de regressão linear, sendo observado o valor do coeficiente de regressão. Estes dados trazem informações à respeito da capacidade que o método tem em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, e os limites superior e inferior dentro desta faixa linear. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e um intervalo entre 80 a 120 % do valor teórico da concentração para formas farmacêuticas.

A precisão representa a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas e pode ser determinada em termos de repetibilidade através do

cálculo do desvio padrão relativo (DPR), conforme Equação 1, não sendo aceitos valores acima de 5 % (Ribani, 2004).

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{estimativa do desvio padrão}}{\text{média}} \times 100 \quad (1)$$

A sensibilidade da técnica é representada pelo limite de detecção (LD), que representa a menor quantidade de substância que pode ser detectada, sem ser necessariamente quantificada. O LD pode ser calculado em termos da razão da estimativa do desvio padrão do coeficiente linear pelo coeficiente angular obtido pela regressão linear da curva de calibração (Equação 2) (Ribani, 2004).

$$\text{LD} = \frac{S_{\text{coef. linear}}}{\text{coef. ang.}} \times 3,3 \quad (2)$$

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade do analito que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, podendo ser determinado pelos mesmos parâmetros que o LD (Equação 3) (Ribani, 2004).

$$\text{LQ} = \frac{S_{\text{coef. linear}}}{\text{coef. ang.}} \times 10 \quad (3)$$

Determinados todos estes parâmetros, pode-se verificar a exatidão do método analítico, ou seja, a proximidade dos resultados obtidos pela técnica desenvolvida com o valor verdadeiro (Equação 4) (ANVISA, 2003).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (4)$$

As formas mais comuns para avaliar a exatidão de um método são por meio da análise de amostra certificada, pela utilização de um segundo método e pelo teste de recuperação. Muitas vezes, as matrizes com que se trabalha não disponibilizam comercialmente amostras certificadas, ou são muito caras. Da mesma maneira, a utilização de um segundo método pode ser dificultada pela

falta deste equipamento, ou também pelo custo elevado para sua utilização, como reagentes, por exemplo. Desta forma, dá-se preferência ao teste de recuperação, que é realizado enriquecendo a amostra com uma quantidade conhecida de padrão, possibilitando verificar o efeito da matriz sobre a análise. Sucessivas adições de padrão podem ser realizadas, resultando em um gráfico do sinal analítico *versus* concentração, onde a extrapolação da curva até cortar o eixo negativo da concentração (eixo x) informa, em módulo, a concentração da amostra com o padrão (Figura 4). O valor obtido é, então, subtraído do resultado da amostra sem o padrão. Esta diferença deve dar o valor da concentração do padrão adicionado para o enriquecimento da amostra dentro do erro experimental (Aleixo, 2007).

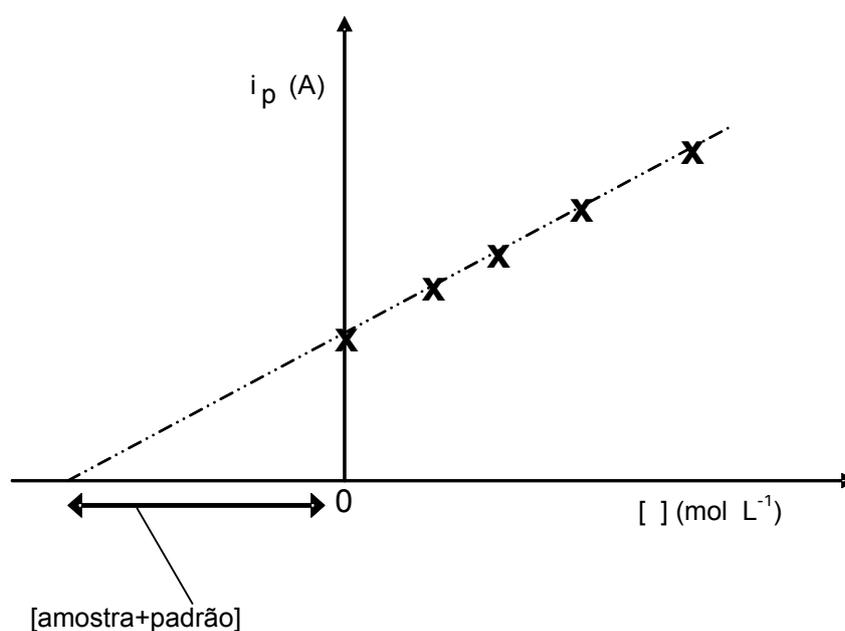


FIGURA 4. Curva analítica utilizada no teste de recuperação.

## **2 - PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 – SOLUÇÕES E REAGENTES**

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada e reagentes químicos de grau analítico. A solução padrão de piridoxina  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada cuidadosamente através da dissolução de hidrocloreto de piridoxina (Aldrich) em 100 mL de água deionizada.

As soluções dos interferentes hidrocloreto de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>), citrato de sódio, benzoato de sódio, manitol, frutose, L-lisina, ácido ascórbico (vitamina C) e cafeína foram preparadas pela dissolução de quantidade apropriada do padrão. Todas as soluções sensíveis à luz foram armazenadas em frascos de vidro escuros.

Para a preparação do eletrodo de carbono vítreo, modificado com o complexo de hexacianoferrato(II) de cromo(III), CrHCF, utilizaram-se 20 mL de uma solução de KCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,00 contendo  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (Lin, Tseng e Shih, 1998). Concentrações destes reagentes (em  $\text{mmol L}^{-1}$ ) de 18:12 e 44:22 para a relação  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} : \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  também foram utilizadas para o estudo do efeito da concentração. Uma solução de KCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,00 contendo  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , foi utilizada para a comparação dos reagentes precursores.

Como eletrólito de suporte, utilizou-se uma solução de cloreto de potássio, preparada a partir da dissolução de quantidade apropriada do sal em água deionizada. Ajustou-se o pH empregando soluções de HCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  e NaOH  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . Soluções de tampão acetato e tampão também foram utilizadas no estudo do eletrólito de suporte (Morita e Assumpção, 1981).

## **2.2 - EQUIPAMENTOS**

Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato AUTOLAB PGSTAT-30 (Ecochemie) acoplado a um microcomputador, utilizado para o registro, aquisição dos dados e controle do experimento. Utilizou-se uma cela de vidro de 20 mL, com um disco rotatório (Modelo 616, EG&G PARC) de carbono vítreo modificado como eletrodo de trabalho, um fio de platina como eletrodo auxiliar e Ag/AgCl como eletrodo de referência. O eletrodo de carbono vítreo utilizado é do tipo RDE 0008, com 4,0 mm de diâmetro sobre um cilindro de teflon. As medidas de voltametria cíclica foram realizadas após desaeração e com a solução em repouso.

## **2.3 - MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO**

Antes da modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo, o mesmo foi mecanicamente polido com uma pasta de alumina (G60/E), lavado e sonificado por 10 minutos em água deionizada.

A eletrodeposição foi realizada aplicando-se ciclos de potencial entre -0,2 e +1,0 V por 30 minutos em uma solução de KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> e pH 3,00, contendo 10 mmol L<sup>-1</sup> de CrCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O e 5 mmol L<sup>-1</sup> de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. As varreduras para eletrodeposição foram realizadas a 50 mV s<sup>-1</sup>, com agitação magnética de 400 rpm e o disco rotatório de carbono vítreo a 30 rpm. Após esta etapa, condicionou-se o eletrodo por uma hora em solução de KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> e pH 3,00.

## **2.4 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS FARMACÊUTICAS**

Amostras de cinco comprimidos das marcas e seus respectivos laboratórios Seis-B<sup>®</sup> - APSEN, Dramin<sup>®</sup> B<sub>6</sub> – ALTANA e Citoneurin<sup>®</sup> - MERCK foram pesadas individualmente, maceradas com almofariz e pistilo e

homogeneizadas. A massa média equivalente a um comprimido foi pesada e dissolvida em água deionizada.

Removeu-se o excipiente insolúvel através de filtração com membrana de éster e celulose hidrofílica e não estéril (Millipore 45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro, GSWP04700). Completou-se o volume com água deionizada em um balão volumétrico de 200 mL para o fármaco Seis-B<sup>®</sup> e em um balão de 100 mL para os demais medicamentos.

Todo o processo de preparação das amostras foi realizado protegendo-as da luz com o auxílio de papel alumínio.

## **2.5 - DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE PIRIDOXINA**

As determinações voltamétricas de piridoxina foram realizadas utilizando a técnica de voltametria cíclica, sendo o valor da corrente relacionado à vitamina, aquele obtido pela diferença da corrente observada em torno de 0,80 V na presença e na ausência de piridoxina.

Os parâmetros utilizados para determinação do analito são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Parâmetros utilizados no potenciostato para determinação de piridoxina

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições</b>
Tempo de purga	180 s
Tempo de agitação	90 s
Grau de agitação	400 rpm
Potencial de Condicionamento	-0,2 V
Tempo de Condicionamento	10 s
Tempo de Equilíbrio	20 s
Número de Varreduras	1
Potencial Inicial	-0,2 V
1° Potencial de Vértice	1,0 V
2° Potencial de Vértice	-0,2 V
Alta Estabilidade	ON
Alta Sensibilidade	ON
Faixa de Corrente	1 A a 10 Na

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modificou-se um eletrodo de carbono vítreo com hexacianoferrato(II) de cromo(III) para a determinação voltamétrica de piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) em fármacos. Para tanto, realizaram-se estudos de alguns parâmetros que afetam a modificação da superfície do eletrodo, assim como, a determinação da vitamina. Estabelecidas as melhores condições de trabalho, utilizou-se o eletrodo modificado para a determinação de PN em três diferentes fármacos, por meio da técnica de voltametria cíclica.

#### 3.1- MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO

O voltamograma do eletrodo de carbono vítreo (ECV) com e sem modificação de superfície pode ser observado na Figura 5. O complexo obtido após a eletrodeposição de CrCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O e de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] no carbono vítreo, com uma razão molar de 2:1 (Cr<sup>3+</sup>: [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>), é o hexacianoferrato(II) de cromo(III) {KCr[Fe(CN)<sub>6</sub>]} (Lin, Tseng e Shih, 1998). Observou-se uma coloração azulada do complexo depositado no ECV, concordando com informações da literatura (Windholz e Budavari, 1976).

Na Figura 5a, observa-se o voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo antes da eletrodeposição em KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> e, na Figura 5b, antes da eletrodeposição na solução dos reagentes precursores.

Pela Figura 5c, pode-se observar o voltamograma do eletrodo de carbono vítreo em KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> após a modificação de sua superfície. Os picos 1 (0,22 V) e 2 (0,88 V) correspondem aos picos de oxidação do complexo K<sub>2</sub>Cr<sup>II</sup>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>], enquanto que 3 (0,82 V) e 4 (0,19 V) indicam seus picos de redução. Desta forma, tem-se um sistema composto por estágios de valência mista, que pode ser representado por [Cr(III)-CN-Fe(II)]/[Cr(II)-CN-Fe(II)] e [Cr(III)-CN-Fe(II)]/[Cr(III)-CN-Fe(III)]. Os pequenos picos observados em 5 e 6 podem ser atribuídos à inclusão e exclusão de íons potássio durante o processo de oxidação-redução (Lin e Shih, 1999).

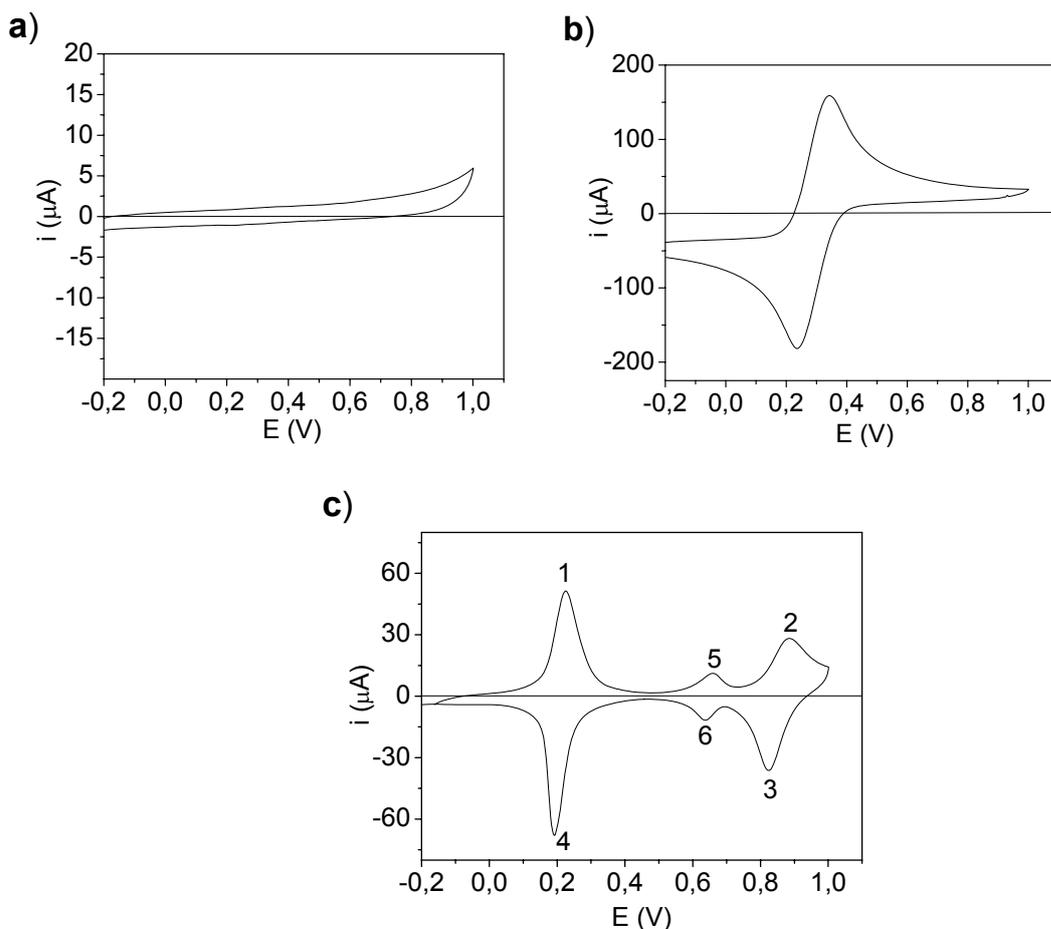
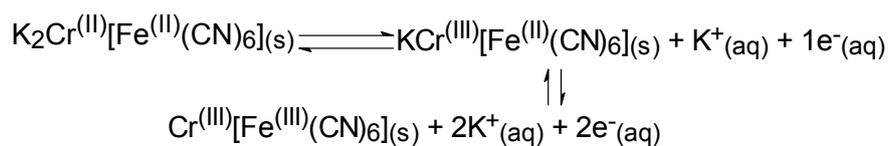


FIGURA 5. Voltamograma cíclico do ECV **a)** antes da eletrodeposição em KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>, **b)** antes da eletrodeposição na solução dos reagentes precursores e **c)** após a eletrodeposição em KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>, todos em pH 3,00 e a 50 mV s<sup>-1</sup>.

A provável reação que ocorre no eletrodo está representada no Esquema 1, onde íons potássio que atuam como contra-íons são retirados do eletrólito de suporte.



**Reação no eletrodo**

ESQUEMA 1. Mecanismo proposto para a resposta voltamétrica do eletrodo modificado.

Com a aplicação do potencial de condicionamento redutivo em  $-0,2$  V obtém-se, possivelmente, o complexo no seu estado (2,2). À medida que ocorre a varredura, do potencial mais negativo para o mais positivo, os metais vão sendo oxidados, liberando o contra-íon  $K^+_{(aq)}$  e os elétrons. Na varredura inversa, do potencial mais positivo para o mais negativo, ocorre a redução das espécies.

### 3.1.1- Escolha do reagente precursor

Preparou-se o complexo de hexacianoferrato(II) de cromo(III) por dois métodos diferentes. No primeiro, obteve-se o complexo através de uma solução contendo cloreto de cromo(III) e hexacianoferrato(III) de potássio. No segundo, utilizou-se uma solução de nitrato de cromo(III) e hexacianoferrato(III) de potássio.

Obtiveram-se os melhores resultados com o eletrodo modificado através de eletrodeposição com solução de cloreto de cromo(III) e hexacianoferrato(III) de potássio (Figura 6).

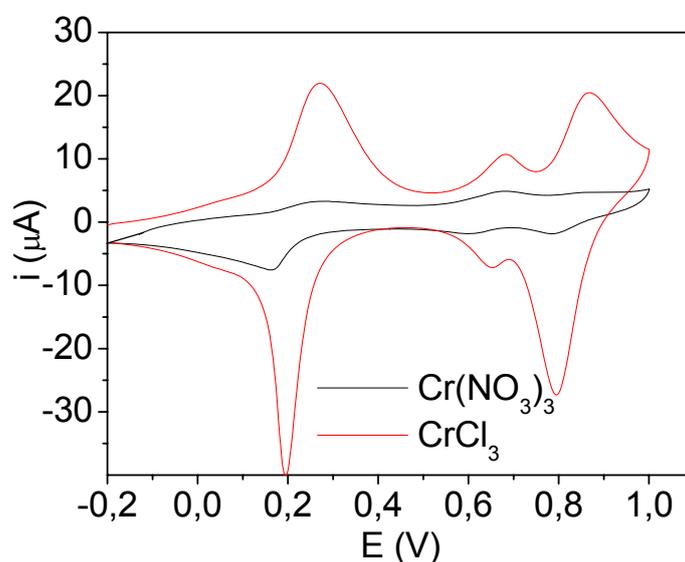


FIGURA 6. Voltamograma cíclico do ECV após eletrodeposição em diferentes precursores por uma hora em  $KCl$   $0,10 \text{ mol l}^{-1}$ ,  $pH$   $3,00$  e  $150 \text{ mV s}^{-1}$ .

O eletrodo modificado com nitrato de cromo (III) e hexacianoferrato (III) de potássio mostrou-se instável, por ter sua corrente variando de uma varredura para

outra, além de apresentar uma corrente menor que o outro precursor. Por outro lado, no eletrodo em que se utilizaram cloreto de cromo(III) e hexacianoferrato(III) de potássio como reagentes precursores, observou-se um eletrodo mais estável, sendo este utilizado para os demais estudos.

### 3.1.2 - Tempo de eletrodeposição

Verificou-se a variação na corrente dos picos de oxidação-redução do eletrodo modificado com CrHCF após cinco horas de aplicação do potencial. Pela Figura 7 é possível observar que, após 2 horas de aplicação de potencial em solução de KCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , contendo  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , ocorreu uma diminuição na corrente dos picos redox em torno de  $0,20 \text{ V}$ .

Por outro lado, os picos próximos a  $0,85 \text{ V}$  sofreram um pequeno aumento em sua corrente após 5 horas de tratamento.

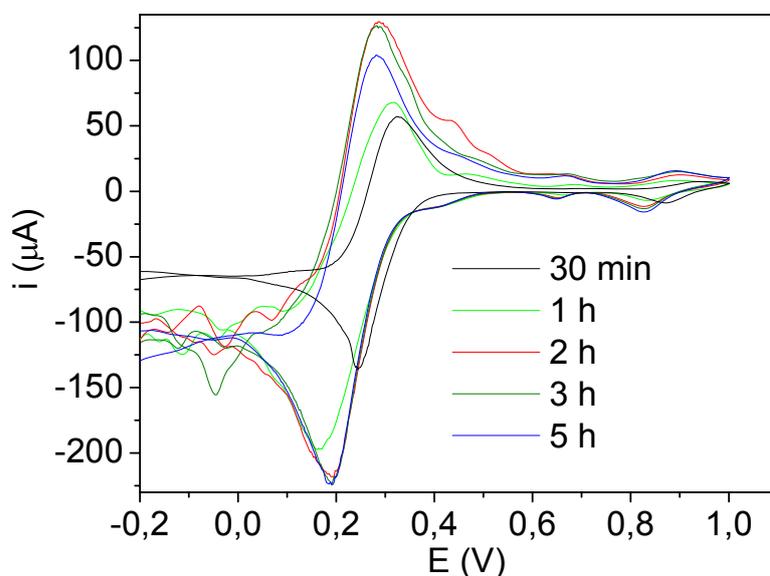


FIGURA 7. Voltamograma cíclico do ECV durante eletrodeposição de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  em KCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,00, a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , 30 rpm e sob agitação.

Tendo em vista que, quando há excesso de complexo depositado na superfície do eletrodo, ocorre diminuição na corrente de uma varredura para outra, como é apresentado na Figura 8, faz-se necessário polir mecanicamente esta superfície para estabilizá-lo. Este procedimento é dispensado se for utilizado um tempo de eletrodeposição adequado.

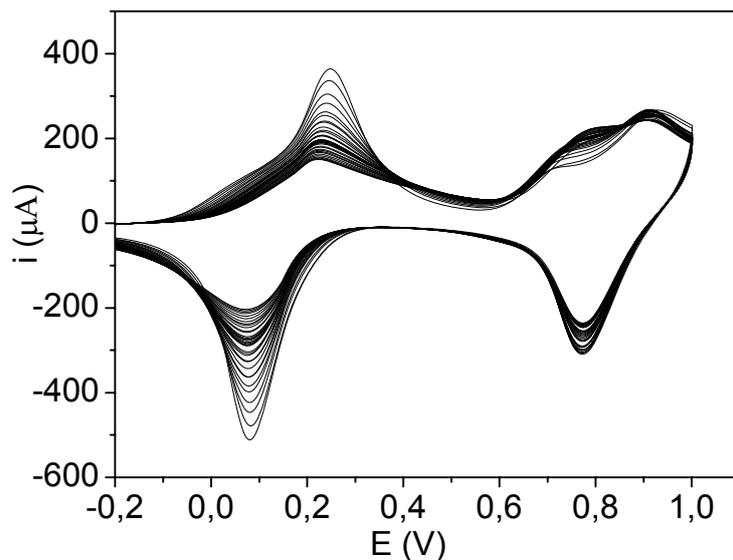


FIGURA 8. Variação na corrente do ECV a cada varredura pelo excesso de complexo depositado, em KCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,00 e a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Desta forma, verificou-se que 30 minutos de eletrodeposição são suficientes para que se obtenha um eletrodo aplicável na determinação de piridoxina, com uma corrente de aproximadamente  $10 \text{ } \mu\text{A}$  para o pico anódico próximo a  $0,88 \text{ V}$ . Tempos inferiores resultam em uma corrente muito pequena para aplicação do eletrodo na determinação da vitamina, sendo necessário aumentar a concentração dos reagentes precursores, o que se torna inviável.

Pela Figura 7, também, pode-se observar que os picos em, aproximadamente,  $0,20 \text{ V}$  apresentaram valores de corrente consideravelmente maiores que os demais. Isto ocorreu porque o voltamograma foi varrido em solução eletrolítica com agitação, durante a eletrodeposição, como é observado pela Figura 9. Esta agitação do meio gera a corrente de convecção, que pode ser eliminada ao manter a solução em repouso.

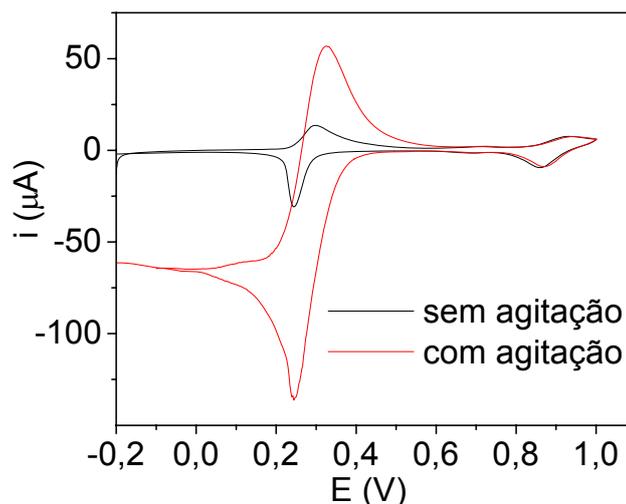


FIGURA 9. Voltamograma cíclico do ECV após 30 minutos de complexação em KCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 3,00 com  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 3.1.3 - Concentração dos reagentes precursores

Verificou-se o efeito de três diferentes concentrações dos reagentes precursores do complexo CrHCF, para 30 minutos de eletrodeposição.

Inicialmente, testou-se uma solução de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Em seguida, utilizou-se uma solução de  $18 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , e outra de  $44 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $22 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . No primeiro e no último teste, a razão molar de  $\text{Cr}^{3+}$ :  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , nos precursores, foi de 2:1, enquanto que, no segundo teste a mesma foi de 3:2, diminuindo a quantidade de  $\text{Cr}^{3+}$  utilizada com relação ao íon  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ .

Observou-se um aumento significativo na resposta voltamétrica do eletrodo com a concentração dos reagentes precursores (Figura 10). Também foi possível observar que, mantendo a razão molar destes de 2:1, o perfil voltamétrico permaneceu inalterado (Figura 10a e 10c). No entanto, ao utilizar uma razão molar de 3:2 (Figura 10b), o perfil voltamétrico do eletrodo sofreu alteração.

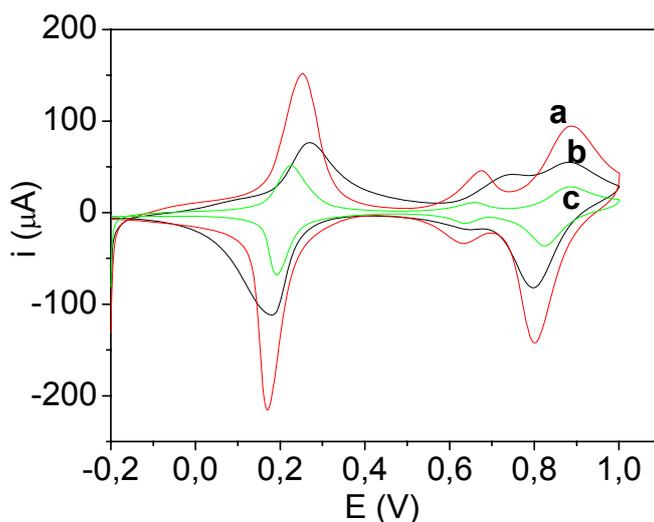


FIGURA 10. Variação do perfil voltamétrico do eletrodo modificado com concentrações de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  de **a)** 10 e 5  $\text{mmol L}^{-1}$  **b)** 18 e 12  $\text{mmol L}^{-1}$  e **c)** 44 e 22  $\text{mmol L}^{-1}$ , respectivamente, em  $\text{KCl}$  0,10  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 3,00 e  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Para a utilização de concentrações menores dos reagentes precursores, tornou-se necessário o uso de um tempo maior para a etapa de eletrodeposição.

Dessa forma, optou-se em utilizar a concentração dos reagentes precursores na proporção 10:5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , respectivamente, mantendo a razão molar de 2:1 ( $\text{Cr}^{3+}$ :  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ) no decorrer do trabalho, uma vez que esta concentração é suficiente para que se obtenha um eletrodo aplicável na determinação de piridoxina.

Definido o tempo de eletrodeposição, o reagente precursor e a sua concentração, observou-se a importância do tempo de condicionamento. A utilização do eletrodo logo após a etapa de eletrodeposição, sem mantê-lo sob condicionamento em solução de  $\text{KCl}$  0,10  $\text{mol L}^{-1}$  e pH 3,00, diminuiu o tempo de vida útil do eletrodo modificado, ou seja, menos medidas foram realizadas entre uma eletrodeposição e outra. O condicionamento do eletrodo por uma hora permitiu a realização de um maior número de medidas.

### 3.2 - ELETRÓLITO DE SUPORTE

Observou-se o comportamento eletroquímico da piridoxina em KCl, em solução tampão de  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$  e em solução tampão de  $\text{CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ , em pH 5,00 e com  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de concentração do sal. Obteve-se a melhor resposta voltamétrica para a adição de  $3,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de piridoxina em KCl, como é apresentado na Tabela 2, a qual traz a variação média da corrente, para um total de três repetições, com as respectivas estimativas dos desvios padrão relativos.

TABELA 2. Escolha do eletrólito de suporte ( $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 5,00) para determinação de  $3,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de piridoxina a  $50 \text{ mV s}^{-1}$

Eletrólito	$\Delta i$ ( $\mu\text{A}$ )	$s_r^{(a)}$ (%)
KCl	0,21	5,3
$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$	0,15	6,7
$\text{CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$	0,13	7,7

<sup>(a)</sup> Estimativa do desvio padrão relativo com  $n=3$ .

O comportamento eletroquímico de filmes de hexacianoferrato de cromo depende da solução do eletrólito de suporte, como pode ser observado pela Figura 11. É possível verificar que, o perfil voltamétrico é alterado quando se utilizam diferentes soluções eletrolíticas. Isto ocorre, possivelmente, porque a função do eletrólito de suporte de diminuir a resistência na cela muda conforme o eletrólito utilizado.

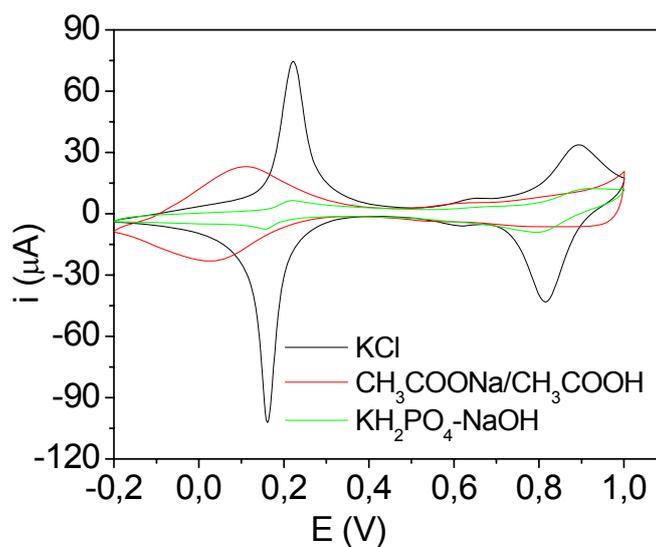


FIGURA 11. Voltamograma do eletrodo modificado com CrHCF em diferentes eletrólitos a  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,00 e  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Vários estudos confirmam a eficácia do uso de íons potássio como suporte em reações redox de filmes de hexacianoferratos (Lin, Tseng e Shih, 1998; García *et al*, 2005). Isto ocorre porque o processo eletroquímico de oxidação-redução é acompanhado por um fluxo de cátions fornecidos pela solução do eletrólito de suporte, o qual ajuda a manter a eletroneutralidade do sistema. O uso de outros sais, no lugar de cloreto de potássio, resulta em ondas voltamétricas menos definidas porque o transporte através do filme é dificultado. O efeito do ânion pode resultar do seu tamanho, sendo que o íon cloreto apresenta um tamanho mais compatível com o contra-íon potássio (Lin, Tseng e Shih, 1999).

Assim, por apresentar uma maior resposta à piridoxina, com uma estimativa do desvio padrão relativo menor, e um melhor perfil voltamétrico, os estudos foram realizados utilizando-se como eletrólito de suporte, uma solução de KCl.

### 3.3 - FORÇA IÔNICA DO MEIO

Verificou-se a influência da força iônica, em termos da concentração do eletrólito de suporte, para determinação voltamétrica de piridoxina com o eletrodo modificado com CrHCF. Pela Tabela 3 e pela Figura 12, apresenta-se a relação da força iônica do meio com a resposta voltamétrica na determinação de vitamina B<sub>6</sub>, considerando a variação da corrente após a adição de PN.

TABELA 3. Estudo da força iônica para determinação de  $3,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de piridoxina, a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e pH 5,00.

Força iônica ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$\Delta i$ ( $\mu\text{A}$ )	$s_r^{(a)}$ (%)
0,025	0,18	5,6
0,050	0,22	2,6
0,10	0,21	2,7
0,15	0,18	5,6
0,20	0,16	6,3

<sup>(a)</sup> Estimativa do desvio padrão relativo com  $n=3$ .

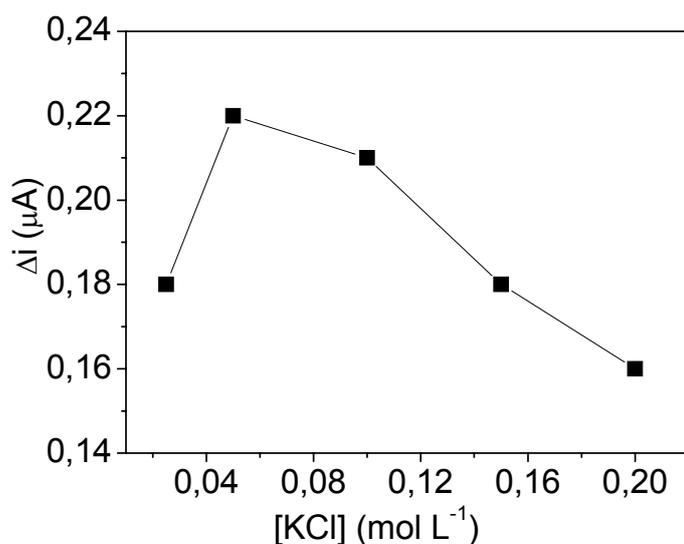


FIGURA 12. Variação da corrente com a força iônica no eletrodo modificado com CrHCF, após adição de  $3,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de piridoxina, em KCl, pH 5,00 e a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Como se pode observar, o eletrólito de suporte com concentrações de  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl apresentou as melhores respostas voltamétricas para determinação de piridoxina, com menor estimativa do desvio padrão relativo. Desta forma, optou-se por utilizar KCl  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  no decorrer do trabalho.

Como a concentração do eletrólito de suporte deve ser pelo menos 100 vezes maior que a concentração da espécie eletroativa (Bard e Faulkner, 1980), para que a corrente de migração se torne negligenciável, concentrações menores não foram estudadas.

### 3.4 – ESTUDO DA VELOCIDADE DE VARREDURA

O estudo do efeito da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do eletrodo modificado com CrHCF (Figura 13) indicou um aumento proporcional na corrente do pico anódico em  $0,88 \text{ V}$  com a raiz quadrada da velocidade, indicando que o processo é controlado por difusão (Bard e Faulkner, 1980).

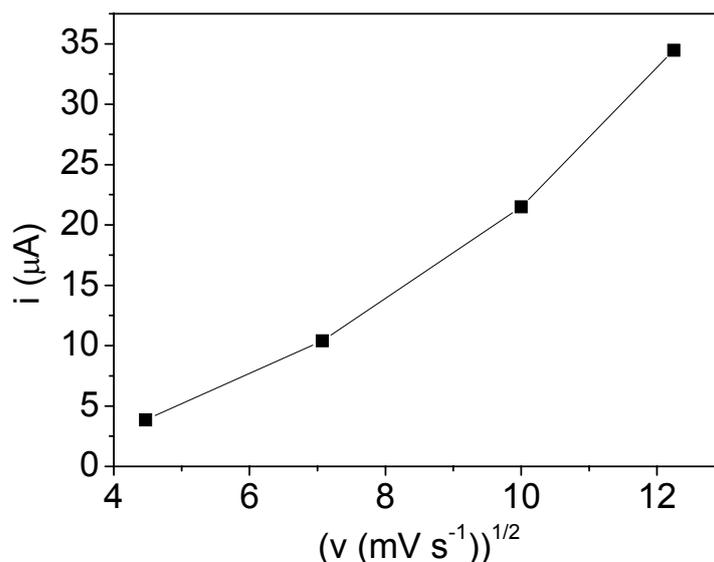


FIGURA 13. Variação da corrente em  $0,88 \text{ V}$  com a raiz quadrada da velocidade de varredura no eletrodo modificado com CrHCF em KCl  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 5,00.

O potencial do pico em 0,88 V permaneceu praticamente inalterado com a variação da velocidade de varredura de 150 para 20  $\text{mV s}^{-1}$  (Figura 14), o que indica um processo de oxidação-redução reversível (Bard e Faulkner, 1980).

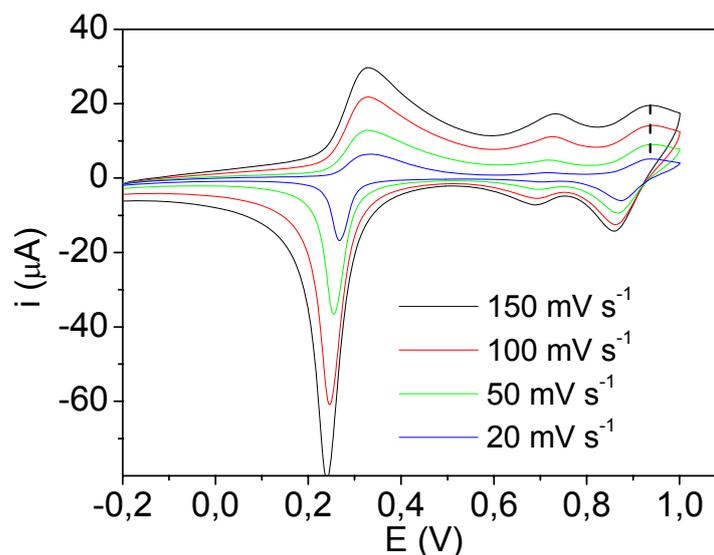


FIGURA 14. Voltamograma do eletrodo modificado com CrHCF em diferentes velocidades de varredura, em KCl  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 5,00.

A resposta voltamétrica do eletrodo modificado com CrHCF (Tabela 4 e Figura 15) após a adição de  $3,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de piridoxina também foi avaliada.

TABELA 4. Estudo da velocidade de varredura para determinação de  $3,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de PN em KCl  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 5,00

Velocidade ( $\text{mV s}^{-1}$ )	$\Delta i$ ( $\mu\text{A}$ )	$s_r^{(a)}$ (%)
150	0,42	3,7
100	0,17	5,9
50	0,15	2,6
20	0,10	6,0

<sup>(a)</sup> Estimativa do desvio padrão relativo com  $n=3$ .

Desta forma, para a determinação da vitamina B<sub>6</sub>, observou-se uma melhor resposta voltamétrica com a velocidade de 150 mV s<sup>-1</sup>, sendo esta a velocidade utilizada nos demais estudos.

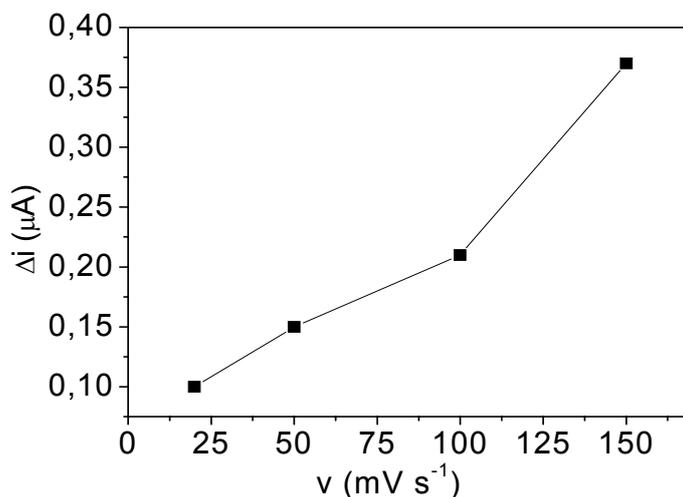


FIGURA 15. Variação da corrente com a adição de  $3,65 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de PN em diferentes velocidades de varredura utilizando o eletrodo modificado com CrHCF em KCl 0,050 mol L<sup>-1</sup> e pH 5,00.

O eletrodo de trabalho utilizado apresenta uma superfície eletroquimicamente ativa menor que 50 μm, o que o classifica como um ultramicroeletrodo, que são eletrodos que podem ser utilizados a altas velocidades de varreduras (Yun *et al*, 2006). Por outro lado, velocidades maiores não foram utilizadas, pois apresentaram perfil voltamétrico muito distorcidos.

### 3.5 - EFEITO DO pH

Avaliou-se o comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com CrHCF para uma faixa de pH entre 3,00 e 7,00, em uma solução contendo  $3,65 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de piridoxina.

Pela Tabela 5 e pela Figura 16, apresenta-se o efeito do pH sobre a resposta voltamétrica durante a determinação da vitamina.

TABELA 5. Estudo do pH para determinação de  $3,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de piridoxina em KCl  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  e a  $150 \text{ mV s}^{-1}$

pH	$\Delta i$ ( $\mu\text{A}$ )	$s_r^{(a)}$ (%)
3,00	-0,02	10,3
4,00	0,03	9,7
4,50	0,15	7,7
5,00	0,25	6,1
5,50	0,57	4,6
6,00	0,23	7,0
6,50	0,23	8,3
7,00	0,08	14,1

<sup>(a)</sup> Estimativa do desvio padrão relativo com  $n=3$ .

Pode-se observar que o melhor pH para determinação de piridoxina com o eletrodo modificado com CrHCF, que apresenta um menor desvio padrão relativo, é o pH 5,50.

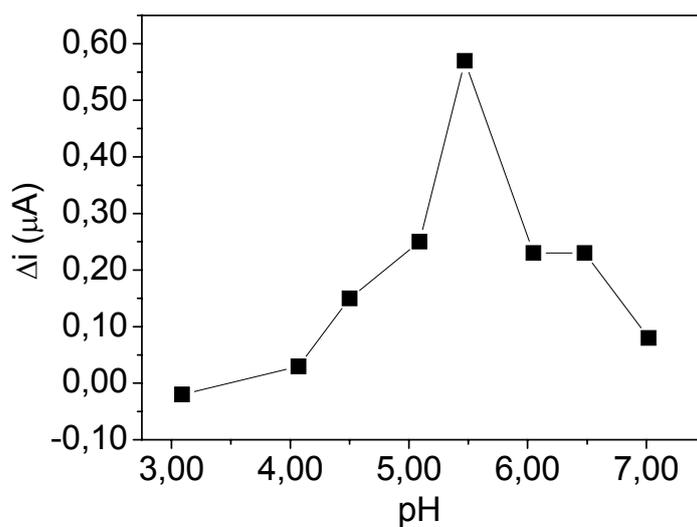
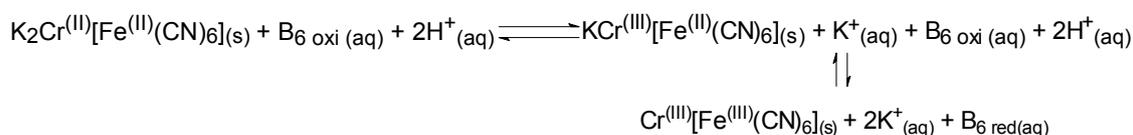


FIGURA 16. Resposta voltamétrica com a variação do pH no eletrodo modificado com CrHCF, após adição de  $3,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de piridoxina, em KCl  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  e a  $150 \text{ mV s}^{-1}$ .

O decréscimo da variação na corrente em pH menor que 5,00 pode ocorrer devido a ação de íons  $H^+$  na cinética da reação entre a piridoxina e o complexo CrHCF na superfície do eletrodo (Esquema 2).

Além disso, também pode haver protonação do nitrogênio piridínico em pH menor que 3,00. Por outro lado, em pHs mais básicos pode ocorrer a degradação da vitamina (Windholz *et al*, 1976), assim como, a conversão do hexacianoferrato de cromo para um cromo em gel (Lin, Tseng e Shih, 1998).



ESQUEMA 2. Mecanismo proposto para a resposta voltamétrica do eletrodo modificado na presença de piridoxina ( $B_6$ ).

Pelo Esquema 2, sugere-se a ação catalítica da piridoxina no sistema redox do complexo depositado na superfície do eletrodo. Pela Figura 17, observa-se a variação da corrente com a adição de PN em aproximadamente 0,80 V. Os demais pontos do voltamograma não obedecem a uma seqüência lógica após cada varredura, pois mesmo na ausência da vitamina apresentam variações.

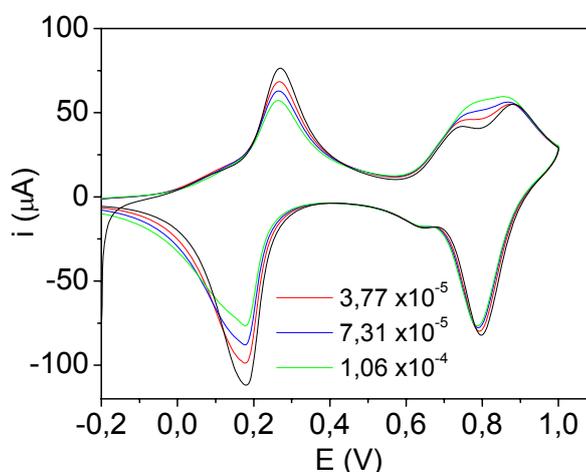


FIGURA 17. Voltamograma do eletrodo modificado com CrHCF para adições sucessivas de piridoxina ( $mol L^{-1}$ ) em KCl 0,050  $mol L^{-1}$ , pH 5,50 e a 150  $mV s^{-1}$ .

### 3.6 - CURVA ANALÍTICA

Nas melhores condições definidas para determinação voltamétrica de piridoxina com o eletrodo de carbono vítreo modificado com CrHCF (Tabela 6), obteve-se uma faixa linear na curva de calibração para concentrações da vitamina compreendidas entre  $1,33 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $13,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 18).

TABELA 6. Melhores condições para determinação voltamétrica de piridoxina no eletrodo modificado

Parâmetro	Condição
Reagentes Precusores (RP)	$\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
Tempo de Eletrodeposição	30 min
Proporção dos RP	10:5 $\text{mmol L}^{-1}$
Eletrólito de suporte	KCl
Força Iônica	0,050 $\text{mol L}^{-1}$
Velocidade de Varredura	150 $\text{mV s}^{-1}$
pH	5,50

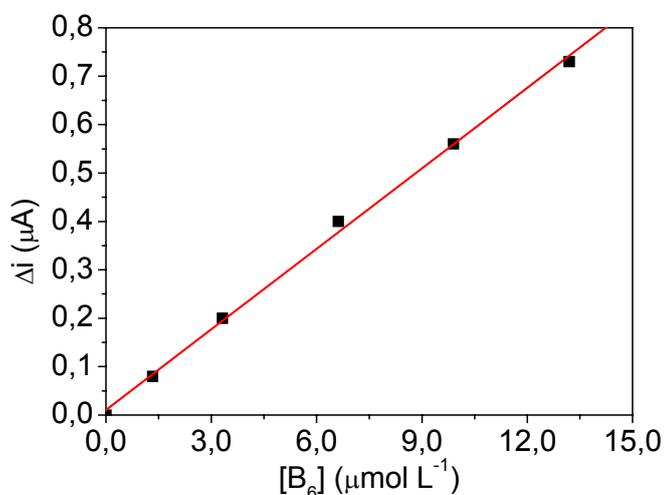


FIGURA 18. Curva analítica para determinação de piridoxina no intervalo de concentração linear, em KCl 0,050  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 5,50 e 150  $\text{mV s}^{-1}$ .

Realizaram-se 4 determinações para cada ponto da curva, sempre nas mesmas condições estabelecidas, totalizando em cinco pontos que resultaram na seguinte equação de regressão linear:

$$\Delta i_{pa} (\mu A) = 0,01091 + 0,05541 \times [\text{piridoxina}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (5)$$

$$(r = 0,9990; n = 5)$$

Para valores acima  $13,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  e abaixo de  $1,33 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PN, observou-se que a curva obtida para a variação da corrente versus a concentração de piridoxina descreveu uma trajetória não linear.

A confirmação da linearidade pode ser observada pela Figura 19, que traz um gráfico da razão entre o sinal analítico e sua respectiva concentração *versus* concentração correspondente em escala logarítmica (Huber, 1998). A média dos pontos obtidos no gráfico para o eixo y corresponde a 100 % de linearidade, sendo admitidos valores entre 95 e 105 %. Como pode-se verificar pelas linhas horizontais, o intervalo de concentração obtido apresentou uma trajetória linear. Os demais pontos estudados não foram apresentados na Figura.

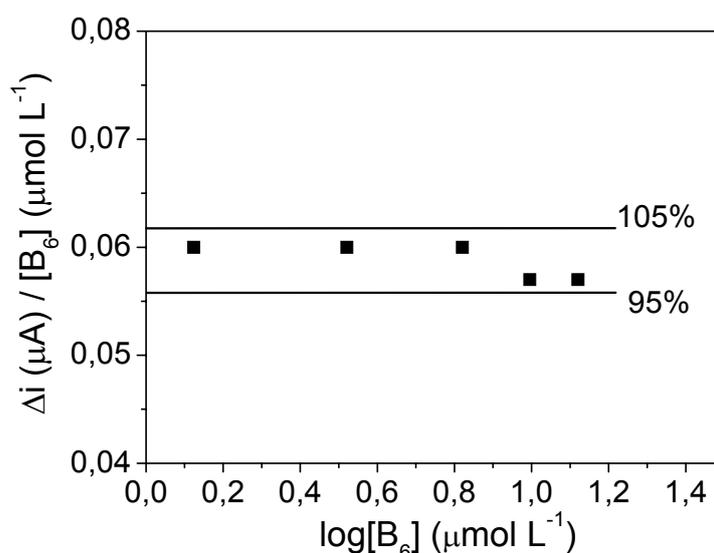


FIGURA 19. Curva de linearidade através da razão sinal/concentração *versus* concentração em escala logarítmica.

Obtiveram-se os limites de detecção e de quantificação utilizando a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear de quatro curvas de calibração, além da média do coeficiente angular, apresentados na Tabela 7 e calculados pelas Equações 2 e 3, respectivamente.

TABELA 7. Parâmetros médios obtidos a partir de quatro curvas de calibração

Variável	Valor
LD*	$3,46 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$
LQ*	$1,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Coef. Linear	0,01305
Coef. Ang.	0,05702
$S_{\text{coef. linear}}^*$	$5,985 \times 10^{-3}$

\* LD e LQ representam os limites de detecção e quantificação, respectivamente;  $S_{\text{coef. linear}}$  representa a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear.

Pode-se observar que o eletrodo de carbono vítreo modificado com CrHCF apresentou bons resultados para os limites de detecção e de quantificação, apresentando valores dentro e melhores dos observados na literatura na determinação de PN.

A repetibilidade do sinal analítico para a concentração de  $3,65 \mu\text{mol L}^{-1}$  de piridoxina na cela eletroquímica, efetuando-se 9 determinações sucessivas, também foi analisada. A resposta média da variação da corrente após a adição de PN foi de  $(0,24 \pm 0,01) \mu\text{A}$ , com estimativa do desvio padrão relativo de 4,2%, indicando que o ECV modificado com CrHCF apresenta boa repetibilidade e um baixo desvio entre uma determinação e outra.

Além disso, ao ser comparado com um eletrodo de carbono vítreo sem modificação de superfície, observou-se que o sinal voltamétrico do eletrodo modificado com CrHCF é 29,2 % maior para a determinação de  $3,65 \mu\text{mol L}^{-1}$  da vitamina.

Outra característica do ECV modificado com CrHCF é a capacidade de realizar em torno de 75 medidas voltamétricas entre uma complexação e outra. No entanto, após ficar em repouso por 53 dias apresentou um decréscimo de 42 % na resposta voltamétrica para a determinação de PN. Mesmo assim, este valor apresenta-se melhor que o encontrado na literatura, que aponta um tempo de meia vida de apenas 14 dias para um eletrodo de carbono vítreo modificado com CrHCF (Lin, Tseng e Shih, 1998).

### 3.7- ESTUDO DE INTERFERENTES

Avaliou-se o efeito de várias espécies, tais como hidrocloreto de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>), citrato de sódio, benzoato de sódio, manitol, frutose, L-lisina, ácido ascórbico (vitamina C) e cafeína, sobre a resposta voltamétrica na determinação de piridoxina (Tabela 8). Realizou-se o estudo em triplicata pela comparação da resposta voltamétrica de PN na ausência e na presença dos possíveis interferentes.

TABELA 8. Interferência de compostos na determinação de  $3,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de PN

<b>Espécie interferente</b>	<b>Nível de Tolerância (<math>\text{mol L}^{-1}</math>)<sup>a</sup></b>
Vitamina C	$1,01 \times 10^{-6}$
Cafeína	$1,78 \times 10^{-6}$
Citrato de sódio, Benzoato de sódio, Vitamina B <sub>2</sub>	$3,65 \times 10^{-6}$
Manitol	$7,37 \times 10^{-6}$
Vitamina B <sub>12</sub> , L-lisina, Vitamina B <sub>1</sub>	$3,65 \times 10^{-5}$
Frutose	$1,83 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup> Com erro de 5 %.

Verificou-se que o eletrodo de carbono vítreo modificado com CrHCF para a determinação  $3,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de PN tolera a presença de uma igual concentração de citrato de sódio, benzoato de sódio e vitamina B<sub>2</sub>, uma concentração 2 vezes maior de manitol, 10 vezes maior de vitamina B<sub>12</sub>, L-lisina e vitamina B<sub>1</sub> e uma concentração até 50 vezes maior de frutose sem influenciar a resposta da corrente (para um erro de 5 %). Apenas a vitamina C e a cafeína apresentaram interferência em concentrações menores que PN. Isto indica que o método voltamétrico desenvolvido tem uma boa seletividade para a piridoxina, podendo ser empregado quando a concentração dos interferentes está abaixo do limite de tolerância.

### **3.8- DETERMINAÇÃO DE PIRIDOXINA EM FÁRMACOS**

Utilizou-se o eletrodo de carbono vítreo modificado com CrHCF para a determinação voltamétrica de piridoxina em três diferentes formulações farmacêuticas: Seis-B<sup>®</sup> - APSEN, Dramin<sup>®</sup> B<sub>6</sub> – ALTANA e Citoneurin<sup>®</sup> - MERCK.

O Dramin<sup>®</sup> B<sub>6</sub>, indica em sua formulação 10 mg de piridoxina por comprimido e também manitol como excipiente, sugerindo estar em uma concentração inferior que a da PN, não causando assim interferência. As demais espécies interferentes analisadas não são citadas na bula.

O fármaco Citoneurin<sup>®</sup> indica a presença de 200 mg de vitamina B<sub>6</sub> por comprimido, 100 mg de B<sub>1</sub> e 50 µg de B<sub>12</sub>. Considerando que as vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>12</sub> provocam interferência no sinal analítico da PN somente quando se encontram em concentrações 10 vezes maior que a piridoxina, é possível determinar a quantidade de PN neste medicamento pelo método desenvolvido.

O fármaco Seis-B<sup>®</sup> não informa a presença de outras substâncias em sua composição, além dos excipientes e de 300 mg de PN por comprimido.

Determinou-se a concentração de PN nos fármacos através do método de adição de padrão, pela equação de regressão linear, e confirmada com o ensaio de recuperação, pela adição de quantidades conhecidas de padrão de piridoxina na solução analítica das amostras. Os valores médios das triplicatas foram utilizados para a construção dos gráficos.

Pela Figura 20, apresenta-se a adição de padrão e o ensaio de recuperação realizados para a determinação de piridoxina no fármaco Seis-B<sup>®</sup>.

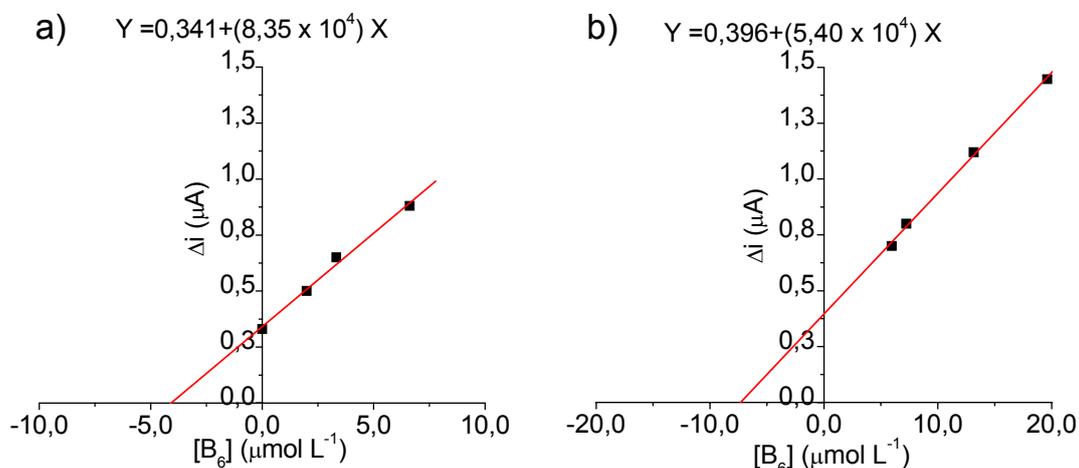


FIGURA 20. a) Adição de padrão e b) ensaio de recuperação para determinação de PN em Seis-B<sup>®</sup>.

A curva de adição de padrão indicou que a concentração de PN na solução da amostra de Seis-B<sup>®</sup> presente na cela eletroquímica é de  $4,08 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Considerando as diluições realizadas, chegou-se a um valor de 299,4 mg de PN para cada comprimido.

Pela equação da curva de regressão linear no estudo de recuperação, verificou-se que a concentração da amostra com  $3,32 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de padrão é de  $7,32 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Considerando a diluição da concentração da amostra devido a 50  $\mu\text{L}$  do padrão adicionado na cela, subtraiu-se o valor obtido para a concentração da amostra com o padrão pelo valor diluído da amostra ( $4,07 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), chegando-se à concentração recuperada do padrão de  $3,25 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , que corresponde à 97,9 % da quantidade originalmente adicionada, calculada pela Equação 4.

Pela Figura 21, apresenta-se a adição de padrão e o ensaio de recuperação para a determinação de piridoxina no fármaco Dramin<sup>®</sup> B<sub>6</sub>.

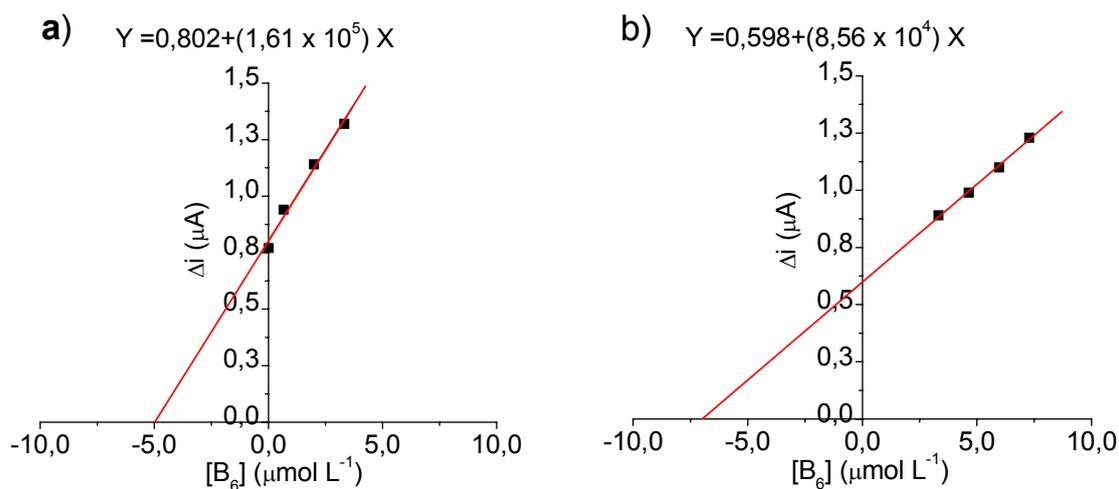


FIGURA 21. a) Adição de padrão e b) ensaio de recuperação para determinação de PN em Dramin<sup>®</sup> B<sub>6</sub>.

A curva de adição de padrão indicou que a concentração de PN na solução da amostra de Dramin<sup>®</sup> B<sub>6</sub> presente na cela eletroquímica é de  $4,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Considerando as diluições realizadas, chegou-se a um valor de 10,3 mg de PN para cada comprimido.

Pela equação da curva de regressão linear no estudo de recuperação, verificou-se que a concentração da amostra com  $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de padrão é de  $6,99 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Considerando a diluição da concentração da amostra devido a 30  $\mu\text{L}$  do padrão adicionado na cela, subtraiu-se o valor obtido para a concentração da amostra com o padrão pelo valor diluído da amostra ( $4,97 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), chegando-se à concentração recuperada do padrão de  $2,02 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , que corresponde à 101,1 % da quantidade originalmente adicionada, calculada pela Equação 4.

Realizou-se o mesmo procedimento para o fármaco Citoneurin<sup>®</sup>, onde, na Figura 22, apresenta-se a adição de padrão e o ensaio de recuperação para a determinação de piridoxina no fármaco.

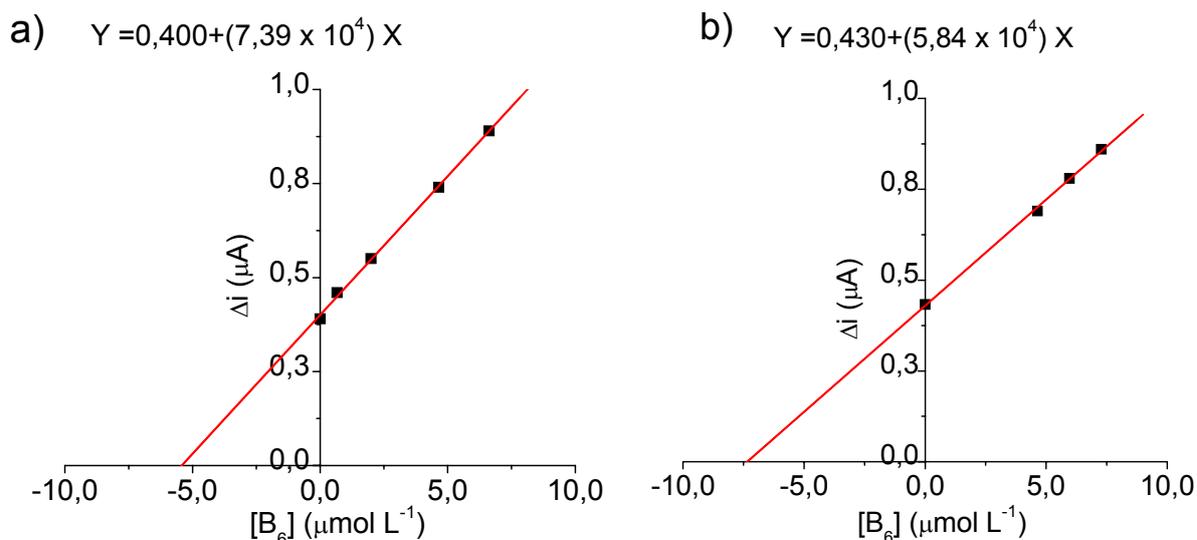


FIGURA 22. a) Adição de padrão e b) ensaio de recuperação para determinação de PN em Citoneurin<sup>®</sup>.

A curva de adição de padrão indicou que a concentração de PN na solução da amostra de Citoneurin<sup>®</sup> presente na cela eletroquímica é de  $5,42 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Considerando as diluições realizadas, chegou-se a um valor de 198,7 mg de PN para cada drágea.

Pela equação da curva de regressão linear no estudo de recuperação, verificou-se que a concentração da amostra com  $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de padrão é de  $7,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Considerando a diluição da concentração da amostra devido a  $30 \mu\text{L}$  do padrão adicionado na cela, subtraiu-se o valor obtido para a concentração da amostra com o padrão pelo valor diluído da amostra ( $5,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), chegando-se à concentração recuperada do padrão de  $1,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , que corresponde à 97,4 % da quantidade originalmente adicionada, calculada pela Equação 4.

Na Tabela 9, apresenta-se um resumo dos valores declarados de PN em cada fármaco, juntamente com os valores encontrados pelo teste de adição de padrão e a recuperação obtida.

TABELA 9. Determinação de piridoxina em fármacos pelo método voltamétrico proposto

<b>Amostra</b>	<b>Valor declarado de PN* (mg/comprimido)</b>	<b>Valor encontrado de PN* (mg/comprimido)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
Seis-B <sup>®</sup>	300	299,4	97,9
Dramin <sup>®</sup> B <sub>6</sub>	10	10,3	101,1
Citoneurin <sup>®</sup>	200	198,7	97,4

\* PN = piridoxina

As recuperações indicaram uma boa exatidão do método proposto. Além disso, os resultados experimentais demonstraram que o eletrodo de carbono vítreo modificado com CrHCF não sofreu interferência considerável dos excipientes presentes nos fármacos, apresentando um grande potencial para análise de piridoxina em amostras reais.

## 4 - CONCLUSÕES

A modificação de um eletrodo de carbono vítreo com hexacianoferrato(II) de cromo(III) possibilitou sua utilização para determinação voltamétrica de piridoxina em fármacos.

Os medicamentos analisados apresentaram valores de piridoxina muito próximos aos valores declarados na rotulagem, não sofrendo alteração significativa pelo efeito da matriz e apresentando recuperações entre 97,4 e 101,1 %.

A faixa linear de concentração encontrada ficou entre  $1,33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,32 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  da vitamina, com  $r = 0,9990$  e desvio padrão relativo de 4,2%. Os limites de detecção e de quantificação obtidos foram de  $3,46 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de PN, respectivamente. Estes resultados foram alcançados utilizando KCl  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,50 como eletrólito de suporte, velocidade de varredura de  $150 \text{ mV s}^{-1}$  e demais condições de modificação do eletrodo estabelecidas.

O método desenvolvido apresentou resultados melhores que outros métodos encontrados na literatura e o sinal voltamétrico na presença de PN foi 29,2 % maior que o sinal apresentado pelo eletrodo de carbono vítreo sem modificação de superfície. Além disso, das espécies interferentes analisadas, apenas a vitamina C e a cafeína apresentaram interferência em concentrações menores que a concentração de PN.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., Marine-Font, A. "Determination of Water-Soluble Vitamins in Infant Milk by High-Performance Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography, A*, 1997, v. 778, p. 247-253.

Aleixo, L. M. "Voltametria: Conceitos e Técnicas", disponível em <http://www.chemkeys.com> acessado em janeiro de 2007.

Aniceto, C., Fatibello-Filho, O. "Determinação Espectrofotométrica por Injeção em Fluxo de Vitamina B<sub>6</sub> (Piridoxina) em Formulações Farmacêuticas", *Química Nova*, 1999, v. 22-6, p. 805-809.

AOAC, "Official Methods of Analysis", Willians S., 14 ed. Arlington, 1984.

Apsen Farmacêutica S/A, Bula do Medicamento Seis-B® 300 mg, lote 510028.

Augustin, J. "Vitamin Analysis, in: Introduction to the Chemical Analysis of Foods", Jones and Bartlett Publication, Boston, 1994.

Bard, A. J., Faulkner, L. R. "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications", John Wiley & Sons, New York, 1980, v. 219.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. "Bioquímica", 5 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, p. 228-229, 664.

Bisp, M. R., Bor, M. V., Heinsvig, M. V., Kall, M. A., Nexø, E. "Determination of Vitamin B<sub>6</sub> Vitamers and Pyridoxic Acid in Plasma: Development and Evaluation of a High-Performance Liquid Chromatographic Assay", *Analytical Biochemistry*, 2002, v. 305, p. 82-89.

Brett, C. M. A., Brett, A. M. O. "Electrochemistry", Oxford Science Publications, New York, 2000.

Canada, M. J. A., Reguera, M. I. P., Díaz, A. M. "Selective determination of pyridoxine in the presence of hydrosoluble vitamins using a continuous-flow solid phase sensing device with UV detection", *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, v. 202, p. 113-120.

Esteve, M. J., Farré, R., Frígola, A., García-Cantabella, J. M. "Determination of Vitamin B<sub>6</sub> (Pyridoxamine, Pyridoxal and Pyridoxine) in Pork Meat and Pork Meat Products by Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography, A*, 1998, v. 795, p. 383-387.

García, T., Casero, E., Lorenzo, E., Pariente, F. "Electrochemical Sensor for Sulfite Determination Based on Iron Hexacyanoferrate Film Modified Electrodes", *Sensors and Actuators B*, 2005, v. 106, p. 803-809.

Gatti, R., Gioia, M. G., Cavrini, V. "Determination of Cinchona Alkaloids and Vitamin B<sub>6</sub> by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection", *Analytica Chimica Acta*, 2004, v. 512, p. 85-91.

Gosser Jr., D. K. "Cyclic Voltammetry", VHC, New York, 1993.

Hernández, S. R., Ribero, G. G., Goicoechea, H. C. "Enhanced Application of Square Wave Voltammetry with Glassy Carbon Electrode Coupled to Multivariate Calibration Tools for the Determination of B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> Vitamins in Pharmaceutical Preparations", *Talanta*, 2003, v. 61, p. 743-753.

Huber, L. "Validation of Analytical Methods", *LC/GC International*, 1998, v. 11, p. 96-105.

Instituto Adolfo Lutz, "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz – Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos", 3 ed. São Paulo, 1985, v. 1.

Kall, M. A. "Determination of Total Vitamin B<sub>6</sub> in Foods by Isocratic HPLC: A Comparison with Microbiological Analysis", *Food Chemistry*, 2003, v. 82, p. 315-327.

Korolkovas, A., Burckhalter, J. H. "Química Farmacêutica", 1 ed. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1982.

Lin, M. S., Shih, W. C. "Chromium Hexacyanoferrate Based Glucose Biosensor", *Analytica Chimica Acta*, 1999, v. 381, p. 183-189.

Lin, M. S., Tseng, T. F., Shih, W. C. "Chromium(III) Hexacyanoferrate(II)-Based Chemical Sensor for the Cathodic Determination of Hydrogen Peroxide", *Analyst*, 1998, v. 123, p. 159-163.

Marszall, M. L., Lebiezinska, A., Czarnowski, W., Szefer, P. "High-Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Thiamine Hydrochloride, Pyridoxine Hydrochloride and Cyanocobalamin in Pharmaceutical Formulations using Coulometric Electrochemical and Ultraviolet Detection" *Journal of Chromatography, A*, 2005, v. 1094, p. 91-98.

Morais, M. V. C. "Estudo de um Eletrodo Quimicamente Modificado com Fluorone para Determinação de Estanho", Dissertação de Mestrado, Departamento de Química – UEM, Maringá – PR, 2002.

Morita, T., Assumpção, R. M. V. "Manual de Soluções, Reagentes e Solventes", Edgard Blücher, 2 ed. São Paulo, 1981.

Qu, W., Wu, K., Hu, S. "Voltammetric Determination of Pyridoxine (Vitamin B<sub>6</sub>) by use of a Chemically-Modified Glassy Carbon Electrode", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, v. 36, p. 631-635.

Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., Melo, L. F. C. "Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos", *Química Nova*, 2004, v. 27-5, p. 771-780.

Rochet, disponível em <http://www.roche.pt/emagrecer/vitaminas> acessado em 23 de janeiro de 2007.

Salvo, M. L. di, Safo, M. K., Musayev, F. N., Bossa, F., Schirch, V. "Structure and Mechanism of Escherichia Coli Pyridoxine 5'-Phosphate Oxidase", *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, v. 1647, p. 76-82.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. "Princípios de Análisis Instrumental", Mc Graw Hill, 5 ed. Espanha, 2001.

Söderhjelm, P., Lindquist, J. "Voltammetric Determination of Pyridoxine by use of a Carbon Paste Electrode", *Analyst*, 1975, v. 100, p. 349-354.

Teixeira, M. F. S., Marino, G., Dockal, E. R., Cavalheiro, E. T. G. "Voltammetric Determination of Pyridoxine (Vitamin B<sub>6</sub>) at a Carbon Paste Electrode Modified with Vanadyl(IV)-Salen Complex", *Analytica Chimica Acta*, 2004, v. 508, p. 79-85.

Teixeira, M. F. S., Segnini, A., Moraes, F. C., Marcolino-Junior, L. H., Fatibello-Filho, O., Cavalheiro, E. T. G. "Determination of Vitamin B<sub>6</sub> (Pyridoxine) in Pharmaceutical Preparations by Cyclic Voltammetry at a Copper(II) Hexacyanoferrate(III) Modified Carbon Paste Electrode", *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2003, v. 14, p. 316-321.

Wang, J. "Analytical Electrochemistry", Wiley-VCH, 2. ed. New York, 2000.

Windholz, M., Budavari, S., Stroumstos, L. Y., Fertig, M. N. "The Merck Index", 9. ed., Merck & CO, EUA, 1976.

Yun, Y. H., Shanov, V., Shulz, M. J., Dong, Z., Jazieh, A., Heineman, W. R., Halsall, H. B., Wong, D. K. Y., Bange, A., Tu, Y., Subramaniam, S. "High Sensitivity Carbon Nanotube Tower Electrodes", *Sensors and Actuators B*, 2006, v. 120, p. 298-304.