



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

“Desenvolvimento de um método voltamétrico para determinação de N-nitrosodimetilamina em amostras de medicamentos”

Tassio de Araújo Nunes

João Pessoa / PB – Brasil

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



“Desenvolvimento de um método voltamétrico para determinação de N-nitrosodimetilamina em amostras de medicamentos”

Tassio de Araújo Nunes

Dissertação submetida ao programa de pós-graduação em química, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em “Química Analítica”.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mário Cesar Ugulino de Araújo

COORIENTADOR: Dr^a Amanda Cecília da Silva

*Bolsista:



João Pessoa / PB – Brasil

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N972d Nunes, Tassio de Araújo.

Desenvolvimento de um método voltamétrico para determinação de N-nitrosodimetilamina em amostras de medicamentos / Tassio de Araújo Nunes. - João Pessoa, 2023.

80 f.

Orientação: Mário César Ugulino de Araújo.

Coorientador: Amanda Cecilia da Silva.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Química analítica. 2. N-nitrosodimetilamina. 3. Voltametria. 4. Amostras de medicamentos. I. Araújo, Mário César Ugulino de. II. Silva, Amanda Cecilia da. III. Título.

UFPB/BC

CDU 543(043)

Desenvolvimento de um método voltamétrico para determinação de N-Nitrosodimetilamina em amostras de medicamentos.

Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Tássio de Araújo Nunes e aprovada pela banca examinadora em 21 de dezembro de 2023.

Documento assinado digitalmente
 **MARIO CESAR UGULINO DE ARAUJO**
Data: 21/12/2023 18:03:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Departamento de Química – CCEN/UFPB
Orientador/Presidente

Documento assinado digitalmente
 **AMANDA CECILIA DA SILVA**
Data: 21/12/2023 18:12:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Amanda Cecília da Silva
FAPESQ/CNPq-JPA-PB
Co-Orientadora

Documento assinado digitalmente
 **SEVERINO CARLOS BEZERRA DE OLIVEIRA**
Data: 21/12/2023 19:32:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira
UFRPE/Recife-PE
Examinador Externo

Documento assinado digitalmente
 **SHERLAN GUIMARAES LEMOS**
Data: 21/12/2023 18:53:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
Departamento de Química – CCEN/UFPB
Examinador Interno

Assinaturas da Banca realizada em modo Webconferência, digitalizadas e certificadas pelo Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo (SIAPE_0334937) em 21/12/2023.

Dedicatória

“Não tenho nenhum talento especial. Apenas sou apaixonadamente curioso.”

Albert Einstein

Dedico a todas as pessoas que me deram apoio durante os dias bons e ruins me trazendo novas perspectivas para dar prosseguimento a este trabalho.

Dedico a minha mãe, Rosane Maria de Araújo, por sua criação e por confiar no meu potencial, pois sem seu apoio incondicional eu não estaria aqui.

Dedico a Yasmin Thayse Lucena Ferreira, pelo apoio que me foi concedido durante toda essa fase, pois foi de fundamental importância sua presença em minha vida.

Dedico a toda minha família e entes queridos.

Agradecimentos

- Primeiramente a Deus, pois com ele tudo na vida é possível.
- Ao professor doutor Mário César Ugulino de Araújo, pela confiança e oportunidade que me foi concedido no desenvolvimento deste trabalho.
- A doutora Amanda Cecília da Silva, pelo apoio e incentivo concedido.
- Aos amigos do LAQA Dianna Oliveira, Fernanda Soares, João Mariz, Luciano Bernado, Lucas Alfredo, Rossana Nóbrega, Ruth Bezerra, Wallis Cavalcanti pelos momentos descontraídos durante todo esse percurso.
- A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Química da UFPB, pelos ensinamentos e colaboração na minha formação científica.
- Ao departamento de Química da UFPB pela estrutura concedida para o desenvolvimento deste trabalho.
- À CAPES pela bolsa concedida e financiamento deste trabalho, possibilitando a realização e consolidação desta dissertação.

SUMÁRIO

Capítulo 1. Introdução.....	14
Capítulo 2. Fundamentação teórica.....	18
Capítulo 3. Experimental	44
Capítulo 4. Resultados e Discussão	52
Capítulo 5. Conclusão	72
Capítulo 6. Referências	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de algumas N-nitrosaminas importantes.	20
Figura 2. Mecanismo de formação das N-nitrosaminas.	21
Figura 3. Classificação das N-nitrosaminas baseados nos fatores inerentes	22
Figura 4. Processo de conversão da dimetilamina em N-nitrosodimetilamina	23
Figura 5. Processo de conversão da amina secundária em N-nitrosodimetilamina, sob ação do formaldeído em uma das etapas.	24
Figura 6. Mecanismo de formação de N-nitrosaminas a partir da desnitrificação da Nitrocelulose.....	25
Figura 7. Modificação do DNA pela metilação da guanina.	27
Figura 8. Primeira célula eletroquímica desenvolvida por J. Heyrovský.....	28
Figura 9. Ilustração de uma célula eletroquímica típica.....	29
Figura 10. Mecanismo de transferência de massa na interface eletrodo-solução.....	30
Figura 11. Dupla camada elétrica baseado no modelo de Bockris et al., 1963	31
Figura 12. Janela de potencial dos eletrodos de diamante dopado com boro (EDDB), carbono (C), mercúrio (Hg) e platina (Pt) em alguns eletrólitos de suporte	32
Figura 13. a) Sinal de excitação E versus t da VC e b) Voltamograma cíclico de um processo redox reversível.	33
Figura 14. Sinal de excitação na voltametria de pulso diferencial.	37
Figura 15. Voltamograma de pulso de diferencial típico.....	38
Figura 16. Sinal de excitação da Voltametria de Onda Quadrada (VOQ).....	39
Figura 17. Voltamograma de Onda quadrada típico de um processo reversível	40
Figura 18. Princípio da Voltametria de Redissolução Anódica (ASV).....	42
Figura 19. Potenciostato/Galvanostato Eco Chemie Autolab.....	45
Figura 20. Cromatógrafo Thermofisher Scientific modelo Ultimate 3000	46
Figura 21. Centrífuga Hermle modelo Z 206A	47
Figura 22. Ultrasson Utronic Unique modelo USC.....	47
Figura 23. Voltamograma cíclico de 1,0 mmol L ⁻¹ da NDMA.....	53
Figura 24. A) Voltamogramas cíclicos do par redox Fe ³⁺ /Fe ²⁺ ; B) Relação $i_{p,a}$ versus $v^{1/2}$	54
Figura 25. Voltamogramas de pulso diferencial da NDMA: 1 ^a Varredura (—), 2 ^a Varredura (—), 3 ^a Varredura (—) e 4 ^a Varredura (—)	55

Figura 26. a) Voltamogramas de pulso diferencial em tampão BR; b) relação $E_{p,a}$ versus pH; c) $i_{p,a}$ versus pH.....	56
Figura 27. Voltamogramas de onda quadrada da NDMA: 1ª Varredura (—), 2ª Varredura (—), 3ª Varredura (—) e 4ª Varredura (—)	57
Figura 28. a) Voltamogramas de onda quadrada em tampão BR; b) relação $E_{p,a}$ versus pH; c) $i_{p,a}$ versus pH.....	57
Figura 29. Estudo comparativo da determinação de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NDMA em tampão Britton-Robisson pH 7 na VPD (—) e VOQ (—).....	59
Figura 30. Relação E_p versus $\text{Log } f$ usando a VOQ.....	60
Figura 31. Mecanismo provável para reação redox da NDMA.....	61
Figura 32. Estudo da natureza de transporte de massa de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NDMA. a) Voltamogramas cíclicos, b) Relação i vs $v^{1/2}$ e c) Relação $\log i$ vs \log	62
Figura 33. Estudo do Stripping anódico voltamétrico usando a VOQ. a) VOQ utilizando <i>Stripping</i> anódico. b) Relação E_p versus <i>Stripping</i> anódico. C) Relação i_p versus <i>Stripping</i>	63
Figura 34. Estudo de pré-concentração da NDMA usando Stripping anódico na VOQ....	64
Figura 35. Curva analítica da NDMA numa faixa de concentração de $250 - 2500 \text{ nmol L}^{-1}$ ($n = 3$).....	65
Figura 36. Aplicação do método de adição de padrão da NDMA na amostra Losartana (A_1). Voltamograma: Losartana A_1 (—), Losartana $A_1 + 500 \text{ nmol L}^{-1}$ NDMA (—), Losartana $A_1 + 750 \text{ nmol L}^{-1}$ NDMA (—), Losartana $A_1 + 1000 \text{ nmol L}^{-1}$ NDMA (—) e Losartana $A_1 + 1500 \text{ nmol L}^{-1}$ NDMA (—).....	69
Figura 37. Aplicação do método de adição de padrão da NDMA na amostra Losartana (B). Voltamograma: Losartana B (—), Losartana B + 500 nmol L^{-1} NDMA (—), Losartana B + 750 nmol L^{-1} NDMA (—), Losartana B + 1000 nmol L^{-1} NDMA (—) e Losartana B + 1500 nmol L^{-1} NDMA (—).....	70
Figura 38. Elipse de confiança referente ao método desenvolvido.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Artigos sobre a quantificação de N-nitrosaminas em diversas matrizes.	43
Tabela 2. Valores de corrente de pico anódica e catódica para o par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$	54
Tabela 3. Valores de $W_{1/2}$ no estudo de pH empregando a VPD.....	59
Tabela 4. Valores de E_p (V) em função de f (em Hertz).....	60
Tabela 5. Relação E_p versus pH usando a VOQ.....	61
Tabela 6. Teste análise de variância (ANOVA)	66
Tabela 7. Média da corrente de pico residual obtidos das medidas de 10 brancos em tampão BR pH 7,0	67
Tabela 8. Estudo de recuperações da NDMA nas amostras de Losartana (A_1 , A_2 , B) e Olmesartana (C, D).....	68
Tabela 9. Comparação entre o método proposto e o método de referência na determinação de NDMA em amostras de medicamentos	70

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ΔE_p	Amplitude de pulso
f	Frequência
i_p	Corrente de pico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EA	Eletrodo Auxiliar
ER	Eletrodo de Referência
ET	Eletrodo de Trabalho
EDDB	Eletrodo de Diamante Dopado com boro
ΔE_s	Incremento de potencial
$W_{1/2}$	Largura de pico a meia altura
ΔE_t	Largura de pulso
NDMA	N-nitrosodimetilamina
NN	N-nitrosaminas
E_p	Potencial de pico
PEH	Plano Externo de Helmholtz
PIH	Plano Interno de Helmholtz
v	Velocidade de varredura
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada

RESUMO

No final de 2021 uma portaria da Anvisa alertou a possível presença de N-nitrosaminas em medicamentos tipo sartanas, que são uma classe de fármacos muito utilizado por pacientes para o tratamento da hipertensão. As N-nitrosaminas são um grupo de compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura molecular ($R_2N-N=O$) um grupo nitroso ($-N=O$) e um grupo amina (R_2N-), onde o grupo substituinte R pode ser um grupo alquila, arila ou aromático. Uma das N-nitrosaminas que tem sido encontrada em medicamentos é a N-nitrosodimetilamina (NDMA), cuja as fontes de contaminação podem ocorrer no processo de síntese do princípio ativo, na adição dos excipientes e na embalagem do medicamento. A NDMA é um forte agente causador de câncer em diversos órgãos e tecidos, como exemplo, fígado, cérebro, rins, estômago, bexiga, pulmão, esôfago etc. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido muito usada na determinação de NDMA em medicamentos. Porém, os métodos da CLAE são laboriosos e lentos, apresentam um alto consumo de solvente e reagentes prejudiciais a saúde humana e um alto custo de manutenção, operação e aquisição dos equipamentos. Estas desvantagens podem ser superadas pelos métodos voltamétricos. Diante disso, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um novo método voltamétrico para a determinação de NDMA em amostras de losartana e olmesartana, utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro. O método desenvolvido apresentou excelente exatidão (com taxas de recuperação de 89,1 a 110,4%), reprodutibilidade (com desvio padrão relativo de 3,2%), limites de detecção ($67,6 \text{ nmol L}^{-1}$ NDMA) e de quantificação ($225,3 \text{ nmol L}^{-1}$ NDMA). Os resultados obtidos usando o método proposto foram comparados com aqueles obtidos usando um método de referência (CLAE) e não foi detectado diferenças estatísticas significativas entre ambos os resultados em um nível de confiança de 95%. Portanto, o método desenvolvido pode ser considerado uma valiosa alternativa a outros métodos da literatura para determinação de NDMA em medicamentos.

Palavras chave: N-nitrosodimetilamina; Voltametria; Eletrodo de diamante dopado com boro; Medicamentos; Losartana; Olmesartana.

ABSTRACT

At the end of 2021, an Anvisa ordinance warned of the possible presence of N-nitrosamines in sartana-type medications, which are a class of drugs widely used by patients to treat hypertension. N-nitrosamines are a group of organic compounds that present in their molecular structure ($R_2N-N=O$) a nitroso group ($-N=O$) and an amine group (R_2N-), where the substituent group R can be a group alkyl, aryl or aromatic. One of the N-nitrosamines that has been found in medicines is N-nitrosodimethylamine (NDMA), whose sources of contamination can occur in the synthesis process of the active ingredient, in the addition of excipients and in the packaging of the medicine. NDMA is a strong cancer-causing agent in various organs and tissues, such as the liver, brain, kidneys, stomach, bladder, lungs, esophagus, etc. High performance liquid chromatography (HPLC) has been widely used to determine NDMA in medicines. However, CLAE methods are laborious and slow, have a high consumption of solvents and reagents that are harmful to human health and a high cost of maintenance, operation and acquisition of equipment. These disadvantages can be overcome by voltammetric methods. Therefore, this work aimed to develop a new voltammetric method for the determination of NDMA in losartan and olmesartan samples, using a boron-doped diamond electrode. The method developed showed excellent accuracy (with recovery rates of 89.1 to 110.4%), reproducibility (with a relative standard deviation of 3.2%), detection limits (67.6 nmol L^{-1} NDMA) and quantification ($225.3 \text{ nmol L}^{-1}$ NDMA). The results obtained using the proposed method were compared with those obtained using a reference method (HPLC) and no statistically significant differences were detected between both results at a 95% confidence level. Therefore, the developed method can be considered a valuable alternative to other methods in the literature for determining NDMA in medicine.

Keywords: N-nitrosodimethylamine; Voltammetry; Boron-doped diamond electrode; Medicines; Losartan; Olmesartan.



Capítulo 1
Introdução

1. INTRODUÇÃO

Atualmente os métodos analíticos apresentam fundamental importância na determinação de analitos em matrizes complexas, como exemplo, medicamentos, cosméticos, saneantes, alimentos, amostras ambientais (corpos hídricos, solos, vegetação) etc. Os métodos cromatográficos são os mais utilizados na determinação de diversos analitos nestas diferentes amostras (Holler et al., 2009). Apesar da alta sensibilidade que os métodos de separação obtêm; sobretudo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresentam um alto consumo de reagente, um alto custo de manutenção, alto custo de instrumentação e aquisição dos equipamentos. Em substituição a esses instrumentos de alto desempenho, podem-se citar os métodos voltamétricos, pelo qual, com a escolha adequada do eletrodo de trabalho podem apresentar uma alta sensibilidade de análise em amostras reais (Lourenço et al., 2022; Soares et al., 2023).

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que faz uso de três eletrodos, um eletrodo de referência (ER), um eletrodo auxiliar (EA) e um eletrodo de trabalho (ET) imerso em uma cela eletroquímica que contém o eletrólito de suporte. O uso do eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) como eletrodo de trabalho confere vantagens analíticas promissoras para quantificação de diversos analitos, visto que apresenta uma alta estabilidade à corrosão em meios muito ácidos (excesso de H^+) e muito básicos (excesso de HO^-), apresentando baixa corrente capacitiva, alta sensibilidade analítica e uma ampla faixa de potencial de resposta (Holler et al., 2009; Fatibello-Filho et al., 2022).

A contaminação de medicamentos está sendo muito comum nos tempos atuais, uma vez que em algumas etapas de manufatura do fármaco há a incidência de contaminantes que podem eventualmente causar sérios problemas para quem os consomem (Akkaraju, 2023). Dito isto, os métodos voltamétricos podem ser utilizados como uma ferramenta poderosa para determinação de contaminantes presentes em amostras de medicamentos.

As N-nitrosaminas são compostos orgânicos nitrogenados de baixo peso molecular, pelo qual algumas destas espécies podem apresentar atividade carcinogênica em seres humanos. No final de 2021 uma portaria da Anvisa (Anvisa, 2021) alertou sobre a possível presença de N-nitrosaminas em sartanas, que são uma classe de fármacos utilizado por pacientes para o tratamento da hipertensão (CFF, 2022).

Em virtude da problemática citada acima, o respectivo trabalho tem como perspectiva o desenvolvimento de um método voltamétrico sensível e rápido para determinação de N-nitrosodimetilamina (NDMA) em amostras de medicamentos fazendo uso da voltametria de onda quadrada (VOQ).

1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método analítico rápido e sensível para determinação de N-nitrosodimetilamina (NDMA) em amostras reais de medicamentos, fazendo uso da voltametria de onda quadrada (VOQ) com uso do eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) como eletrodo de trabalho.

1.1.1 Objetivos Específicos

- i) Desenvolvimento de um método voltamétrico para determinação de N-nitrosodimetilamina;
- ii) Aplicação do método desenvolvido em amostras de losartana e olmesartana para determinar a presença de NDMA.



Capítulo 2
Fundamentação teórica

2 . FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Sartanas: considerações gerais

As sartanas é uma classe de medicamentos classificados como bloqueadores de receptores de angiotensina, mais popularmente conhecidos como anti-hipertensivos, utilizadas para o tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca. Essa classe de medicamentos é empregada em casos clínicos do aumento da pressão arterial acima de valores de 140 mmHg (pressão sistólica) ou 80 mmHg (pressão diastólica) (Then e Rankin, 2004).

A Losartana® é um dos medicamentos mais consumidos no Brasil, sendo importante para redução da chance dos pacientes hipertensivos em serem acometidos por ataques cardíacos e/ou por acidente vascular cerebral (AVC), em virtude do aumento da pressão arterial. A losartana potássica age como um vasodilatador para ajudar o coração a bombear sangue para todo o corpo com maior facilidade, sendo este o 14º medicamento mais consumido no Brasil no ano de 2021, destacando sua importância para o tratamento da hipertensão (CFF, 2022).

A olmesartana medoxomila associado com hidroclorotiazida apresenta a mesma função do medicamento anteriormente mencionado, responsável pelo bloqueio da angiotensina II agindo na diminuição da pressão arterial, promovendo uma maior circulação sanguínea, sendo a hidroclorotiazida promotora de uma ação diurética (Bhairam et al., 2023; Ahirrao, et al., 2023)

2.2 N-Nitrosaminas (NN): considerações gerais

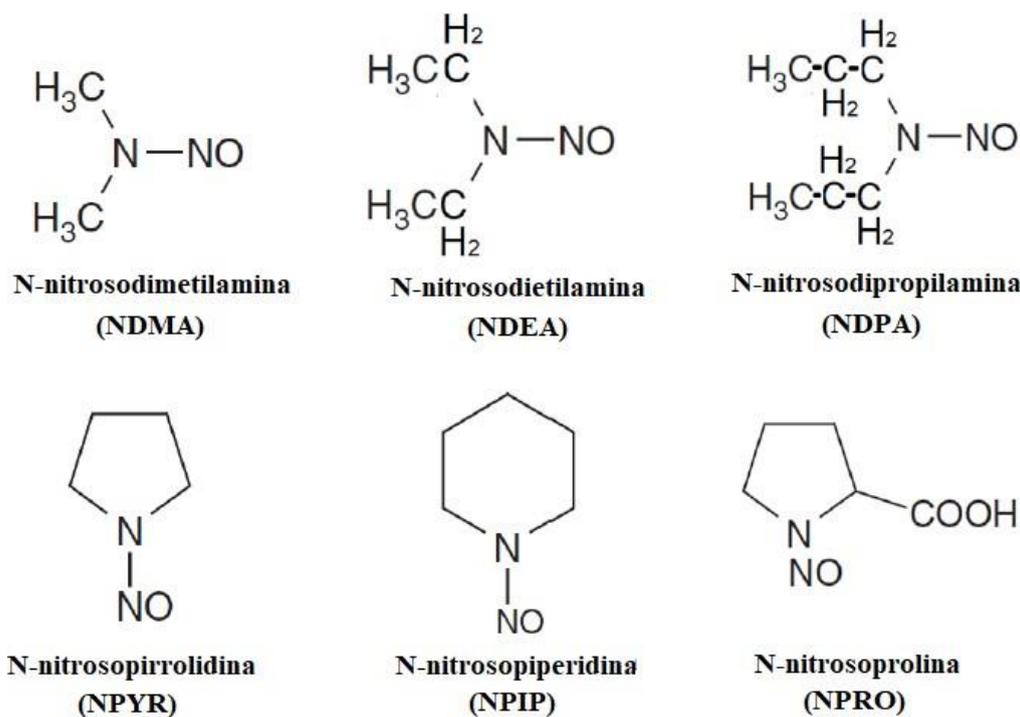
As N-nitrosaminas (NN) são um grupo de compostos orgânicos que apresentam em sua constituição uma estrutura molecular do tipo ($R_2N-N=O$), constituído de um grupo nitroso ($-N=O$) e um grupo amina (R_2N-) pelo qual o grupo substituinte R pode ser um grupo alquila, arila e/ou um grupo aromático, pelo qual suas propriedades físico-químicas podem ser influenciadas pela presença desses grupos substituintes (Krasner et al., 2013).

As NN foram descobertas em 1878 pelo cientista Otto N. Witt que as denominou da seguinte forma “Eu chamo de nitrosaminas qualquer amônia substituída que contém, em vez de pelo menos um átomo de hidrogênio, um grupo nitrosila ($-NO$), em conexão imediata com o nitrogênio amoniacal” (Witt, 1878). Estes compostos voltaram a ter uma maior atenção um século mais tarde, estudos conduzidos pelos cientistas britânicos J. Barnes e P. Magee, evidenciaram que a exposição prolongada a NDMA foram as reais

causadoras no desenvolvimento de tumores hepáticos em mamíferos roedores (Magee e Barnes, 1956).

Esses compostos podem ser formados a partir de aminas secundárias, aminas terciárias, amidas, carbamatos, por compostos derivados da ureia com grupos nitritos e por compostos nitrogenados (Akkaraju et al., 2023). Algumas estruturas são mostradas na **Figura 1** abaixo:

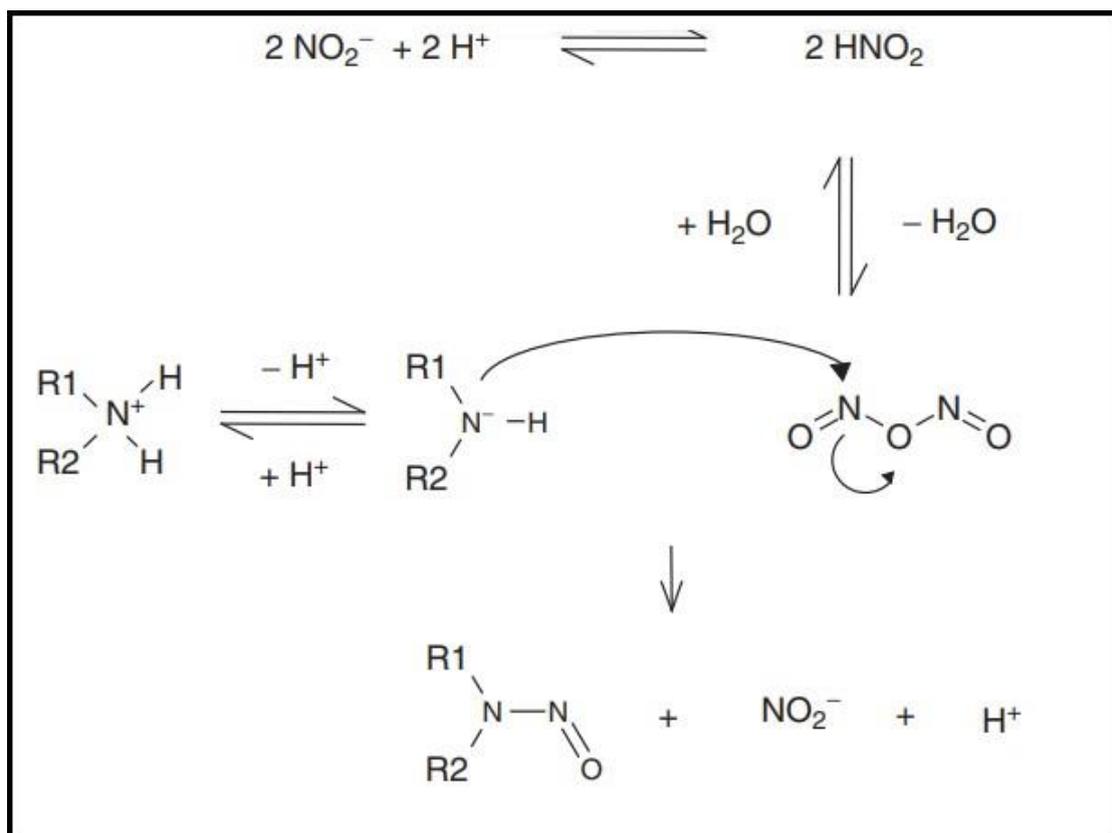
Figura 1 – Estrutura de algumas N-nitrosaminas importantes.



A formação das NN é ocasionada em meio ácido, inicialmente o íon nitrito é convertido em HNO_2 pela protonação espontânea, em uma etapa posterior 2 moléculas de HNO_2 reagem quimicamente, onde os produtos são o trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) e H_2O . Na última etapa, o N_2O_3 atua como eletrófilo, sofrendo ataque nucleofílico de uma amina secundária promovendo a formação da N-nitrosamina, acompanhada do íon nitrito (NO_3^-) e do íon hidrônio (H_3O^+) (Crews, 2014).

A **Figura 2** abaixo ilustra o mecanismo geral de formação das N-nitrosaminas a partir do íon nitrito em meio ácido.

Figura 2 – Mecanismo de formação das N-nitrosaminas



Fonte: Crews, 2014

Vale destacar que há outras vias de formação das N-nitrosaminas (NN), constatando a presença destes compostos em diversas matrizes como exemplo, carnes processadas, medicamentos, bebidas alcoólicas, cosméticos, fumaça de cigarro etc. Sendo conhecidas por serem formadas como produto de reação da matéria orgânica em meio aquoso (águas superficiais e subterrâneas), as NN também podem ser formadas na boca e no estômago desde que haja a presença de seus precursores (nitritos e nitratos) (Robles, 2022).

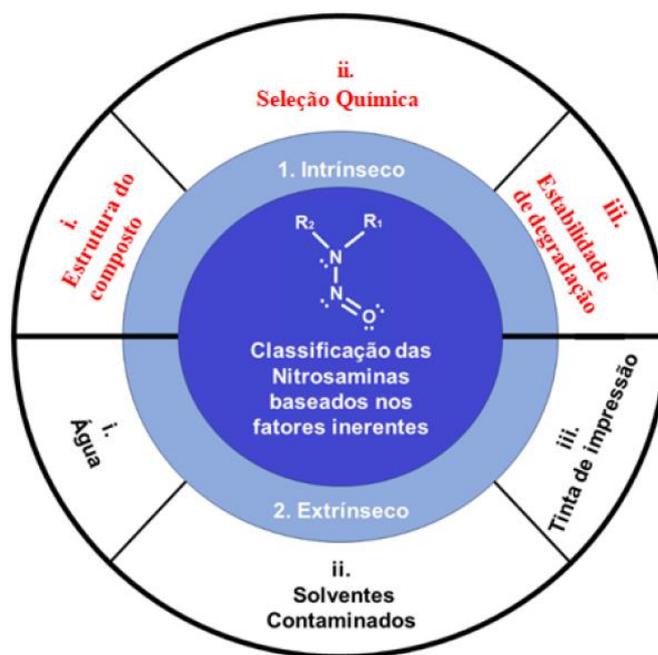
Em virtude da eventual ação carcinogênica que as NN podem conferir aos seres humanos, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou 24 N-nitrosaminas em relação ao grau de carcinogenicidade (IARC, 2015). As NN são consideradas como fortes agentes carcinogênicos, uma vez que podem acarretar câncer em diversos órgãos e tecidos, como exemplo, fígado, cérebro, rins, estômago, bexiga, pulmão, esôfago etc. Pelo qual a N-nitrosodimetilamina (NDMA) é a N-nitrosamina mais simples e comum de ser encontrada (Robles, 2022).

2.3 N-nitrosaminas (NN) em medicamentos

Em junho de 2018 foi constatada pela primeira vez a presença de NN em alguns lotes da Losartana® (Zhejiang Huahai Pharmaceutical – ZHP), sendo que em julho do mesmo ano a FDA (*Food and Drug Administration*) constatou a presença de N-nitrosodimetilamina (NDMA) e N-nitrosodietilamina (NDEA) em outras sartanas (US-FDA, 2019). Outros estudos comprovaram a presença dessas NN em medicamentos como a Ranitidina®, um medicamento usado para o tratamento de úlceras estomacais e em alguns lotes de cloridrato de metformina, um antidiabético muito consumido por pessoas com comorbidades (Bharate, 2021).

As possíveis fontes de contaminações de medicamentos podem ser classificadas em três categorias: 1) processo de síntese do princípio ativo; 2) fabricação do medicamento e 3) embalagem do medicamento (Akkaraju, 2023; Keire, 2020). A contaminação por N-nitrosaminas pode ser baseada nos fatores inerentes, que podem ser classificados como intrínseca e extrínseca **Figura 3**.

Figura 3 – Classificação das N-nitrosaminas baseados nos fatores inerentes



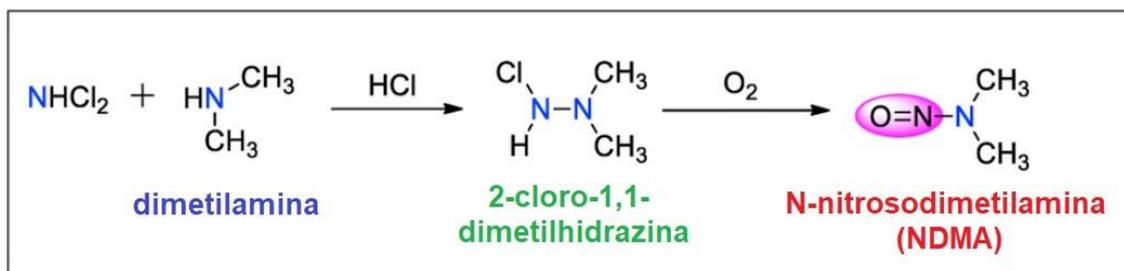
Fonte: Akkaraju et al., 2023

Os fatores intrínsecos dependem da estrutura do composto de partida no processo de fabricação, da seleção química e da degradação dos constituintes durante o processo de fabricação, pelo qual os compostos contendo aminas secundárias são mais suscetíveis para formação das NN durante as etapas de síntese e fabricação. Os fatores extrínsecos dependem do grau de contaminação da água (superficial e subterrânea) no

processo de manufatura desses medicamentos, outros fatores importantes como solventes contaminados e contaminação por tinta de impressão durante a etapa de embalagem também devem ser ressaltados (Akkaraju et al., 2023; Keire, 2020). Um dos maiores contaminantes de águas subterrâneas são os pesticidas, estes contaminantes são o reagente de partida responsável pela formação das NN em meio aquoso, sendo esses comumente utilizados em atividades agrícolas e industriais (Archna-Sharma e Sobti, 2012). Vale ressaltar que estudos anteriores constataram que processos referentes a purificação da água podem ser os responsáveis pela formação de NN, tal qual como a cloroaminação e o uso de filtros de troca iônica (Fiddler et al., 1977; Kimoto et al., 1980; Gough et al., 1977).

Em estações de tratamento de água e esgoto o processo de cloração de água contaminada na presença de aminas secundárias pode acarretar na formação da NDMA, sendo a primeira etapa constituída da reação química entre a dicloroamina e a dimetilamina, formando o 2-cloro-1,1-dimetilhidrazina como intermediário, esse composto químico sob a influência do O₂ atmosférico é convertido em NDMA como ilustrado na **Figura 4** (Akkaraju et al., 2023; Krasner et al., 2013).

Figura 4 – Processo de conversão da dimetilamina em N-nitrosodimetilamina



Fonte: Adaptado de Akkaraju et al., 2023

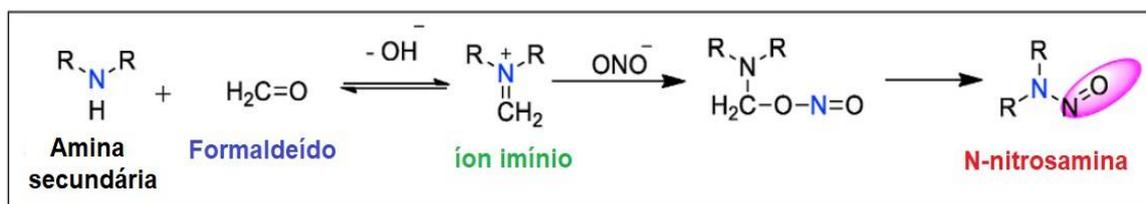
Em outros estudos foi relatado que os polímeros de tratamento catiônico, como exemplo, os polímeros de poliaminas utilizados como coagulantes em estações de tratamento de água se degradam em função do tempo de uso, liberando a NDMA como subproduto de sua degradação (Wilczak et al., 2003; Flowers e Singer, 2013).

A OMS constatou que 30% das 2000 amostras de água de diferentes fontes estavam contaminadas com 24 mg L⁻¹ de N-nitrosaminas (Akkaraju et al., 2023). Vale destacar que essa fonte de contaminação no processo de manufatura das sartanas é uma das principais e devem ser ressaltadas, sendo necessário um maior cuidado no controle da qualidade dos insumos.

A contaminação dos solventes/reagentes de partida também deve ser ressaltada, pois em alguns casos a indústria faz um processo de reciclagem e posterior reutilização destes reagentes, como exemplo a dimetilformamida, di-isopropiletilamina, trietilamina, 1-amino-2-propanol etc. Porém, em muitos casos essa prática é terceirizada e os fornecedores podem não estabelecer um protocolo adequado de recuperação destes solventes, podendo acarretar na formação de resíduos de NN durante este processo (Aboagye et al., 2021; Roose et al., 2015; Mitch e Schreiber, 2008; SCCS, 2011).

Presume-se que a fonte de contaminação dos medicamentos também se origina da síntese do ingrediente farmacêutico ativo (IFA), mas outros estudos comprovaram que há uma corroboração de outras fontes em paralelo, como exemplo dos excipientes contaminados, excipientes degradados e dos solventes usados na etapa de fabricação do IFA (Hheads of medicines agency, 2020). Vale ressaltar que os aldeídos são encontrados como impurezas em diversos excipientes farmacêuticos, tendo em vista que esses compostos oxigenados catalisam a nitrosação de aminas secundárias em uma das etapas da formação das NNs, como detalhado na **Figura 5** (Wu et al., 2011; Fiddler et al., 1977).

Figura 5 – Processo de conversão da amina secundária em N-nitrosodimetilamina, sob ação do formaldeído em uma das etapas



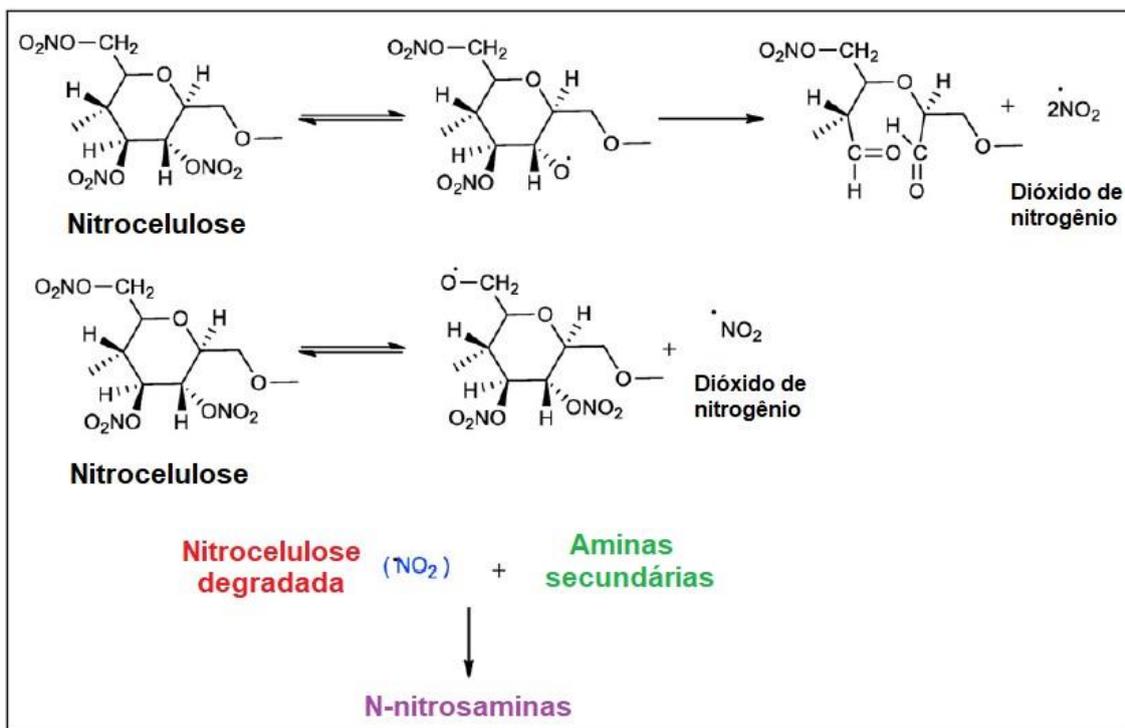
Fonte: Akkaraju et al., 2023

Durante a etapa de armazenamento do medicamento pode haver o processo de degradação do IFA e de seus excipientes, podendo favorecer a formação de NN, por exemplo, um estudo de degradação da ranitina constatou que houve o aumento da concentração de NDMA presente no comprimido armazenado a 25 °C, nesse experimento houve um aumento de 7 ng de NDMA em 12 dias. Num segundo experimento, o comprimido foi submetido a um armazenamento a 70 °C, onde houve um aumento de 142 ng de NDMA após 14 dias (White, 2021). É necessário também enfatizar que há a possibilidade de formação de N-nitrosaminas durante a etapa de armazenamento do produto (Akkaraju et al., 2023).

Outra fonte de contaminação que deve ser ressaltada é no processo de embalagem, pelo qual as tintas de embalagens no processo de impressão são fontes

relevantes de substâncias promotoras da formação de NN, como exemplo, a nitrocelulose encontrada em tintas à base de solventes, sendo este composto um reagente de partida para formação de NO_2 , esse intermediário é convertido em NN posteriormente (Torbjorn, 2004; Mahan, 2020). A **Figura 6** ilustra as etapas de conversão da nitrocelulose em NN.

Figura 6 – Mecanismo de formação de N-nitrosaminas a partir da desnitrificação da nitrocelulose



Fonte: Akkaraju et al., 2023

2.4 Toxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade da N-nitrosodimetilamina (NDMA)

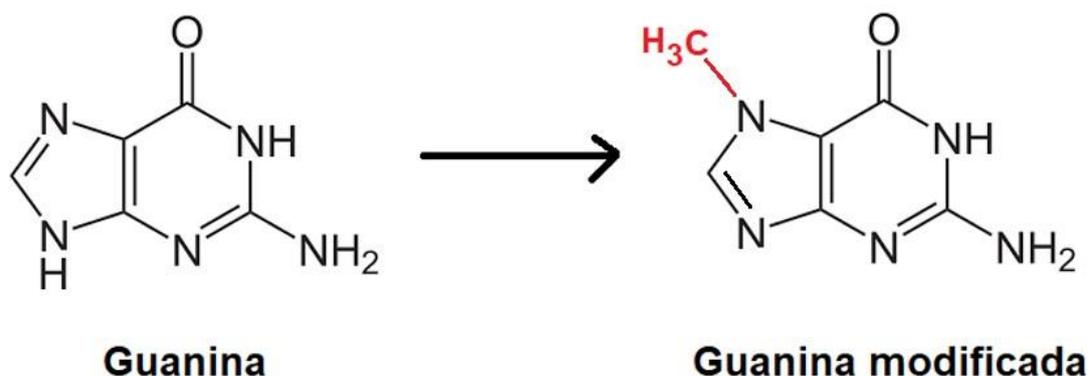
As NN têm a capacidade de interromper o funcionamento do sistema imunológico, fazendo com que o organismo fique vulnerável a infecções e ao desenvolvimento de tumores. A toxicidade dessa classe de compostos foi primeiramente constatada em 1954, quando dois técnicos de laboratório desenvolveram cirrose hepática após o manuseio de NDMA, sendo que seu perfil de toxicidade é acarretado pela alquilação de macromoléculas. Vale ressaltar que a toxicidade é ocasionada pela formação de hepatócitos causada pela NDMA e não pelo composto propriamente dito (Ellen et al., 1982).

A mutagênese é ocasionada pela formação e transporte do metabólito promovido pela NDMA que flui do fígado para o baço, no qual neste órgão, os hepatócitos

provenientes da NDMA produzem um efeito mutagênico nas bactérias presentes, vale lembrar que o baço apresenta também a função de capturar e eliminar vírus e bactérias. Esses hepatócitos também apresentam papel imunossupressor e é um agente causador de danos na estrutura do DNA (Bakshi e Brusick, 1980).

Foi demonstrado experimentalmente que a NDMA pode ocasionar a metilação de proteínas e ácidos nucleicos e que a formação da ligação covalente entre o grupo metil e a guanina da fita do DNA produz uma alteração na estrutura e função do DNA, ocasionando lesões persistentes ao código genético e conferindo a NDMA como um potencial agente carcinogênico (Tubbs, 2013; Oliveira et al., 2023).

Figura 7 – Modificação do DNA pela metilação da guanina.



Fonte: adaptado de Oliveira et al., 2023

Estudos conduzidos por J. M. Barnes e P. N. Magee demonstraram que a exposição prolongada a altas concentrações de NDMA causa necrose hepática, inibição da síntese de proteínas e a morte de células. Enquanto que a exposição prolongada a baixos níveis de NDMA pode causar o surgimento de tumores hepáticos malignos e tumores renais (Barnes e Magee, 1954; Magee e Barnes, 1956; Magee e Barnes, 1958; Magee e Barnes, 1962). Sendo outros órgãos como esôfago, estômago e sistema nervoso central igualmente suscetível a formação de tumores (Ellen et al., 1982).

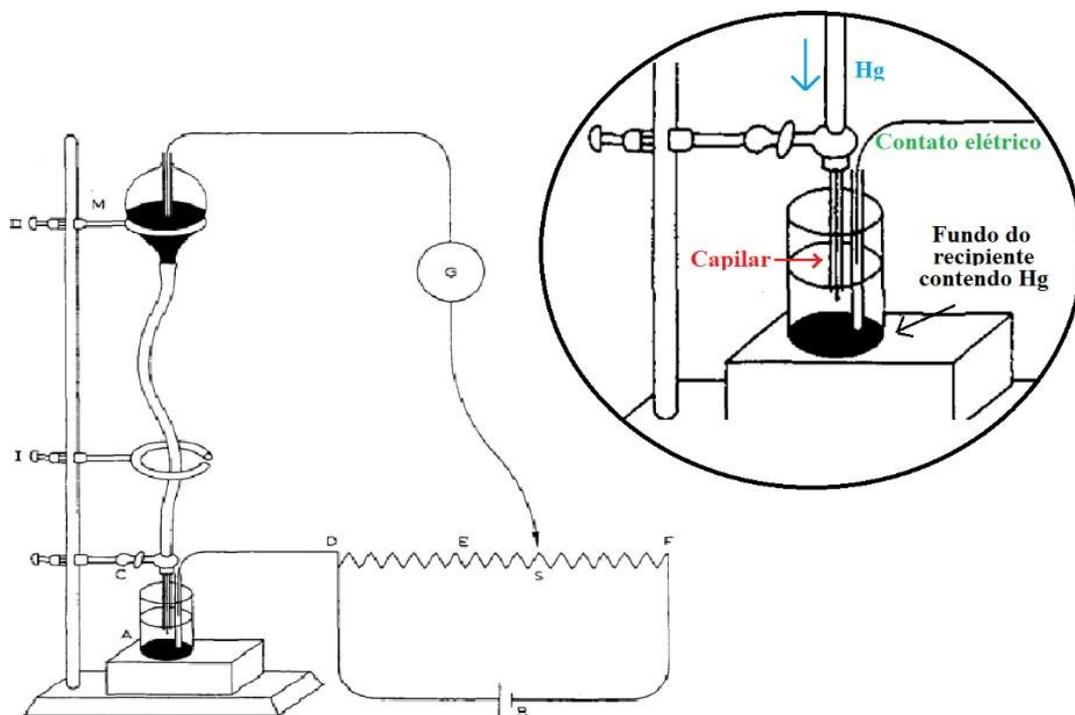
2.5 Técnicas Voltamétricas

A voltametria surgiu em 1925, quando Jaroslav Heyrovský descobriu através de experimentos, a redução do oxigênio molecular (O_2) sob ação do eletrodo gotejante de mercúrio (EGM) quando submetido a uma aplicação de potencial. No ano seguinte com

o mesmo eletrodo, foi realizado o estudo da redução de metais alcalinos e alcalino-terrosos (Heyrovský, 1922; Heyrovský, 1923).

O eletrodo gotejante de mercúrio (EGM), foi utilizado na primeira célula eletrolítica conhecida, desenvolvida por Heyrovský, este eletrodo consistia de um capilar de vidro conectado a um reservatório contendo Hg, este eletrodo era conectado a um polo negativo de uma bateria, pelo qual gotejava Hg no fundo do recipiente, a cada gota era realizado uma medida de corrente das espécies metálicas que se reduziam, no fundo da célula formava-se um poço de Hg que comportava-se como ânodo, pois era conectado a um terminal positivo de uma bateria (Heyrovský, 1959). A **Figura 8** ilustra o primeiro eletrodo de trabalho utilizado para medidas de corrente em função do potencial aplicado.

Figura 8 – Primeira célula eletroquímica desenvolvida por J. Heyrovský



Fonte: Heyrovský, 1959

Duas décadas mais tarde, Lantini e Kolthoff empregaram pela primeira vez o termo voltametria para interpretação da relação corrente – potencial (I_p vs E_p) quando empregaram um microeletrodo de platina para determinação do Tl^+ , O_2 e outros cátions metálicos (Lantini e Kolthoff, 1941).

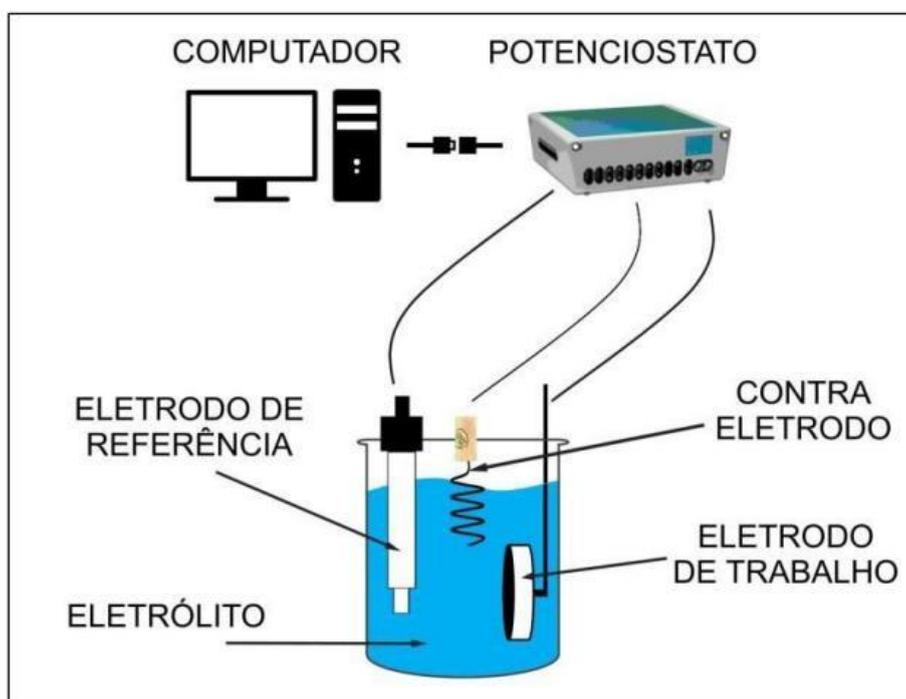
Nos estágios iniciais após o surgimento da voltametria como técnica analítica, era utilizado um sistema de dois eletrodos para as medidas de I_p vs E_p , mas em virtude

das reações de transferência de elétrons que ocorriam na superfície do eletrodo de referência, se fez necessário a implementação de um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e o eletrodo auxiliar (EA) ou contra eletrodo.

O ET tem por função promover o processo redox das espécies químicas quando um potencial é aplicado em uma ampla faixa de potencial. O ER tem por finalidade manter o potencial controlado durante as medidas de I_p vs E_p , o ER apresenta uma alta resistência (ohms) a transferência de carga. O EA tem como função específica fechar o circuito elétrico da célula eletroquímica, para que o processo redox seja favorecido, neste eletrodo há a ocorrência da reação redox reversa ao que ocorre no ET (Skoog et al., 2002).

A **Figura 9** ilustra esquematicamente uma célula eletroquímica composta por um sistema de três eletrodos imersos em um eletrólito de suporte, os eletrodos são conectados a um potenciostato, que por sua vez é controlado por um *software* (computador).

Figura 9 – Ilustração de uma célula eletroquímica típica



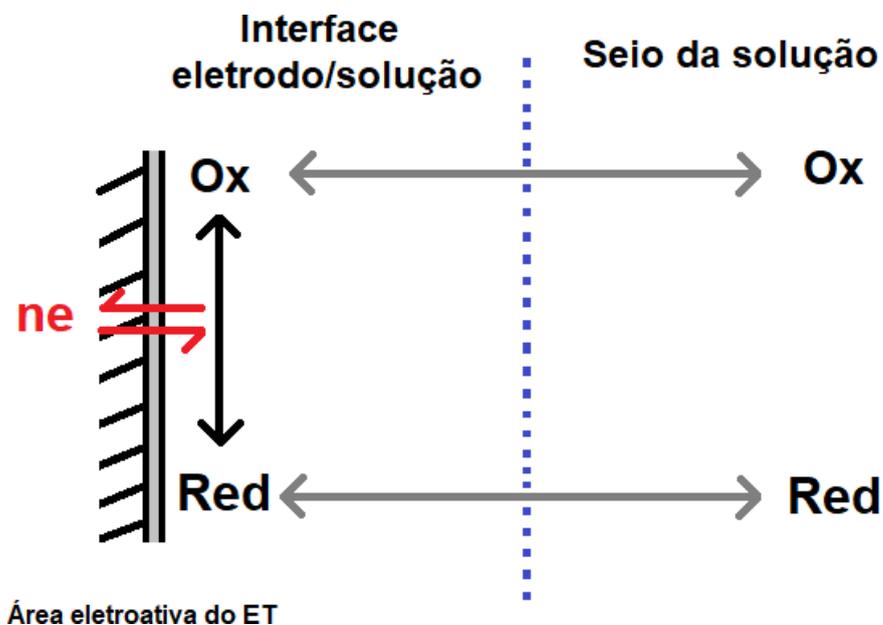
Fonte: Resende et al., 2017

Em voltametria, o mecanismo de transferência de massa é governado por três processos de natureza distintas: 1) convecção – pelo qual a transferência de massa do analito na interface eletrodo/solução é ocasionada por agitação mecânica; 2) difusão –

pelo qual a transferência de massa do analito na interface eletrodo/solução é ocasionado pela formação de um gradiente de concentração, promovendo a transferência de massa do analito da interface concentrada para a menos concentrada e 3) migração – pelo qual a transferência de massa do analito na interface eletrodo/solução é ocasionado pela formação de um campo elétrico promovido pelo ET, neste caso a espécie química carregada é atraída por atração eletrostática para o eletrodo de carga oposta (Skoog et al., 2002).

A **Figura 10** esquematiza como ocorre o processo de transferência de massa na interface eletrodo/solução, como pode ser visto a espécie química ao chegar à superfície do eletrodo de trabalho é convertida em um produto redox que vai depender da natureza do analito e da natureza do meio.

Figura 10 – Mecanismo de transferência de massa na interface eletrodo-solução



Nesse caso, denomina-se de corrente faradaica o processo de transferência de elétrons entre o analito e o eletrodo de trabalho, sendo este processo de transferência de elétrons governado pelas leis de Faraday, que obedece a seguinte relação:



A corrente faradaica é essencialmente dependente da difusão do analito, pelo qual o processo de transferência de massa vai depender do coeficiente de difusão da espécie química (Ox e Red) e do gradiente de concentração, como definido pela **Equação 2** e **Equação 3**.

$$I = -nFD_{Ox} \left(\frac{\partial C_{Ox}}{\partial x} \right)_{x=0} \quad \text{Equação 2}$$

$$I = nFD_{Red} \left(\frac{\partial C_{Red}}{\partial x} \right)_{x=0} \quad \text{Equação 3}$$

Pelo qual, I é a corrente do processo redox; n é o número de mols da espécie química; F é a constante de faraday (96485 C mol^{-1}); D_{Ox} é o coeficiente de difusão da espécie Ox; D_{Red} é o coeficiente de difusão da espécie Red.

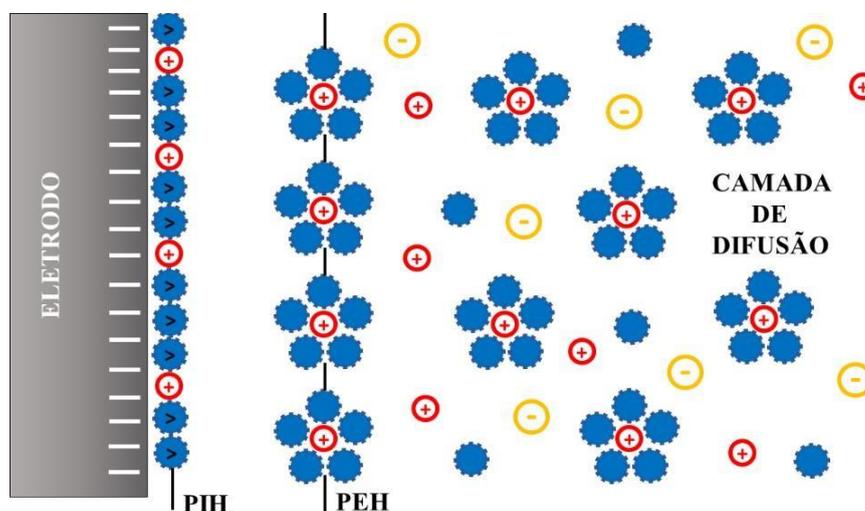
As **Equações 2 e 3** consideram a relação de corrente (em ampers) das espécies Ox e Red em condições em que a espécie química de interesse se encontra muito próximo da área eletroativa do sensor voltamétrico ($x = 0$), essa relação é a base teórica da maioria dos métodos eletroquímicos (Skoog et al., 2002).

Outro tipo de corrente que deve ser destacada é a corrente capacitiva, que surge do acúmulo de espécies químicas carregadas na interface eletrodo/solução, ocasionando a formação de uma dupla camada elétrica, pelo qual a dupla camada elétrica formada age como um capacitor. Vale ressaltar que esse tipo de corrente não pode ser eliminado completamente nas medidas voltamétricas, visto que a formação da dupla camada elétrica em processos eletródicos é inevitável (Bard e Faulkner, 2001).

O modelo proposto por Brockris e colaboradores em 1963 considera que a formação da dupla camada elétrica é de natureza interfacial, pelo qual as espécies químicas de carga oposta aderem na superfície eletroativa do ET. Na **Figura 11** é mostrado o modelo de Brockris para cátions, pelo qual se tem na primeira camada interna o plano interno de Helmholtz (PIH), consistindo de espécies de carga positiva (cátions) e moléculas do solvente adsorvidas. A segunda camada denominada de plano externo de Helmholtz (PEH) consiste em uma região de separação considerável entre a espécie química solvatada e a superfície do ET, havendo uma atração eletrostática de longo alcance entre o cátion solvatado e o ET (Bockris et al., 1963). A separação de cargas em relação à camada de difusão promove a formação de um capacitor, visto que

nessa região entre o PEH e a superfície do ET haverá a predominância de cátions, originando o surgimento da corrente capacitiva nas medidas voltamétricas.

Figura 11 – Dupla camada elétrica baseada no modelo de Bockris et al., 1963



Fonte: adaptado de Ciobanu et al., 2007

Pelo qual:

-  – Molécula do solvente;
-  – Molécula do solvente com orientação do dipolo;
-  – Cátion;
-  – Ânion;
-  – Cátion solvatado;

PIH – Plano Interno de Helmholtz;

PEH – Plano Externo de Helmholtz.

2.5.1 Eletrodos em voltametria

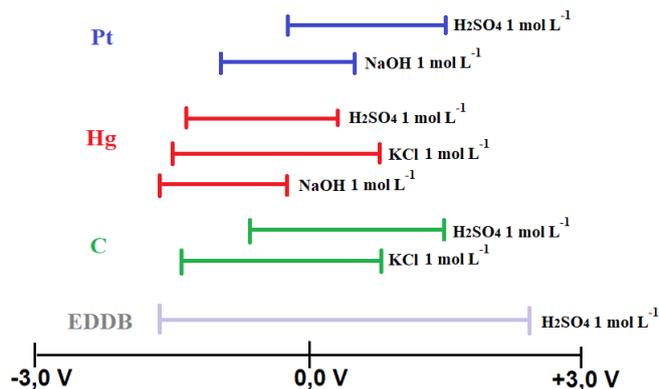
A escolha do melhor sensor em voltametria se torna fundamental, visto que a resposta do analito varia dependendo da matriz estudada. Apesar da boa reprodutibilidade que o EGM apresentou nos anos iniciais do surgimento da

voltametria, a sua aplicação se tornou cada vez mais inviável, uma vez que o mercúrio apresenta uma alta toxicidade, revelando a necessidade da substituição do EGM por eletrodos sólidos. Os sensores voltamétricos sólidos devem apresentar as seguintes características: 1) propriedades químicas, físicas e eletrônicas reproduzíveis; 2) estabilidade química; 3) microestrutura homogênea; 4) corrente de fundo baixa e estável; 5) estabilidade morfológica e microestrutural; 6) cinética química rápida na reação de transferência de elétrons; 7) material de alta condutividade elétrica, 8) material de fácil fabricação e de baixo custo e 9) material durável e de dureza elevada (Fatibello-Filho et al., 2022).

Os eletrodos de trabalho mais utilizados em voltametria são: i) Eletrodos metálicos – citando primeiramente o eletrodo policristalino de platina (Pt) por ser um material inerte apresenta-se como um bom eletrodo em algumas aplicações; ii) Eletrodos metálicos não nobres – diferente dos eletrodos inertes, podem reagir com o eletrólito de suporte, como exemplo tem-se o eletrodo de níquel, prata e de cobre; iii) Eletrodos não metálicos – os eletrodos de carbono são os mais utilizados como eletrodo de trabalho, valendo ressaltar os eletrodos de carbono vítreo (ECV), grafite (EG), pasta de carbono (EPC), pasta de carbono quimicamente modificados (EPC modificados), diamante dopado com boro (EDDB) entre outros.

O eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) apresenta uma alta estabilidade à corrosão em meios muito ácidos (excesso de H^+) e muito básicos (excesso de HO^-), apresentando baixa corrente capacitiva, alta sensibilidade analítica e uma ampla faixa de potencial de resposta. O EDDB é o eletrodo de trabalho que apresenta a maior janela de potencial (-1,5 a 2,5V) dentre os ET para aplicações analíticas, vide **Figura 12**.

Figura 12 – Janela de potencial dos eletrodos de diamante dopado com boro (EDDB), carbono(C), mercúrio (Hg) e platina (Pt) em alguns eletrólitos de suporte

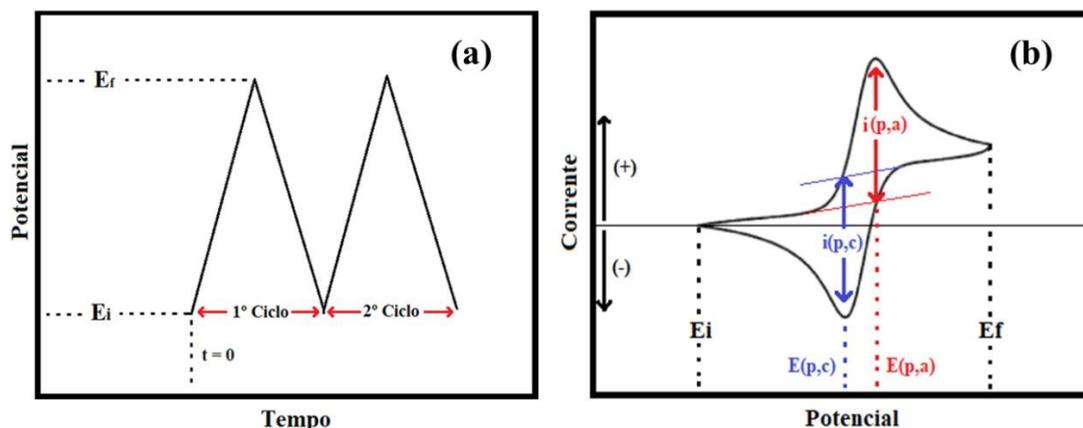


Fonte: Fatibello-Filho et al., 2022

2.5.2 Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria cíclica é uma técnica de varredura que foi reportada teoricamente pela primeira vez em 1948 (Randles, 1948; Ševčík, 1948). A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica muito utilizada como ferramenta de diagnóstico para o estudo de sistemas redox, sendo utilizada em estudos iniciais para o desenvolvimento de um método voltamétrico (Fatibello-Filho et al., 2022). Na VC a varredura de potencial consiste de um sinal de excitação na forma triangular, que consiste de varreduras anódicas e catódicas. A varredura anódica ocorre quando há medidas de I_p versus E_p em sentido crescente de potencial ($E_i \rightarrow E_f$), e a varredura catódica ocorre quando há medidas de I_p versus E_p em sentido decrescente de potencial ($E_f \rightarrow E_i$) como mostrado na **Figura 13**. O voltamograma cíclico correlaciona o sinal de corrente versus o potencial aplicado na etapa de varredura anódica e catódica, sendo os termos definidos como potencial de pico anódico ($E_{p,a}$), potencial de pico catódico ($E_{p,c}$), corrente de pico anódica ($i_{p,a}$) e corrente de pico catódica ($i_{p,c}$). Os termos referentes ao processo catódico nos dão informações sobre a corrente consumida durante o processo de redução do analito e do seu potencial de resposta característico, e os termos referente ao processo anódico nos dão informações sobre a corrente formada durante o processo de oxidação do analito e do seu potencial de resposta característico, vide **Figura 13b**.

Figura 13 – a) Sinal de excitação E versus t da VC e b) Voltamograma cíclico de um processo redox reversível.



As principais vantagens da VC residem na possibilidade de avaliação dos processos de oxidação e redução do analito, podendo descrever o grau de reversibilidade da reação redox, os mecanismos de transferência de elétrons, a formação de intermediários de reação e a adsorção do analito na superfície do eletrodo. Entretanto a VC não apresenta boa sensibilidade em situações onde a concentração do analito esteja abaixo de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$, visto que a corrente capacitiva é uma fonte pronunciada de erro instrumental para esta técnica voltamétrica. Outra desvantagem da VC reside no fato de ser necessário obter uma região bem definida de I_p versus E_p , sendo necessário não haver reações secundárias que possam sobrepor ou distorcer o sinal de oxidação e/ou redução do par redox. Valendo destacar que as reações secundárias mais comuns em VC são as reações redox do solvente e as reações dos íons do eletrólito de suporte (NO_3^- , Cl^- e ClO_4^-).

Em VC as medidas de corrente dependem exclusivamente da velocidade de varredura (v), do coeficiente de difusão da espécie química (D) e da concentração (C), em casos da transferência de elétrons ocorrerem de forma rápida, o sistema químico é dito ser reversível, visto que a razão de $I_{(p,a)} / I_{(p,c)} = 1,0$, a corrente de pico aumenta linearmente com o aumento da velocidade de varredura, e esta relação é estabelecida pela equação de Randles-Ševčík, vide [Equação 4](#).

$$i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Equação 4}$$

Pelo qual, n é o número de elétrons do processo redox; A é a área eletroativa do ET (cm^2); D é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$); C é a concentração do analito (mol cm^{-3}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}).

Em caso de sistemas reversíveis o potencial de pico (E_p) é definido pela **Equação 5**, que estabelece a seguinte relação:

$$E_{p,rev} = E_{1/2} \pm \frac{1,1RT}{nF} \quad \text{Equação 5}$$

Pelo qual, o potencial de meia onda é definido pela **Equação 6**:

$$E_{1/2} = E^o + \frac{2,3RT}{nF} \log \left(\frac{D_{red}}{D_{ox}} \right)^{1/2} \quad \text{Equação 6}$$

Onde, $E_{p,ver}$ é o potencial de pico de um processo reversível (amperes); $E_{1/2}$ é o potencial de meia onda (V); n é o número de elétrons do processo redox; D_{red} é o coeficiente de difusão da espécie reduzida ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$); D_{ox} é o coeficiente de difusão da espécie oxidada ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$); R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); T é a temperatura termodinâmica (298,15 K) e F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}).

Em casos da transferência de elétrons ocorrerem de forma lenta, a reação redox do sistema químico é dito ser irreversível, visto que a razão de $i_{(p,a)} / i_{(p,c)} \neq 1,0$, próximo ao equilíbrio termodinâmico o processo redox reverso (no sistema redox irreversível) é inexistente. A relação de corrente de pico versus a velocidade de varredura segue a seguinte relação linear (vide **Equação 7**).

$$i_p = 2,99 \times 10^5 n A C^0 \alpha^{1/2} n'^{1/2} D^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 7}$$

Pelo qual, n é o número de elétrons do processo redox; n' é o número de elétrons transferidos na etapa determinante da reação; α é o coeficiente de transferência de carga; A é a área eletroativa do ET (cm^2); D é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$); C^0 é a concentração do analito (mol cm^{-3}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}).

Vale ressaltar a partir da **Equação 7** se o processo envolver um único elétron, ($n = n'$), haverá a condensação de n e n' para $n^{3/2}$ na equação proposta. Em caso de sistemas irreversíveis o potencial de pico (E_p) é definido pela **Equação 8**, que estabelece a relação linear:

$$E_{p,irr} = E_{1/2} \pm \frac{RT}{\alpha n F} \left[0,780 + \ln \left(\frac{D^{1/2}}{k_0} \right) + \ln \left(\frac{\alpha n F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad \text{Equação 8}$$

Onde, $E_{p,irrev}$ é o potencial de pico de um processo irreversível (amperes); $E_{1/2}$ é o potencial de meia onda (V); n é o número de elétrons do processo redox; D é o coeficiente de difusão do analito ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$); k_0 é a constante de velocidade específica

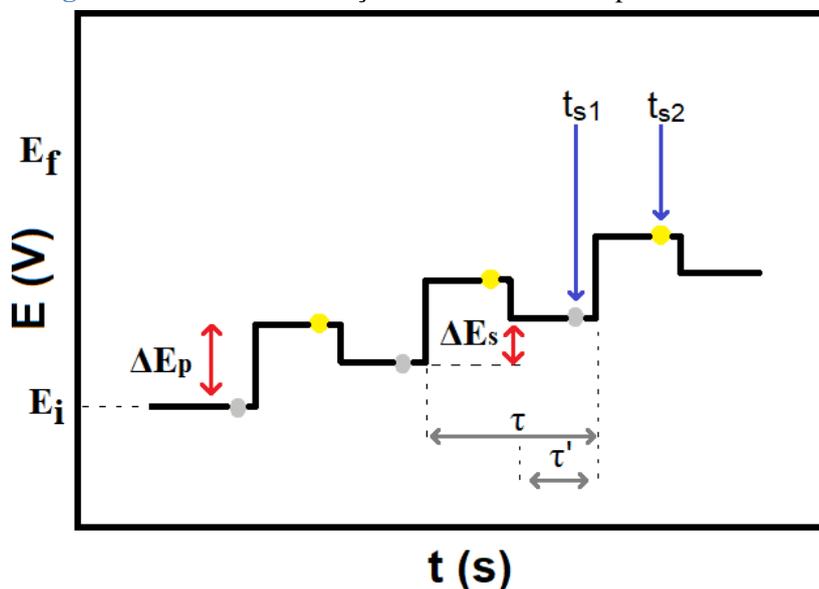
para o processo de oxidação; α é o coeficiente de transferência de carga e v é a velocidade de varredura;

A partir da **Equação 8**, em casos de haver processo de oxidação, o potencial de pico $E_{p,irr}$ se desloca para valores mais positivos de potencial, visto que há a contribuição positiva dos termos em colchetes em relação ao $E_{1/2}$. Se houver processo de redução o potencial de pico $E_{p,irr}$ se desloca para valores mais negativos de potencial, visto que há a contribuição negativa dos termos em colchetes em relação ao $E_{1/2}$.

2.5.3 Voltametria de Pulso Diferencial

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica voltamétrica que consiste de pulsos de potenciais sobrepostos em uma rampa de potencial crescente, adquirindo a forma de pulsos demonstrada na **Figura 14**. A VPD apresenta certas vantagens em relação a VC visto que é uma técnica mais sensível para análises quantitativas (Holler et al., 2009).

Figura 14 - Sinal de excitação na voltametria de pulso diferencial.

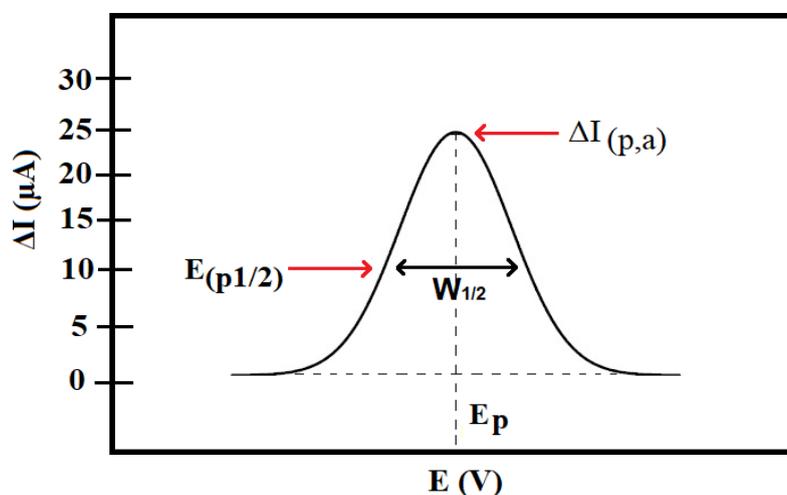


Na VPD, pulsos de potencial (ΔE_p) são aplicados em uma rampa de potencial com incremento na forma de escada (ΔE_s), esta técnica voltamétrica apresenta uma melhor sensibilidade em relação a VC, visto que as medidas diferenciais de corrente (Δi), é efetuada antes da aplicação do pulso de potencial (no tempo t_{s1}) e após a aplicação do pulso de potencial (no tempo t_{s2}) obtendo-se a diferença entre as duas

correntes. Pelo qual o tempo de pulso (tempo de modulação) corresponde a diferença $\tau - \tau'$. A medida diferencial de corrente na VPD reduz significativamente a contribuição da corrente capacitiva, aumentando a relação sinal – ruído.

O perfil voltamétrico na VPD se assemelha a uma gaussiana, visto que o voltamograma obtido é a diferença de corrente ($I_2 - I_1$) em função do potencial aplicado, o voltamograma de pulso diferencial típico apresenta ΔI_p que corresponde ao máximo de corrente, obtendo também informações acerca da largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) e do potencial de pico E_p , como mostrado na **Figura 15**.

Figura 15 – Voltamograma típico de pulso de diferencial



As **Equações 9** e **10** estabelece a relação entre a corrente medida (ΔI_p) e a amplitude de pulso (ΔE_p) na VDP, pelo qual n é o número de elétrons envolvidos no processo redox, F é a constante de Faraday, D é o coeficiente de difusão da espécie química ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), A é a área eletroativa do ET (cm^2), C é a concentração da espécie química (em mol L^{-1}) e $[\tau - \tau']$ é a diferença de tempo de pulso (em ms) (Holler et al.,2009).

$$\Delta I_p = \frac{nFA\sqrt{DC}}{\sqrt{\pi}\sqrt{(\tau-\tau')}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad \text{Equação 9}$$

$$\sigma = \exp\left(\frac{nF\Delta E_p}{2RT}\right) \quad \text{Equação 10}$$

A **Equação 11** estabelece a relação entre o potencial de pico (E_p) e a amplitude de pulso (ΔE_p) na VPD, pelo qual E^o é o potencial padrão do analito, R é a constante dos

gases, D_{Red} é o coeficiente de difusão da espécie reduzida e D_{Ox} é o coeficiente de difusão da espécie oxidada (Fatibello – Filho et al., 2023).

$$E_p = E^O + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_{Red}}{D_{Ox}} \right)^{1/2} - \frac{\Delta E_p}{2} \quad \text{Equação 11}$$

É possível determinar o valor de $W_{1/2}$ dos voltamogramas de pulso diferencial a partir da **Equação 12**, visto que a largura de pico depende do número de elétrons envolvidos durante o processo redox (Fatibello – Filho et al., 2022).

$$W_{1/2} = 3,52 \frac{RT}{nF} \quad \text{Equação 12}$$

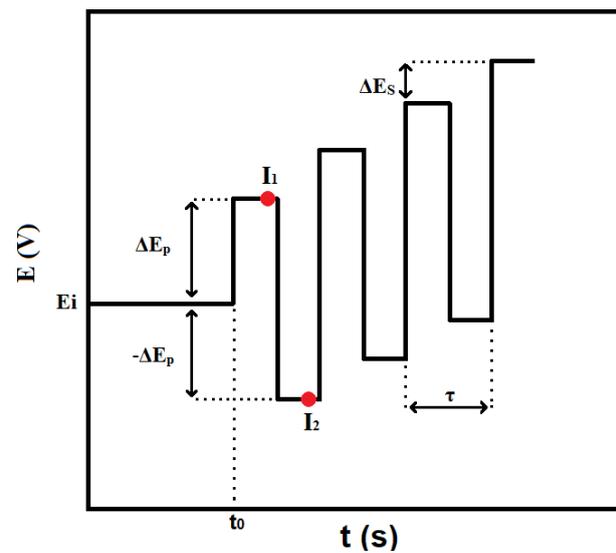
A VPD é uma técnica voltamétrica de grande aplicabilidade para análises quantitativas em sistemas reversíveis e irreversíveis, apresentando alta sensibilidade analítica para determinação de compostos orgânicos e inorgânicos em diversas matrizes, visto que a medida diferencial da corrente diminui consideravelmente a contribuição da corrente capacitiva para a medida do sinal analítico (Holler et al., 2009).

2.5.4 Voltametria de Onda Quadrada

A técnica de onda quadrada surgiu a partir dos estudos promissores desenvolvidos por Barker e Jenkins em 1952, obtendo resultados surpreendentes acerca da determinação de Tl^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e In^{3+} , obtendo limite de detecção na ordem de 10^{-7} mol L^{-1} , nesta técnica o baixo limite de detecção é obtido em virtude da diminuição da contribuição da corrente capacitiva nas medidas analíticas (Barker e Jenkins, 1952).

O sinal de excitação em voltametria de onda quadrada (VOQ) consiste numa onda quadrada, onde um potencial inicial (E_i) é aplicado constantemente até um tempo inicial (t_0), no tempo t_0 é aplicado um potencial de pulso direto de amplitude (ΔE_p) e um potencial de pulso reverso de amplitude ($-\Delta E_p$) onde é registrado a corrente I_1 e I_2 , onde ΔE_s é o incremento de potencial na forma de escada e τ é o período de tempo da escada de potencial, vide **Figura 16**.

Figura 16 – Sinal de excitação da Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)



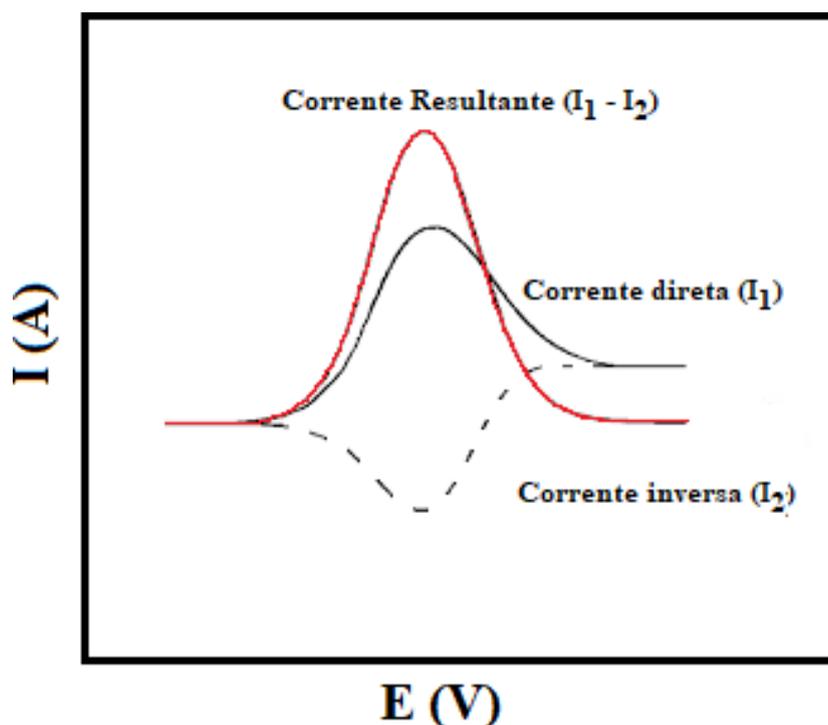
Pelo qual, a frequência dos pulsos de potencial é definida a partir da **Equação 13**, onde a frequência tem relação inversa ao período de tempo da escada de potencial (τ). Relacionando as grandezas ΔE_s e τ pode-se determinar a velocidade de varredura (ν) de um voltamograma de onda quadrada, como visto na **Equação 14** (Fatibello – Filho et al., 2022).

$$f = \frac{1}{\tau} \quad \text{Equação 13}$$

$$\nu = \frac{\Delta E_s}{\tau} \quad \text{Equação 14}$$

O perfil voltamétrico em VOQ é gaussiano e bem definido em casos de sistemas redox reversíveis, pois a corrente resultante (ΔI) é a contribuição da corrente direta (I_1) e da corrente inversa (I_2), sendo o sinal do voltamograma a soma das amplitudes das correntes ($\Delta I = I_1 - I_2$). A **Figura 17** ilustra um voltamograma típico em VOQ, considerando o caso de um processo redox reversível.

Figura 17 - Voltamograma de Onda quadrada típico de um processo reversível



Vale ressaltar que em sistemas redox (reversíveis e irreversíveis) o potencial de resposta do analito aumenta com o aumento da frequência (f) de pulso, obedecendo as seguintes relações matemáticas para sistemas reversíveis (**Equação 15**) e irreversíveis (**Equação 16**) (Fatibello – Filho et al., 2022).

$$\frac{\Delta E_p}{\Delta \log f} = \frac{2,303RT}{2nF} \quad \text{Equação 15}$$

$$\frac{\Delta E_p}{\Delta \log f} = \frac{2,303RT}{2\alpha nF} \quad \text{Equação 16}$$

Sendo R a constante dos gases ideais, F a constante de Faraday, n o número de elétrons envolvidos no processo redox e α o fator de transferência de elétrons. Em um sistema redox irreversível a corrente resultante tem a contribuição única e exclusiva da

corrente de capacitiva, visto que a corrente inversa corresponde somente a corrente capacitiva e aos ruídos de sinal referente ao processo redox do O₂.

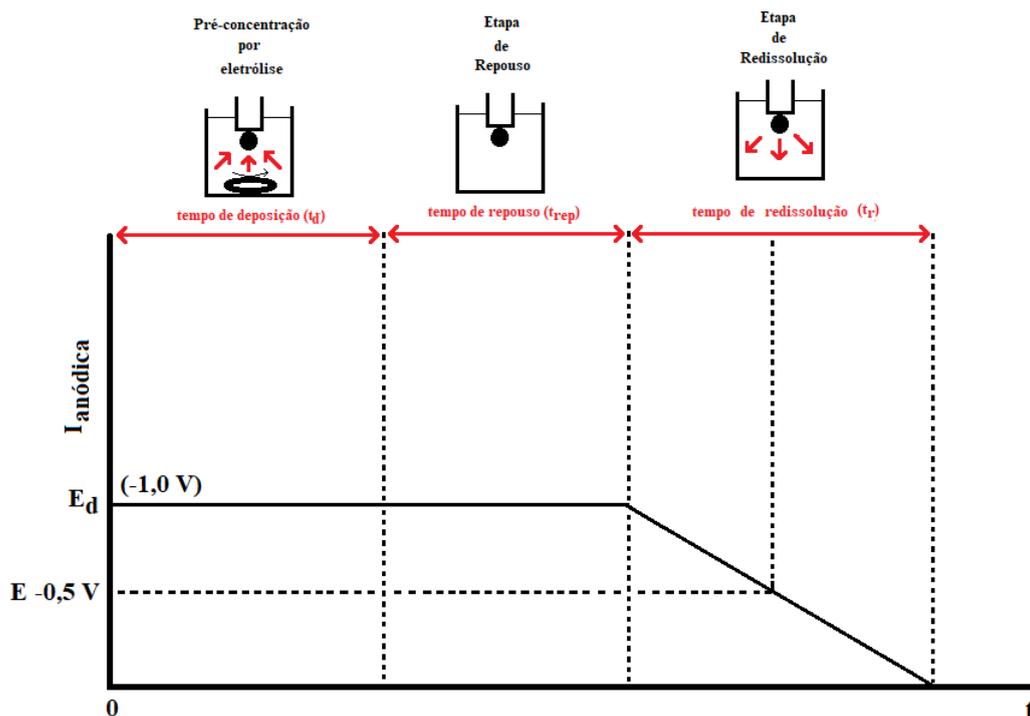
A VOQ associada a escolha de um bom eletrodo de trabalho pode vir a apresentar sensibilidade analítica próxima aos métodos cromatográficos, visto que durante as medidas de I_p versus E_p a corrente capacitiva é minimizada, estabelecendo o aumento da razão sinal-ruído.

2.5.5 Voltametria de Redissolução Anódica

Um método voltamétrico de redissolução consiste numa etapa de acumulação do analito na superfície do ET em determinado tempo de acumulação e depois a redissolução do analito de volta para a solução. A etapa de acumulação (denominada em literatura estrangeira de *stripping* voltamétrico) é realizada sob potencial controlado. Essa técnica é muito sensível e é muito empregada para análises que alcançam limites de detecção da ordem de 10^{-10} a 10^{-11} mol L⁻¹ (Holler et al., 2009).

Na voltametria de redissolução anódica (VRA), o analito é eletrodepositado no ET na etapa de pré-concentração, essa etapa consiste na aplicação de potencial controlado ao ET, permitindo uma deposição do analito na superfície eletroativa, a segunda etapa consiste no repouso do analito sob a superfície do eletrodo (geralmente 30 s) e a etapa final consiste na redissolução do analito reduzido de volta ao seio da solução, como ilustrado na **Figura 18** (Fatibello – Filho et al., 2022).

Figura 18 - Princípio da Voltametria de Redissolução Anódica (ASV)



Fonte: Fatibello – Filho et al., 2022

2.6 Estudos da arte

Alguns métodos de quantificação de NN estão sumarizados na [Tabela 1](#), demonstrando a predominância desses contaminantes em cosméticos, produtos de higiene pessoal, água potável, carnes processadas e em fármacos. Wang e colaboradores (2006) constataram a presença de NDMA e outras NN em amostras de xampu, espuma para banho e creme para pele usando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos. Ghassempour e colaboradores (2008) determinaram a presença de NDELA em amostras de xampu e sabonete líquido fazendo uso da cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis. Zhao e colaboradores (2006) quantificaram a presença de NDMA, NDEA e NDPA em amostras de água usando a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas. Herrmann e colaboradores (2015) determinaram a presença de NDMA e NDBA em amostras de carne processada usando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas. Parr e Joseph (2018) constataram a presença de NDMA e NDEA em amostras de medicamentos usando a cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massas. Lim e colaboradores (2020) determinaram a presença de NDMA e NDEA em fármacos sartanas, ranitina e metformina usando um método de extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Tabela 1 – Artigos publicados sobre a quantificação de N-nitrosaminas em diversas matrizes

Analito	Matriz	Técnica	Faixa linear (LD/LQ)	Autores
NDMA	Xampu, espuma para banho e creme para pele	HPLC - DAD	0,02 mg L ⁻¹ 0,06 mg L ⁻¹	Wang et al., 2006
NDELA	Xampu, sabonete líquido	HPLC – UV	0,01 µg mL ⁻¹ 0,03 µg mL ⁻¹	Ghassempour et al., 2008
NDMA NDEA NDPA	Água potável	HPLC – MS	0,2 – 10,6 ng L ⁻¹ 0,6 – 31,8 ng L ⁻¹	Zhao et al., 2006
NDBA NDMA	Carnes processadas	HPLC – MS	1,7 – 3,3 µg kg ⁻¹ 5,1 – 9,9 µg kg ⁻¹	Herrmann et al., 2015
NDMA NDEA	Fármacos	GC – MS	0,07 – 0,1 µg kg ⁻¹ 0,2 – 0,3 µg kg ⁻¹	Parr e Joseph, 2018
NDMA NDEA	Fármacos	SPE GC – MS	0,07 – 0,3 µg kg ⁻¹ 0,3 – 0,9 µg kg ⁻¹	Lim et al., 2020

N – Nitrosaminas: NDMA (N – nitrosodimetilamina), NDEA (N – nitrosodietilamina), NDPA (N – nitrosodipropilamina), NDBA (N – nitrosodibutilamina), NDELA (N – nitrosodietanolamina), LD: limite de detecção, LQ: limite de quantificação. Outras abreviações: HPLC-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos), HPLC-UV (cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis), HPLC-MS (cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas), GC-MS (cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massas), SPE GC – MS (extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas).



Capítulo 3
Experimental

3. EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q, condutividade de $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$). O padrão da N-nitrosodimetilamina (99% de pureza) foi adquirido da Sigma-Aldrich (USA).

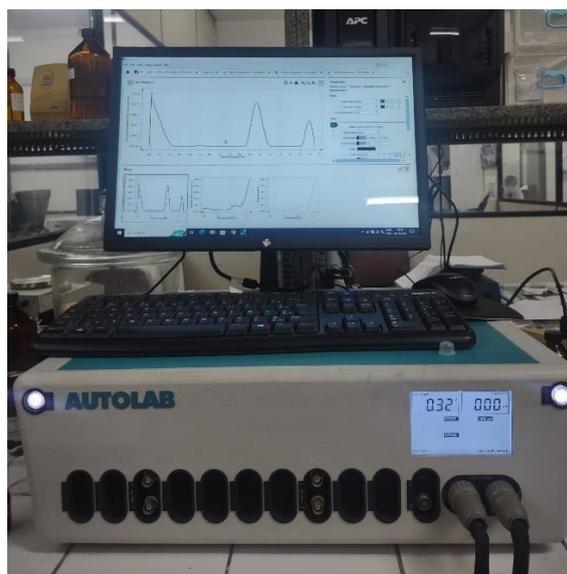
O estudo da área eletroativa do EDDB foi realizado usando a solução de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) adquirido da Ecibra (Brasil). As soluções tampão Britton-Robison ($3,5 \leq \text{pH} \leq 9,5$) foram preparados utilizando: ácido bórico (Sigma-Aldrich, USA), ácido acético (Neon, Brasil), ácido fosfórico (Chemis, Brasil) e hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich, USA).

As seguintes soluções estoques foram preparadas: $\text{K}_5[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (10 mmol L^{-1}) para o estudo da área eletroativa do EDDB, NDMA (10 mmol L^{-1}) para o estudo do comportamento eletroquímico e NDMA ($0,595 \text{ mmol L}^{-1}$) para curva de calibração, aplicação nas amostras e método de referência.

3.2 Instrumentação

O aparelho utilizado para a obtenção dos voltamogramas deste respectivo trabalho foi o potenciostato/galvanostato Eco Chemie Autolab (Modelo PGSTAT 302N). As aquisições dos dados voltamétricos foram realizadas utilizando o software da Metrohm® (Herisau, Suíça) denominado NOVA versão 2.1.3 (**Figura 19**).

Figura 19 - Potenciostato/Galvanostato Eco Chemie Autolab Modelo PGSTAT 302N



As medidas voltamétricas foram feitas em uma célula eletroquímica de capacidade máxima de 30 mL (Metrohm®, Inc., Suíça), um eletrodo de diamante dopado com boro modelo D-311x-As (Windsorscientific, Reino Unido) como eletrodo de trabalho (diâmetro de 0,2 cm e área de 0,03142 cm²), um eletrodo de prata / cloreto de prata (Ag/AgCl) como eletrodo de referência e um bastão de platina (Pt) como eletrodo auxiliar (Metrohm®, Inc., Suíça).

Os experimentos cromatográficos foram realizados utilizando a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando um cromatógrafo modelo Ultimate 3000 (ThermoFisher Scientific, USA) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (CLAE–DAD), utilizando uma coluna C₁₈ de fase reversa Acclaim™ (ThermoFisher Scientific, USA) de tamanho de partícula de 5 µm e dimensão 4,6 x 150 mm (Figura 20).

Figura 20 – Cromatógrafo ThermoFisher Scientific modelo Ultimate 3000



A técnica utilizada foi baseada em um método de referência da *Agence National de Sécurité du Médicament* do governo da França (ANSM, 2023). A fase móvel foi constituída de metanol/água (35:65, v/v) por eluição isocrática, sendo usada soluções padrão da NDMA numa faixa de concentração de 250 – 2500 nmol L⁻¹. A absorvância do analito foi verificada em 228 nm e o volume do padrão injetado na coluna cromatográfica foi de 50 µL.

Para o preparo e solubilização das amostras foi utilizado uma centrífuga modelo Z 206 A (Hermle, Alemanha), vide **Figura 21**. E um ultrassom modelo USC 3300 (Ultronic Unique, Brasil) vide **Figura 22**.

Figura 21 – Centrífuga Hermle modelo Z 206 A



Figura 22 – Ultrassom Ultronic Unique modelo USC 3300



3.3 Parâmetros instrumentais das medidas voltamétricas

Os seguintes parâmetros voltamétricos foram utilizados: velocidade de varredura (v) de 100 mV s^{-1} e incremento de potencial de 5 mV (ΔE_s) na VC; amplitude de pulso (ΔE_p) de 50 mV , largura de pulso (ΔE_t) de 50 mV e velocidade de varredura (v) de 5 mV s^{-1} para VPD; amplitude de pulso (ΔE_p) de 70 mV , incremento de potencial (ΔE_s) de 5 mV e frequência (f) de 15 Hz para VOQ.

3.4 Tratamento dos dados voltamétricos

Os voltamogramas foram suavizados através do método de suavização por polinômio móvel usando a função *Savitsky-Golay* (*Smooth Level 4*), com intuito de eliminar o ruído instrumental. Sendo posteriormente efetuada a correção da linha de base usando a função *moving average* com *step window* de 2 mV utilizando o *software* ANOVA versão 2.3.1. Valendo destacar que esse tratamento matemático é necessário para uma melhor identificação dos sinais voltamétricos.

3.5 Preparação do EDDB

O preparo do EDDB foi realizado a partir da metodologia desenvolvida por Oliveira e colaboradores (2007), o método de limpeza consiste no condicionamento do eletrodo em uma solução de 0,5 mol L⁻¹ de H₂SO₄, realizando a aplicação de potencial de -3,0 V (condicionamento catódico) durante 15 minutos e + 3,0 V (condicionamento anódico) durante mais 15 minutos, após essa etapa foi realizada a estabilização do EDDB em solução tampão BR (pH 7,0) utilizando a técnica da voltametria cíclica (VC) sendo realizadas 100 varreduras consecutivas, numa faixa de trabalho de +1,0 a +2,5 V e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

3.6 Estudo da área eletroativa do EDDB

As medidas foram realizadas com diluição de 3,0 mL de 1,0 mmol L⁻¹ ferrocianeto de potássio diretamente na célula eletroquímica contendo 20 mL de 0,5 mol L⁻¹ de H₂SO₄. Foi empregada a voltametria cíclica (VC), com os parâmetros pré-definidos (apresentados no item 3.3) em janela de potencial de -0,2 a +1,1 V vs. Ag/AgCl, sendo realizadas 10 medidas individuais com velocidade de varredura de 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 750 e 1000 mV s⁻¹ respectivamente.

3.7 Comportamento eletroquímico da NDMA

Para este estudo foi realizado a diluição de 200 uL de 10 mmol L⁻¹ de NDMA em 20 mL de tampão Britton-Robison pH 7,0. Primeiramente foi empregado a voltametria de pulso diferencial (VPD), com os parâmetros (apresentados no item 3.3) com faixa de potencial de +1,0 a +2,5 V. Com a mesma solução estoque foi realizado o estudo com o emprego da técnica da voltametria de onda quadrada (VOQ), com os parâmetros (apresentados no item 3.3) com faixa de potencial de +1,0 a +2,5 V.

Utilizando a VPD e a VOQ foi realizado 4 varreduras consecutivas, com intuito de estudar o efeito de saturação da superfície do EDDB durante as medidas voltamétricas.

3.8 Estudo de pH

O estudo de pH foi realizado utilizando a VOQ, com os parâmetros (apresentados no item 3.3), primeiramente realizando a diluição de 200 μL de 10 mmol L^{-1} de NDMA em 20 mL de tampão Britton-Robison, nos respectivos tampões: BR pH 3,5; BR pH 4,5; BR pH 6,0; BR pH 7,0; BR pH 8,5 e BR pH 9,5. Esse estudo é importante para constatar o melhor pH para as medidas voltamétricas.

3.9 Estudo dos parâmetros

O estudo dos parâmetros voltamétricos foi realizado a partir da técnica da VOQ, fazendo a diluição de 200 μL de 10 mmol L^{-1} de NDMA em 20 mL de tampão BR pH 7,0, utilizando os seguintes parâmetros voltamétricos: a) frequência de 15, 25, 50, 75 e 100 Hz; b) incremento de 1, 3, 5, 7 e 10 mV; c) amplitude de 10, 30, 50, 70 e 100 mV. Com o objetivo de constatar a melhor condição voltamétrica para determinação de NDMA usando a técnica da VOQ.

3.10 Estudo da velocidade de varredura NDMA

Nesse estudo foi empregado a técnica da voltametria cíclica (VC), fazendo a diluição de 500 μL de 10 mmol L^{-1} de NDMA em 5 mL de tampão BR pH 7,0, utilizando os seguintes parâmetros voltamétricos: Janela de potencial de +1,0 a 2,5 V, incremento de 2,5 mV, velocidade de varredura de 10, 25, 50, 75, 100, 200 e 300 mVs^{-1} . Esse estudo é importante para descrever a natureza do transporte de massa do analito na interface eletrodo/solução.

3.11 *Stripping* voltamétrico

Esse estudo foi realizado utilizando a técnica VOQ, fazendo a diluição de 200 μL de 1,0 mmol L^{-1} de NDMA em 20 mL de tampão BR pH 7,0, utilizando os seguintes parâmetros voltamétricos: frequência de 15 Hz, incremento de potencial de 5 mV e amplitude de potencial de 70 mV. O estudo do *stripping* anódico consistiu na aplicação de potencial de -1,45 V a -1,75 V durante 30 s antes da realização das medidas na VOQ. O *stripping* voltamétrico possibilita um aumento na sensibilidade do sinal voltamétrico, garantindo trabalhar com a NDMA em baixos níveis de concentração.

Em seguida foi realizado um estudo de pré-concentração usando a técnica da VOQ, fazendo a diluição de 100 μL de 1,0 mmol L^{-1} de NDMA em 20 mL de tampão BR pH 7,0, utilizando os seguintes parâmetros voltamétricos: *stripping* anódico de $-1,7$ V por 30 s, frequência de 15 Hz, incremento de potencial de 5 mV e amplitude de potencial de 70 mV. Antes das medidas voltamétricas, foi utilizado os seguintes tempos de agitação (t_R): 0, 5, 10 e 15 s.

3.12 Curva analítica

Para a construção da curva analítica foi utilizado a técnica da VOQ, fazendo a diluição de 4,2 μL de 0,595 mmol L^{-1} de NDMA em 10 mL de tampão BR pH 7,0, com uma faixa de concentração de 250 – 2500 nmol L^{-1} , utilizando os seguintes parâmetros voltamétricos: *stripping* anódico de $-1,7$ V por 30 s, tempo de agitação de 15 s, frequência de 15 Hz, incremento de potencial de 5 mV e amplitude de potencial de 70 mV.

3.13 Limites de detecção e quantificação

A partir dos voltamogramas obtidos das medidas dos brancos usando a VOQ, foi possível estimar os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), com intuito de desenvolver uma metodologia eletroanalítica robusta para determinação de NDMA em amostras de medicamentos. O LD é definido como a menor concentração analítica que pode ser detectado pelo sensor utilizado, sendo este valor 3 vezes maior ao nível do ruído instrumental das medidas voltamétricas e o limite de quantificação é a menor concentração do analito do analito que pode ser determinada, apresentando exatidão e precisão aceitáveis (Moak et al., 1997). As **Equações 17** e **18** demonstram como é realizado o cálculo de LD e LQ respectivamente.

$$LD = \frac{3S_b}{b} \quad \text{Equação 17}$$

$$LQ = \frac{10S_b}{b} \quad \text{Equação 18}$$

S_b é o desvio padrão amostral obtido das medidas dos brancos e b é o coeficiente angular da curva analítica que descreve a inclinação em um nível de confiança de 95 %.

3.14 Preparo das amostras de medicamentos para voltametria

Foi realizado o preparo de 5 amostras de medicamentos, 3 losartanas (A₁, A₂, B) e 2 olmesartanas (C, D) de diferentes marcas e lotes de fabricação. Para as amostras A₁ e A₂ (losartanas de mesmo fabricante e lote distinto) 100 mg de comprimidos foram macerados e diluídos em 5 mL de tampão BR pH 7,0. Para a amostra B (losartana de fabricante distinto e lote distinto) 250 mg de comprimido foram diluídos em 5 mL de tampão BR pH 7,0. Para as amostras C e D (olmesartana de fabricante distinto e lote distinto) 100 mg de comprimidos foram macerados e diluídos em 5 mL de tampão BR pH 7,0. Posteriormente as amostras foram filtradas com uso de filtro seringa PTFE de 0,45 µm e depois armazenadas em frasco âmbar a 5 °C no refrigerador.

Exatamente 5 mL de cada amostra filtrada foram adicionadas na cela voltamétrica, onde foi realizada a medida voltamétrica utilizando a VOQ, utilizando os seguintes parâmetros voltamétricos: *stripping* anódico de - 1,7 V por 30 s, tempo de repouso de 15 s, frequência de 15 Hz, incremento de potencial de 5 mV e amplitude de potencial de 70 mV. Após a medida do sinal das amostras foi realizado a adição do padrão da NDMA, consistindo em alíquotas de 4,2, 6,3, 8,4 e 12,6 µL de 0,595 mmol L⁻¹ de NDMA em 5 mL da amostra. Cada alíquota do padrão adicionado corresponde a 500, 750, 1000 e 1500 nmol L⁻¹ de NDMA.

3.15 Preparo das amostras de medicamentos para cromatografia

O método de referência foi realizado usando a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência com um detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) utilizando os parâmetros voltamétricos especificados no item 3.2 do referido capítulo. Os cromatogramas referentes a curva analítica (n = 7) foi traçado numa faixa de concentração de 250 a 2500 nM da NDMA em triplicata.

As amostras foram preparadas da seguinte forma: 1) losartanas: 250 mg do comprimido foram macerados e transferidos para um tubo de centrífuga, pelo qual foi adicionado 5 mL do solvente metanol/água (35:65 % v/v), que foi sonicada em ultrassom durante 5 minutos, após isso a amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi filtrado e armazenado num frasco de 5 mL e levados para refrigeração a 5 °C. E por fim as amostras foram injetadas no instrumento para obtenção dos cromatogramas. Para o cálculo de quantificação da NDMA presente em cada amostra, foi considerando a área do sinal cromatográfico e a equação linear da curva analítica.



Capítulo 4

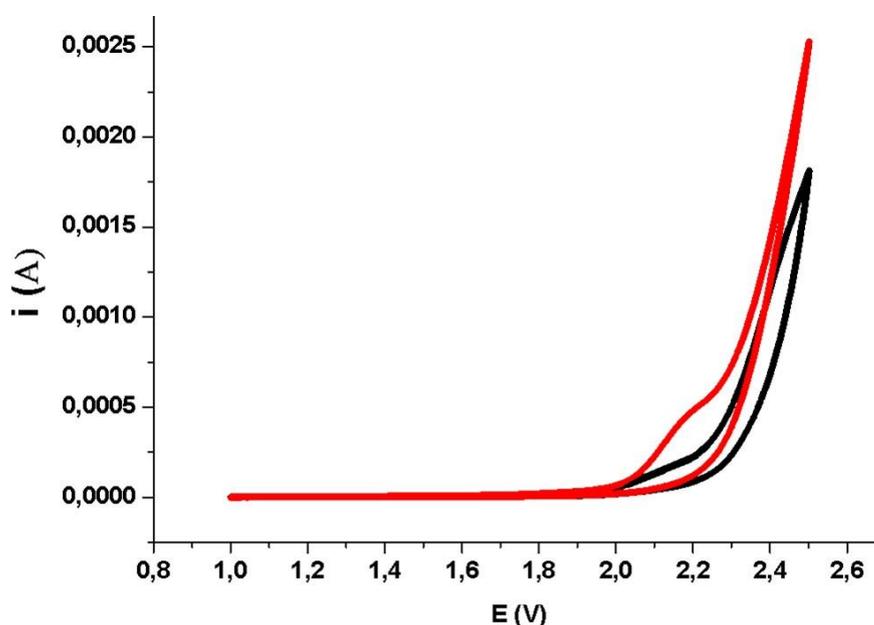
Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento eletroquímico da NDMA

Como mostrado na **Figura 23**, foi registrado um voltamograma cíclico do analito em uma janela de potencial de +1,0 a +2,5 V e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , sendo notado um único perfil de oxidação em torno de +2,1 V quando há uma varredura anódica (varredura de potencial de +1,0 V a +2,5 V) de potencial, enquanto na direção catódica (varredura de potencial de +2,5 V a +1,0 V) não há o surgimento de sinal de redução, indicando que há somente o processo de oxidação da NDMA sob a superfície eletroativa do EDDB nas condições mencionadas.

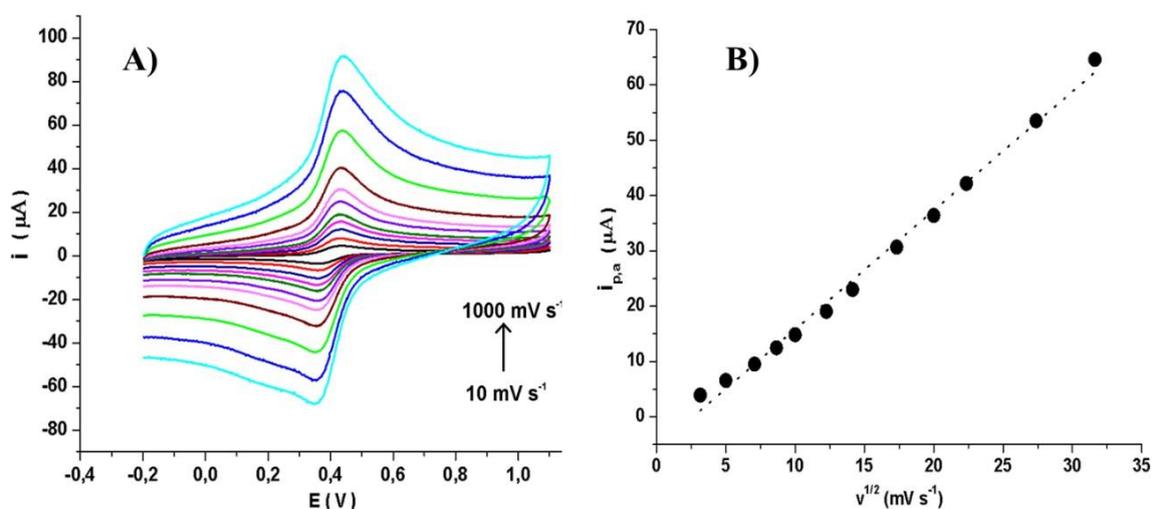
Figura 23 – Voltamograma cíclico de 1,0 mmol L^{-1} da NDMA



4.2 Voltametria cíclica (VC)

Inicialmente foi realizado o estudo da área eletroativa do EDDB a partir de voltamogramas cíclicos com a velocidade de varredura de 10 – 1000 mV s^{-1} , como pode ser visto na **Figura 24** há um aumento linear na corrente de pico de oxidação e redução do par $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$, pois há um sinal anódico em torno de +0,43 V para o processo de oxidação (perda de elétrons) do Fe^{2+} para o Fe^{3+} e um sinal catódico em torno de +0,37 V para o processo de redução (ganho de elétrons) do Fe^{3+} para o Fe^{2+} (Salazar-Banda, 2006).

Figura 24 – A) Voltamogramas cíclicos do par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$; B) Relação $I_{p,a}$ versus $v^{1/2}$



Como pode ser visto na **Tabela 2** para cada velocidade de varredura a razão da corrente de pico anódica em relação a corrente de pico catódica é próxima a unidade, indicando a reversibilidade do par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$.

Tabela 2 – Valores de corrente de pico anódica e catódica para o par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$

Velocidade de Varredura (mV s^{-1})	$I_{p,a}$ (A)	$I_{p,c}$ (A)	$ I_{p,a} / I_{p,c} $
10	$3,93 \times 10^{-6}$	$-3,70 \times 10^{-6}$	1,06
25	$6,60 \times 10^{-6}$	$-6,31 \times 10^{-6}$	1,05
50	$9,52 \times 10^{-6}$	$-9,44 \times 10^{-6}$	1,01
75	$1,25 \times 10^{-5}$	$-1,18 \times 10^{-5}$	1,06
100	$1,49 \times 10^{-5}$	$-1,41 \times 10^{-5}$	1,06
150	$1,91 \times 10^{-5}$	$-1,74 \times 10^{-5}$	1,10
200	$2,30 \times 10^{-5}$	$-2,03 \times 10^{-5}$	1,13
300	$3,07 \times 10^{-5}$	$-2,61 \times 10^{-5}$	1,18
400	$3,64 \times 10^{-5}$	$-3,03 \times 10^{-5}$	1,20
500	$4,22 \times 10^{-5}$	$-3,44 \times 10^{-5}$	1,23
750	$5,35 \times 10^{-5}$	$-4,31 \times 10^{-5}$	1,24
1000	$6,46 \times 10^{-5}$	$-4,98 \times 10^{-5}$	1,30

Plotando um gráfico de $I_{p,a}$ versus $v^{1/2}$ obtém-se uma relação linear, com uma equação $y = 0,000002x + 0,000006$. Baseado na equação de Randles-Ševčík, (**Equação 4**).

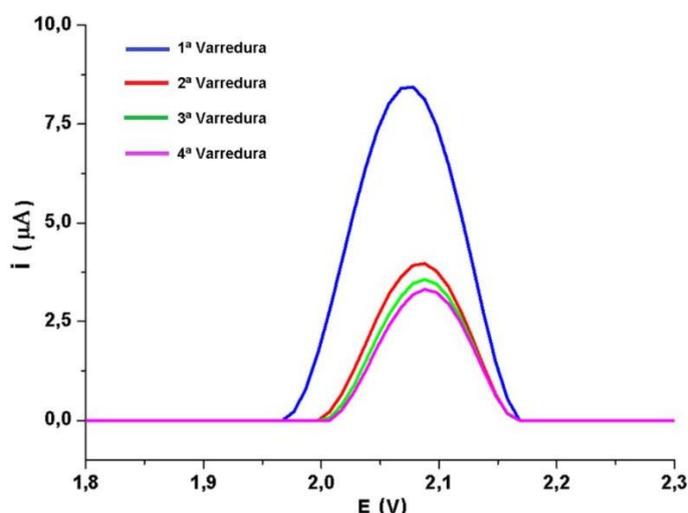
Conhecendo que A é a área eletroativa do eletrodo EDDB (cm^2); n é o número de elétrons; D_0 é o coeficiente de difusão; C é a concentração da espécie oxidada na solução (mol mL^{-1}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}). Considerando o coeficiente angular da curva ($2,0 \times 10^{-6}$), que corresponde ao produto de $2,69 \times 10^5 n^{3/2} D^{1/2} AC$ e conhecendo os respectivos valores de $D = 7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $C = 1,3043 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-3}$, obteve-se o valor de $0,021026 \text{ cm}^2$ da área eletroativa (A) do EDDB. Considerando que a área do EDDB é igual $0,03146 \text{ cm}^2$, temos que a área eletroativa é correspondentemente igual a 66,93 % da área equivalente, indicando que o EDDB está operando em boas condições.

4.3 Voltametria de pulso diferencial (VPD)

Foi realizado um estudo conduzido em VPD para estudar o sinal analítico de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NDMA em tampão BR pH 7,0 com os seguintes parâmetros instrumentais: amplitude de pulso (ΔE_p) de 50 mV e largura de pulso (ΔE_t) de 50 mV realizando 4 varreduras consecutivas. Sendo notado uma supressão do sinal voltamétrico após a primeira varredura, demonstrando que há a adsorção dos produtos da espécie química formada do processo de oxidação da NDMA sob a superfície eletroativa do EDDB. O sinal analítico de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NDMA em tampão BR pH 7 foi registrado em torno de +2,09 V, como pode ser visto na **Figura 25**. Sugerindo que há adsorção dos produtos do processo de oxidação da NDMA na superfície eletroativa do EDDB.

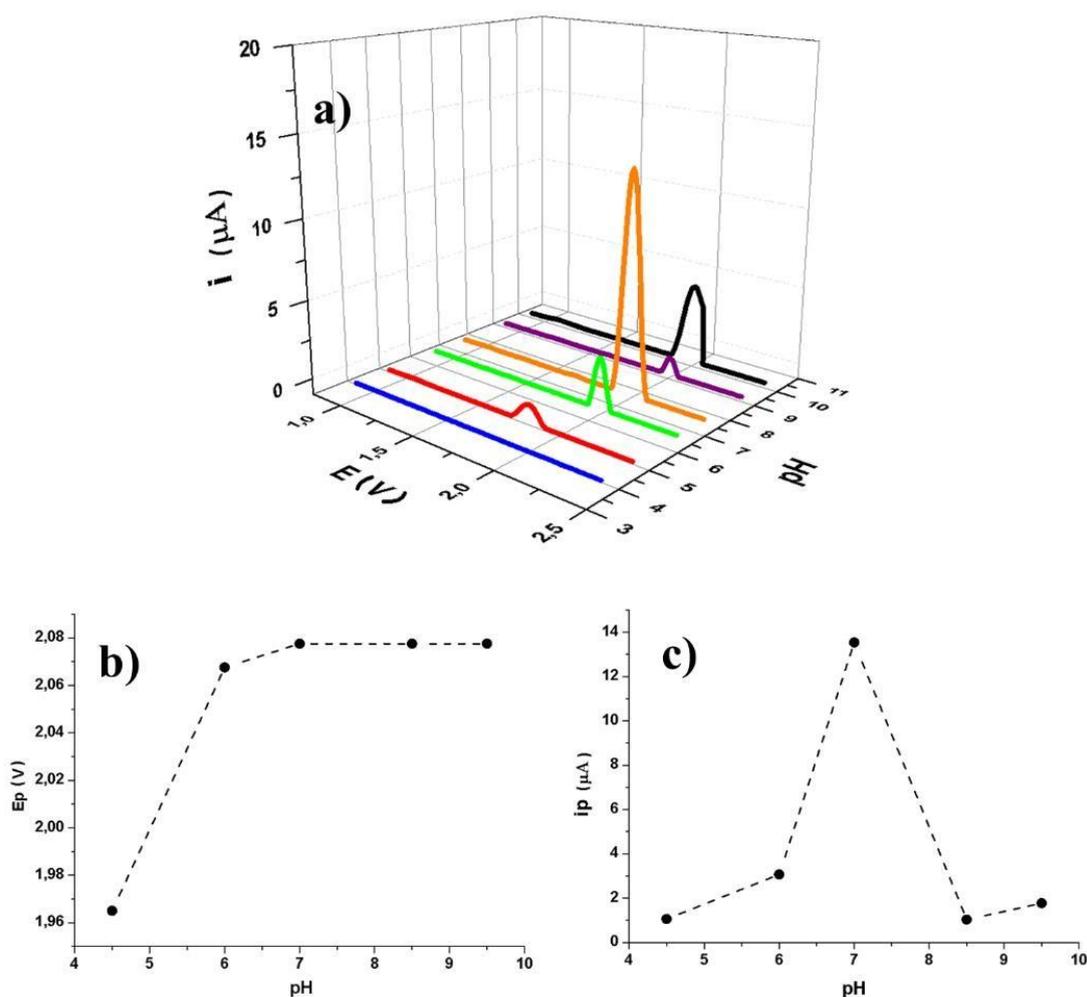
Figura 25 – Voltamogramas de pulso diferencial da NDMA em tampão BR pH 7,0: 1ª

Varredura (—), 2ª Varredura (—), 3ª Varredura (—) e 4ª Varredura (—)



Posteriormente foi realizado um estudo de pH de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NDMA utilizando a VPD em tampão BR com a faixa de pH entre 4,5 e 9,5 (vide **Figura 26a**). Para esse estudo foi plotado a relação entre o potencial de pico $E_{p,a}$ versus pH (vide **Figura 26b**) e a relação $I_{p,a}$ versus pH (vide **Figura 26c**) para investigar o melhor pH para as medidas voltamétricas. O aumento de pH promove a mudança no sinal analítico da NDMA, em condição ácida (pH 4,5) o potencial de pico anódico é próximo de +1,97 V, conforme há o aumento do pH (pH > 5,0) o potencial de pico anódico aumenta e se mantém em torno de +2,0 V. Em relação a corrente de pico é visto na **Figura 26c** que o melhor sinal analito é obtido em condição de pH neutro. Pois em condições ácidas (pH < 7,0) e condição alcalina (pH > 7,0) a resposta voltamétrica não é a mais adequada. Sendo assim o pH ótimo para determinação da NDMA usando VPD foi no tampão BR pH 7.

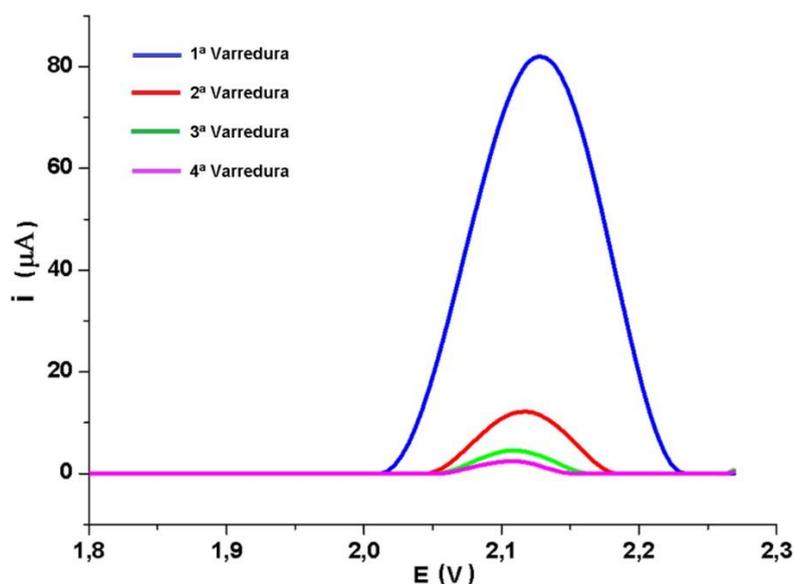
Figura 26 – a) Voltamogramas de pulso diferencial em tampão BR; b) relação $E_{p,a}$ versus pH; c) $i_{p,a}$ versus pH



4.4 Voltametria de onda quadrada (VOQ)

Foi realizado um estudo conduzido em VOQ de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NDMA em tampão BR pH 7,0 com os seguintes parâmetros instrumentais: amplitude de pulso (ΔE_p) de 50 mV, incremento (ΔE_s) de 5 mV e frequência (f) de 50 Hz, realizando 4 varreduras consecutivas. Após a primeira varredura há uma supressão do sinal voltamétrico demonstrando que há a adsorção do produto de oxidação da espécie química sob a superfície eletroativa do EDDB. O sinal analítico de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NDMA em tampão BR pH 7 foi registrado em torno de +2,12 V, como pode ser visto na **Figura 27**.

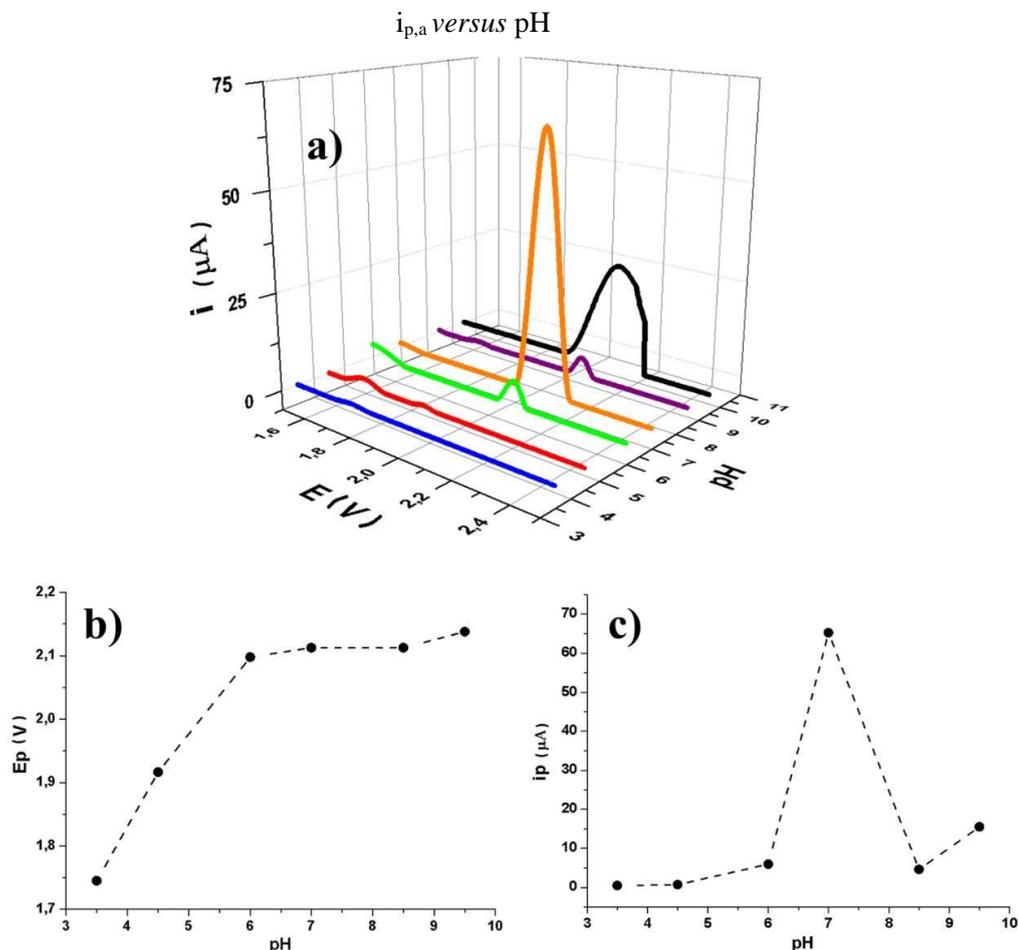
Figura 27 – Voltamogramas de onda quadrada da NDMA em tampão BR pH 7,0: 1ª varredura (—), 2ª varredura (—), 3ª varredura (—) e 4ª varredura (—)



Posteriormente foi realizado um estudo de pH de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NDMA utilizando a VOQ em tampão BR com a faixa de pH entre 3,5 e 9,5 (vide **Figura 28a**). Para esse estudo foi plotado a relação entre o potencial de pico $E_{p,a}$ versus pH (vide **Figura 28b**) e a relação $I_{p,a}$ versus pH (vide **Figura 28c**) para investigação do melhor pH para as medidas voltamétricas. O aumento de pH promove a mudança no sinal analítico, em condição ácida (pH 3,5) o potencial de pico anódico é próximo de +1,75 V, conforme há a alcalinização do meio (pH > 5) o potencial de pico anódico se desloca para uma região mais positiva e se mantém em torno de +2,0 V. Em relação a corrente de pico é visto na **Figura 28c** que o melhor sinal analítico é obtido em condição de pH neutro (pH 7,0).

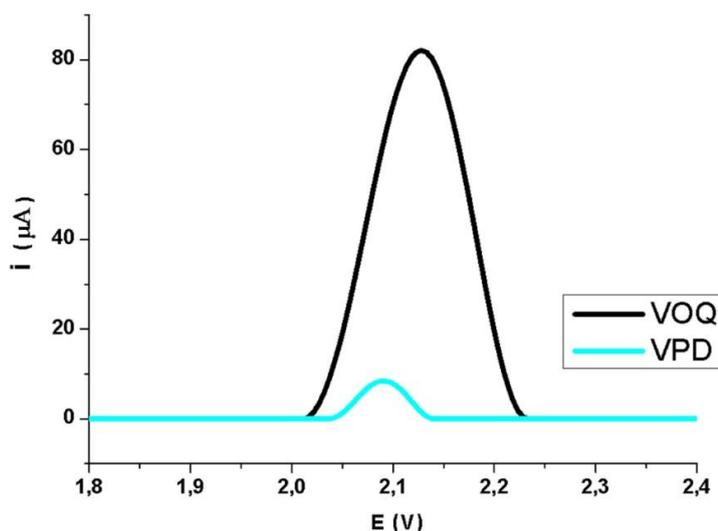
A NDMA apresenta $pK_a = 3,52$, justificando a mudança do potencial de resposta (E_p) em função do pH, pois em meio ácido há a protonação do grupo amino da NDMA.

Figura 28 – a) Voltamogramas de onda quadrada em tampão BR; b) relação $E_{p,a}$ versus pH; c)



Na escolha da técnica mais sensível para o desenvolvimento do método voltamétrico, se fez necessário um estudo comparativo dos voltamogramas da técnica de VPD e VOQ, pelo qual (vide **Figura 29**) o melhor sinal voltamétrico é obtido usando a técnica da VOQ. Na VPD obtém-se um sinal analítico de aproximadamente 10 μA , enquanto na VOQ obtém-se um sinal analítico de aproximadamente 80 μA , constatando um sinal 8 vezes maior em termos de sensibilidade. Sendo assim, a quantificação do analito foi realizado empregando a técnica da VOQ.

Figura 29 – Estudo comparativo da determinação de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NDMA em tampão Britton-Robison pH 7 na VPD (—) e VOQ (—)



4.5 Mecanismo de oxidação e a natureza do transporte de massa da NDMA

O número de prótons e elétrons envolvidos no processo redox da NDMA foi calculado a partir do estudo de pH (VPD) e do estudo de frequência (VOQ), utilizando as **Equações 12** e **16** para o cálculo do número de elétrons, sendo considerada a largura de pico ($W_{1/2}$) de cada voltamograma utilizando os dados obtidos do estudo de pH utilizando a técnica VPD (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Valores de $W_{1/2}$ no estudo de pH empregando a VPD

pH	$W_{1/2}$ (mV)
4,5	59,9
6,0	37,9
7,0	52,5
8,5	22,6
9,5	48,9

Calculando a média de $W_{1/2}$ (correspondendo a 44,3 mV) e substituindo as constantes da **Equação 12**, obtêm-se a seguinte relação matemática:

$$W_{1/2} = \frac{90 \text{ mV}}{n} \quad \text{Equação 19}$$

Pelo qual substituindo o valor médio de $W_{1/2}$ na **Equação 19** obtém-se $n = 2,0$, constatando que para a NDMA dois elétrons estão envolvidos no processo de oxidação, resultado este concordante com os dados da literatura referente ao estudo do mecanismo da reação eletroquímica da NDMA (Chaplin et al., 2009)

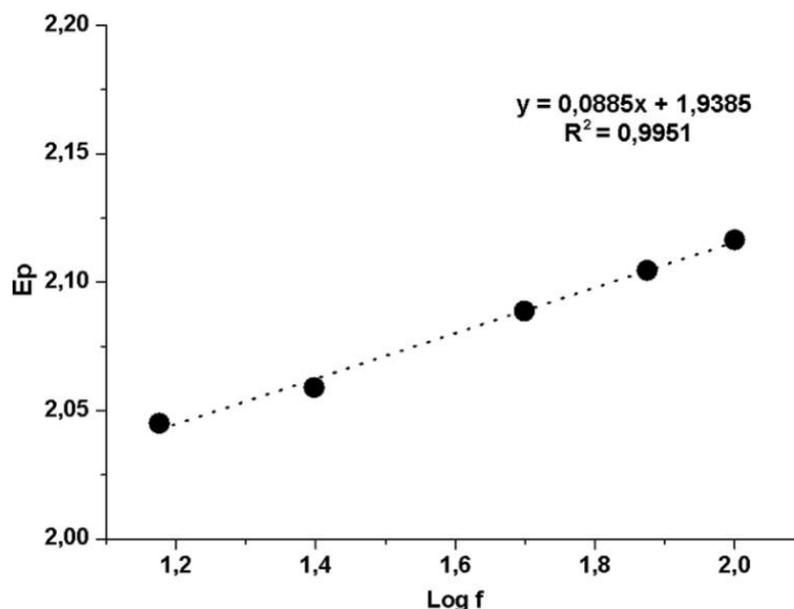
Para o estudo do número de prótons foi utilizado a técnica de VOQ, a partir da relação entre a frequência de pulso (f) e o pH de interesse. Primeiramente foi determinado o fator αn que é calculado para sistemas irreversíveis (como é observado para NDMA). Na **Tabela 4** consta os valores de potencial de pico para diferentes valores de frequência de pulso.

Tabela 4 – Valores de E_p (V) em função de $\log f$ (em Hertz)

E_p (V)	f (Hz)	$\log f$
2,0451	15	1,18
2,059	25	1,40
2,0888	50	1,70
2,1046	75	1,88
2,1165	100	2,00

Plotando o gráfico de E_p em função de $\log f$ obtém-se a relação linear mostrada na **Figura 30**, com coeficiente angular b de 0,0885. A partir da **Equação 16** e substituindo suas constantes experimentais, obtém-se a **Equação 20** que é utilizada para o cálculo de αn .

Figura 30 – Relação E_p versus $\log f$ usando a VOQ



$$\frac{E_p}{\log f} = \frac{0,0592 \text{ (mV)}}{2\alpha n} \quad \text{Equação 20}$$

Obtendo o valor de $\alpha n = 1,337$, que foi utilizado para o cálculo do número de prótons (+H), utilizando a relação de E_p em função do pH da VOQ (vide [Tabela 5](#)).

Tabela 5 – Relação E_p versus pH usando a VOQ

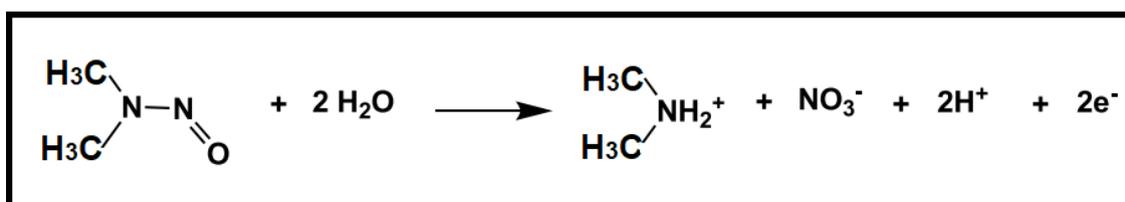
pH	E_p
3,5	1,7452
4,5	1,9164
6	2,0977
7	2,1128
8,5	2,1128
9,5	2,1380

A partir do coeficiente angular obtido da relação E_p versus pH correspondendo a 0,0736 V e substituindo na [Equação 21](#) a seguir:

$$\frac{E_p}{pH} = 0,0592 \frac{H^+}{\alpha n} \quad \text{Equação 21}$$

Foi possível calcular o número de prótons envolvidos no processo eletroquímico da NDMA, sendo determinado que há aproximadamente 2 prótons envolvido no processo redox. O mecanismo proposto para a NDMA pode ser visto a seguir ([Figura 31](#)), pelo qual dois elétrons e dois prótons estão envolvidos na reação redox para a NDMA, sendo formado a dimetilamina protonada e o íon nitrato. Resultado concordante com o estudo do mecanismo da reação de oxidação da NDMA (Chaplin et al., 2009).

Figura 31 – Mecanismo provável para reação de oxidação da NDMA



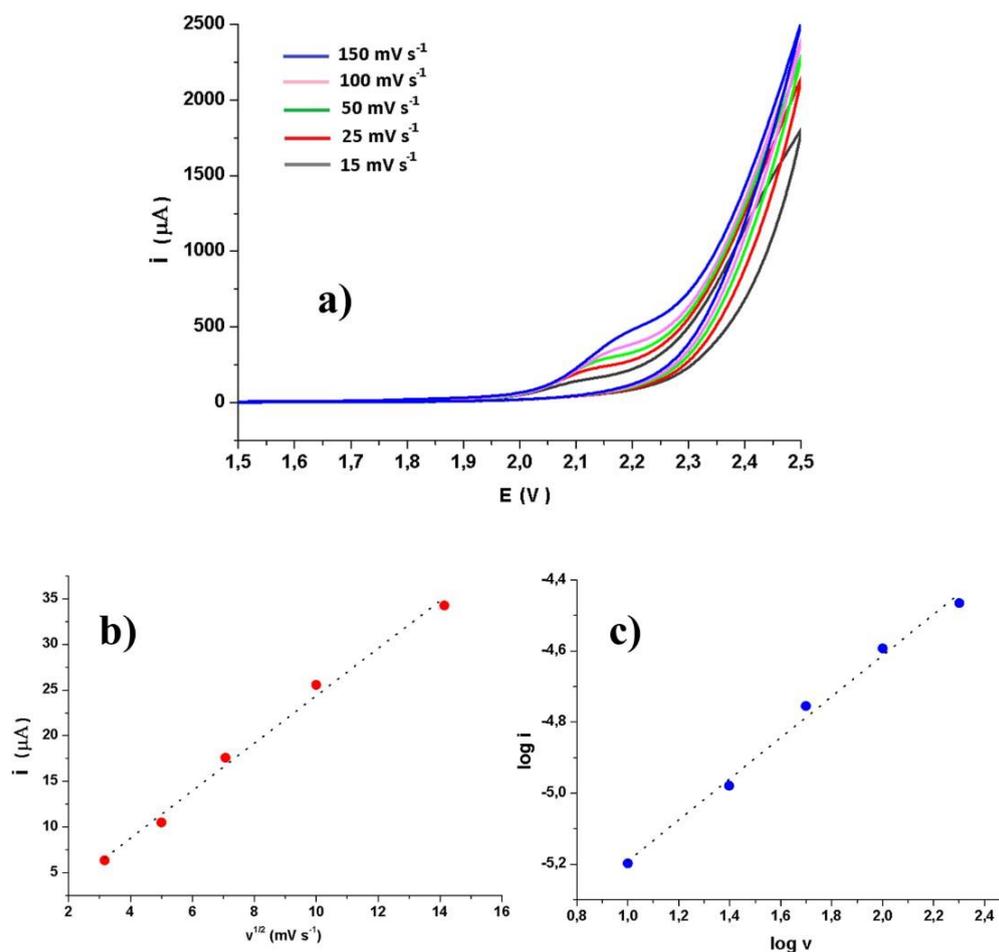
Fonte: Chaplin et al., 2009

A natureza do transporte de massa foi estudada utilizando a técnica da VC, com a velocidade de varredura de 15 – 150 mV s⁻¹ com janela de potencial de +1,0 a +2,5 V *versus* Ag/AgCl e incremento de potencial de 2,5 mV em tampão BR pH 7,0. A NDMA apresentou um perfil de oxidação (E_p) em torno +2,1 V, apresentando uma eletroquímica irreversível, visto que perfis de redução são inexistentes.

A **Figura 32a** mostra os voltamogramas cíclicos correspondentes para o estudo da influência da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica da NDMA em relação ao EDDB, a partir da relação I_p vs v^{1/2} observou-se um perfil linear (**Figura 32b**), indicando que o processo de transferência de massa da NDMA na interface eletrodo-solução é governado estritamente por difusão. Relacionando log I_p vs log v (**Figura 32c**), obtém-se o coeficiente angular da expressão matemática (y = 0,5787x - 5,7699), que correspondeu a b = 0,5787. Segundo a literatura, valores próximos a 0,5 indicam que o processo de transferência de massa é governado por difusão e valores próximos a 1,0 indicam que o processo de transferência de massa é governado por adsorção, portanto há a confirmação de que a natureza da transferência de massa da NDMA na interface eletrodo/solução é predominantemente difusional.

Figura 32 – Estudo da natureza de transporte de massa de 1,0 mmol L⁻¹ de NDMA.

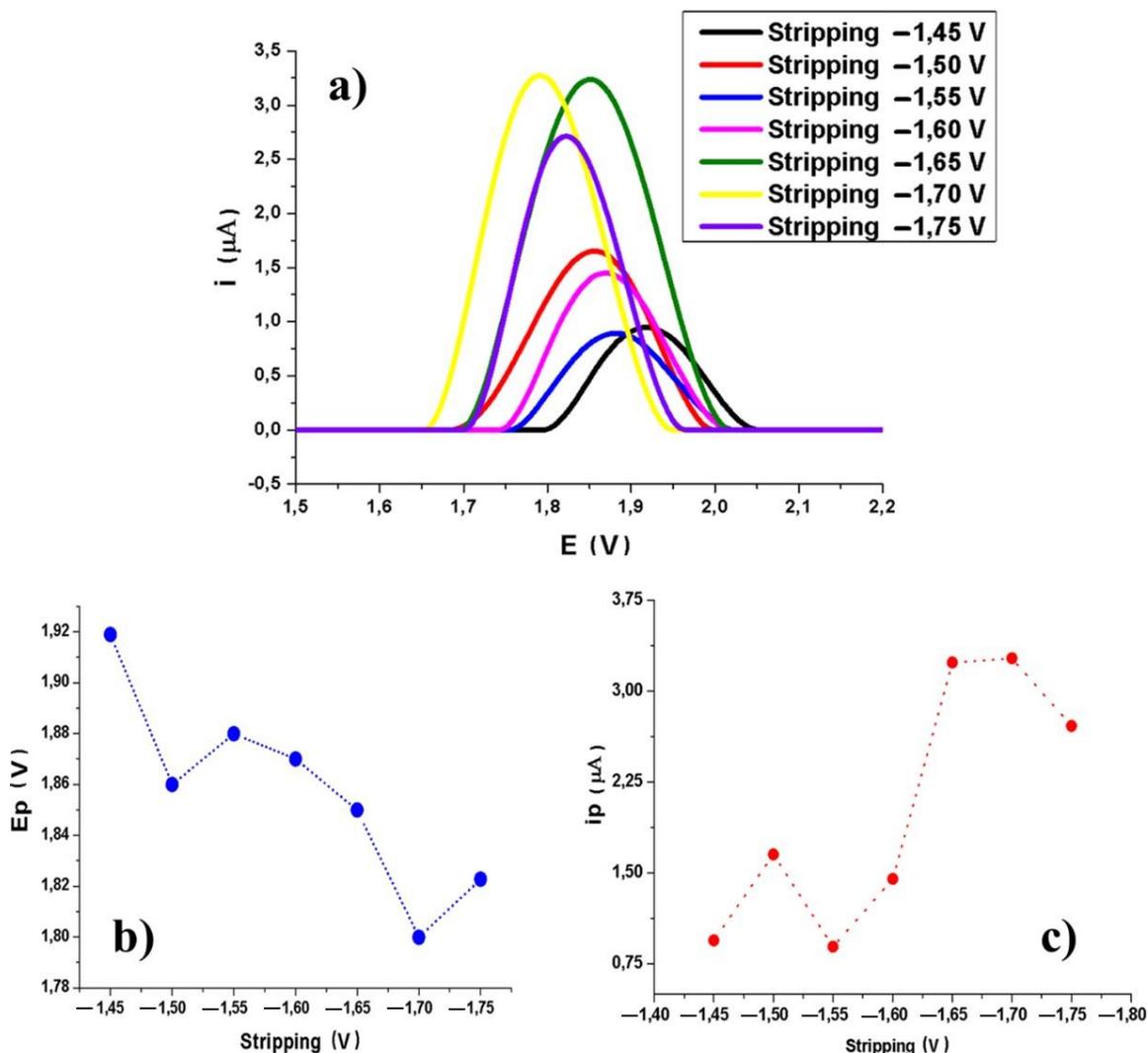
a) Voltamogramas cíclicos, b) Relação i vs v^{1/2} e c) Relação log i vs log v



4.6 Stripping Voltamétrico

Na aplicação do *stripping* voltamétrico utilizando a VOQ, foi uma melhor sensibilidade analítica na quantificação do analito. O estudo consistiu na aplicação de diferentes potenciais, numa faixa de -1,45 a -1,75 V, a melhor resposta foi obtida na aplicação de -1,70 V, com tempo de deposição de 30 s. Esse estudo foi realizado em $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NDMA em tampão BR pH 7,0. Como pode ser visto na [Figura 33](#), foi plotada a relação entre o potencial de pico e o *stripping* voltamétrico ([Figura 33b](#)) e a relação entre a corrente de pico e o *stripping* voltamétrico ([Figura 33c](#)).

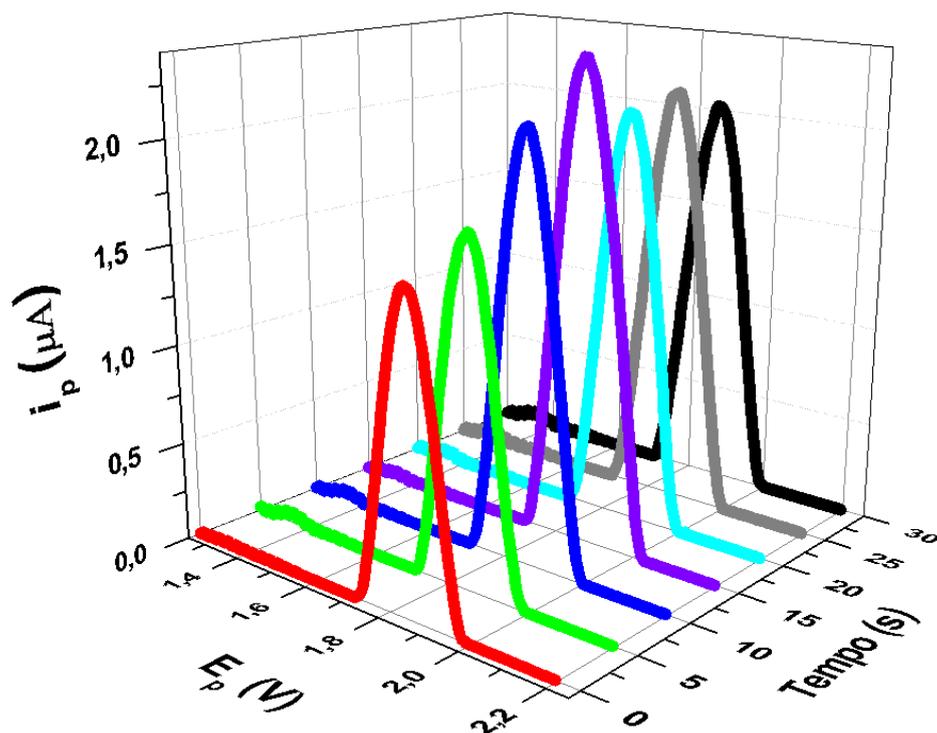
Figura 33 – Estudo do Stripping anódico voltamétrico usando a VOQ. a) VOQ utilizando *Stripping* anódico. b) Relação E_p versus *Stripping* anódico. C) Relação i_p versus *Stripping*.



Na aplicação de potenciais negativos (*stripping* anódico) é verificado o deslocamento do sinal analítico para potenciais mais negativos (**Figura 33b**), a melhor resposta voltamétrica foi obtida na aplicação de *stripping* de $-1,70$ V por 30 s, obtendo valor de corrente próximo a $3,50 \mu\text{A}$.

Em seguida foi realizado o estudo de pré-concentração com o intuito de determinar o melhor tempo de agitação da solução contendo o analito antes das medidas voltamétricas, foi utilizado os seguintes tempos de agitação (t) 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 s, neste estudo a melhor resposta analítica foi obtida no tempo de agitação de 15 segundos, como pode ser visto na **Figura 34**.

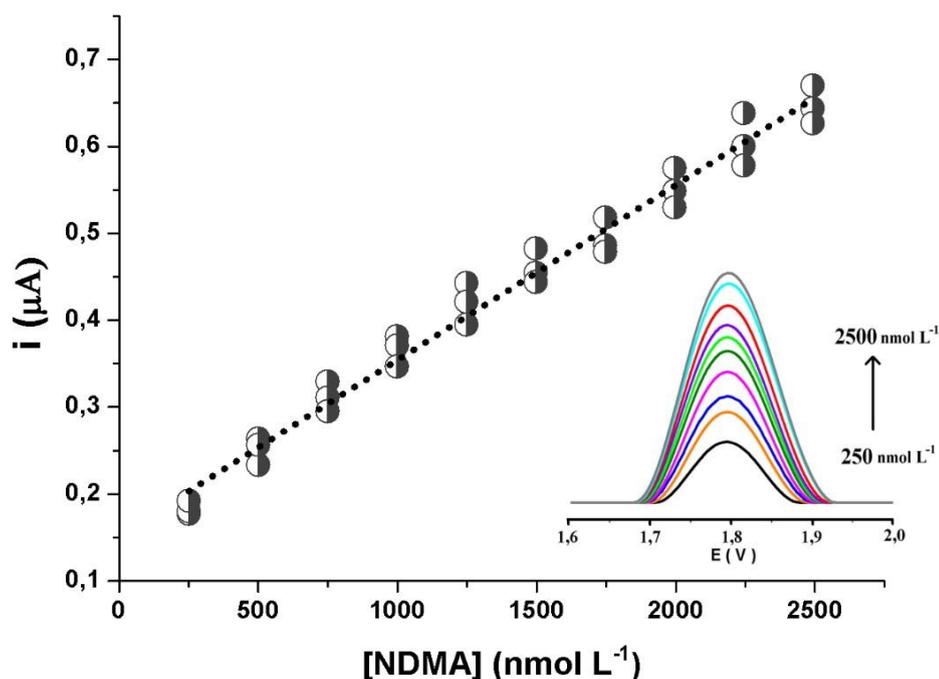
Figura 34 – Estudo de pré-concentração da NDMA usando *Stripping* anódico na VOO



4.7 Curva Analítica

A curva analítica foi traçada utilizando a técnica da VOQ, fazendo a diluição de 4,2 μL de 0,595 mmol L^{-1} de NDMA em 10 mL de tampão BR pH 7,0, utilizando os seguintes parâmetros voltamétricos: *stripping* anódico de $-1,7$ V por 30 s, frequência de 15 Hz, incremento de potencial de 5 mV e amplitude de potencial de 70 mV e posterior agitação por 15 s. Cada alíquota adicionada correspondeu a 250 nmol L^{-1} . Em uma faixa de concentração de 250 – 2500 nmol L^{-1} em triplicata. Sendo obtido uma boa relação linear $R^2 = 0,9948$ ($n = 3$) da relação I_p vs [NDMA]: $y = 0,2012x + 2 \times 10^{-7}$ (vide [Figura 35](#)).

Figura 35 – Curva analítica da NDMA numa faixa de concentração de 250 – 2500 nmol L^{-1} ($n = 3$)



A análise de variância (ANOVA) foi realizada e seus dados estão devidamente organizados na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Dados análise de variância (ANOVA)

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática
Regressão	$6,220 \times 10^{-13}$	1	$6,220 \times 10^{-13}$
Residual	$1,175 \times 10^{-14}$	28	$4,200 \times 10^{-16}$
Falta de ajuste	$3,236 \times 10^{-15}$	8	$4,045 \times 10^{-16}$
Erro puro	$8,518 \times 10^{-15}$	20	$4,259 \times 10^{-16}$
Total	$6,338 \times 10^{-13}$	29	$2,185 \times 10^{-14}$

No teste da falta de ajuste, foi calculado a razão entre a média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática da média do erro puro, obtendo um valor de 0,94973, valor este abaixo do tabelado de 2,447, indicando que para a NDMA com 95% de confiança o modelo se encontra bem ajustado. Referente ao teste de significância, foi calculado a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática residual, obtendo um valor de 1481,72 valor este muito acima do tabelado que corresponde a 4,196 com 5 % de incerteza para a NDMA, indicando que a regressão é altamente significativa.

Para determinar a sensibilidade da técnica analítica e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), primeiramente foi realizado a medida das triplicatas de 10 brancos (em 5 mL de tampão BR pH 7,0) em VOQ com os parâmetros ótimos (discutidos na sessão 4.6). Obtendo os valores residuais de corrente na faixa de potencial onde eventualmente há o surgimento do sinal da NDMA.

Tabela 7 – Média da corrente de pico residual obtidos das medidas de 10 brancos em tampão BR pH 7,0

Nº	Ip
1	$4,40 \times 10^{-8}$
2	$4,04 \times 10^{-8}$
3	$4,55 \times 10^{-8}$
4	$4,89 \times 10^{-8}$
5	$3,89 \times 10^{-8}$
6	$4,43 \times 10^{-8}$
7	$5,39 \times 10^{-8}$
8	$5,05 \times 10^{-8}$
9	$4,61 \times 10^{-8}$
10	$4,33 \times 10^{-8}$

Para determinar o LD e LQ foi primeiramente calculado o desvio padrão amostral (S_b) a partir dos voltamogramas de onda quadrada dos brancos, valor este correspondente a $4,5324 \times 10^{-9}$ μA e a partir disso foi constatado pelo emprego do coeficiente angular da curva analítica ($b = 0,2012$ $\mu\text{A}/\text{nmol L}^{-1}$) o cálculo do LD e LQ da NDMA, correspondendo a $67,6$ nmol L^{-1} e $225,3$ nmol L^{-1} respectivamente.

4.8 Estudo de recuperação

Para determinar a exatidão do método proposto, foi realizado o teste de recuperação das 5 amostras de medicamentos em quatro níveis de recuperação por adição de padrão em triplicata. Como pode ser visto na **Tabela 8** foi obtido bons resultados nas recuperações, dando um indicativo de que o método proposto pode ser aplicado com êxito para determinação de NDMA em amostras de medicamento sem a necessidade de tratamento prévio da amostra.

Os valores correspondentes as recuperações se mantiveram entre 90 e 110 %, indicando que a metodologia proposta é bastante adequada para análise de NDMA com emprego de um EDDB como sensor analítico em amostras de medicamentos. Cada nível de recuperação correspondeu as adições de 500, 750, 100, 1500 nmol L⁻¹ de NDMA nas amostras de losartana e olmesartana.

Tabela 8 – Estudo de recuperações da NDMA nas amostras de Losartana (A₁, A₂, B) e Olmesartana (C, D)

Medicamentos	Concentração de NDMA (nmol L ⁻¹)			
	Adicionada	Encontrada ± *CV (%)	Recuperação (%)	Média das Recuperações± *CV (%)
Losartana A ₁	500	489,67 ± 9,30	95,6	94,3 ± 4,76
	750	694,30 ± 3,36	92,9	
	1000	888,17 ± 2,92	89,1	
	1500	1486,00 ± 2,56	99,74	
Losartana A ₂	500	551,06 ± 5,05	110,4	104,7 ± 7,23
	750	816,49 ± 1,30	109,9	
	1000	1040,24 ± 1,27	104,3	
	1500	1402,43 ± 2,81	94,1	
Losartana B	500	503,74 ± 2,78	101,2	102,7 ± 6,19
	750	816,28 ± 4,58	109,1	
	1000	1056,85 ± 5,66	106,0	
	1500	1407,40 ± 1,95	94,5	
Olmesartana C	500	545,43 ± 3,90	109,3	103,0 ± 5,78
	750	773,9 ± 2,40	103,2	
	1000	1042,88 ± 2,13	104,6	
	1500	1415,52 ± 1,11	95,0	
Olmesartana D	500	531,45 ± 1,91	106,5	102,1 ± 4,11
	750	778,83 ± 3,81	103,8	
	1000	1012,27 ± 3,49	101,5	
	1500	1439,71 ± 2,52	96,6	

*CV = Coeficiente de variação (n=3)

4.9 Determinação de NDMA em amostras de medicamentos

Na determinação de NDMA em amostras de medicamentos, foi realizado o emprego da VRA utilizando a técnica VOQ, sendo as medidas realizadas diretamente nas 5 amostras de 5 mL (Losartana A₁, Losartana A₂, Losartana B, Olmesartana C e Olmesartana D), pelo qual foi verificado um sinal voltamétrico nas amostras Losartana A₁ e Losartana B (fabricantes diferentes e lotes diferentes). Para a Losartana A₁ surgiu um sinal em torno de +1,75 V (Figura 36), enquanto para Losartana B o sinal foi em torno de +1,8 V (Figura 37). Sendo constatado a presença da NDMA por comprimido: Para Losartana A₁ foi obtido o valor de concentração de 445,13 nmol L⁻¹ (valor correspondente a 32,98 µg L⁻¹) de NDMA e para Losartana B foi obtido o valor de concentração de 205,5 nmol L⁻¹ (valor correspondente a 15,22 µg L⁻¹) de NDMA.

Figura 36 – Aplicação do método de adição de padrão da NDMA na amostra Losartana (A₁). Voltamograma: Losartana A₁ (—), Losartana A₁ + 500 nmol L⁻¹ NDMA (—), Losartana A₁ + 750 nmol L⁻¹ NDMA (—), Losartana A₁ + 1000 nmol L⁻¹ NDMA (—) e Losartana A₁ + 1500 nmol L⁻¹ NDMA (—)

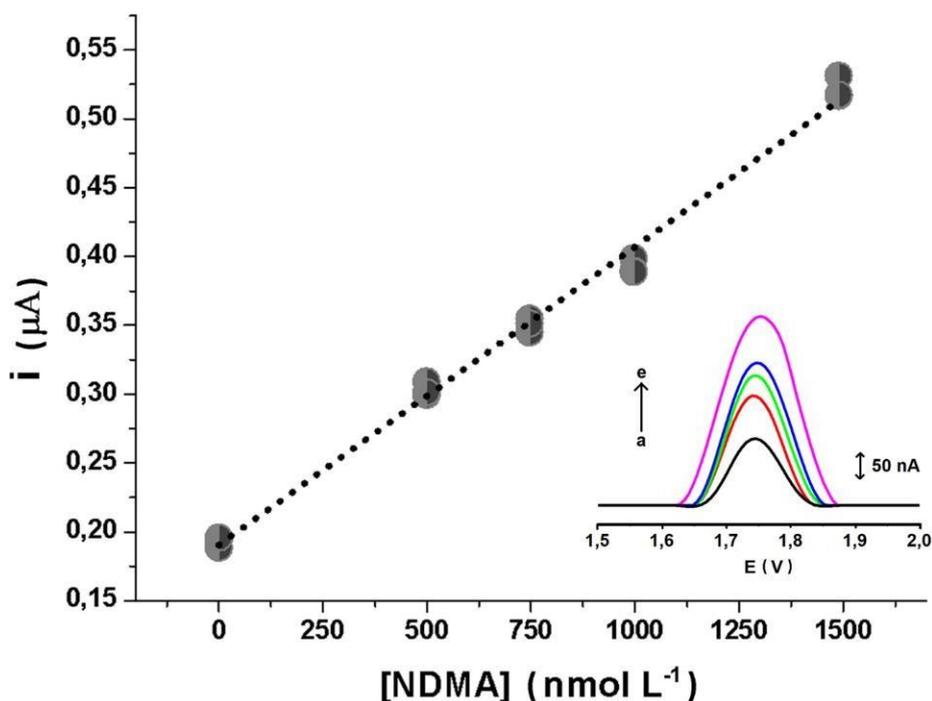
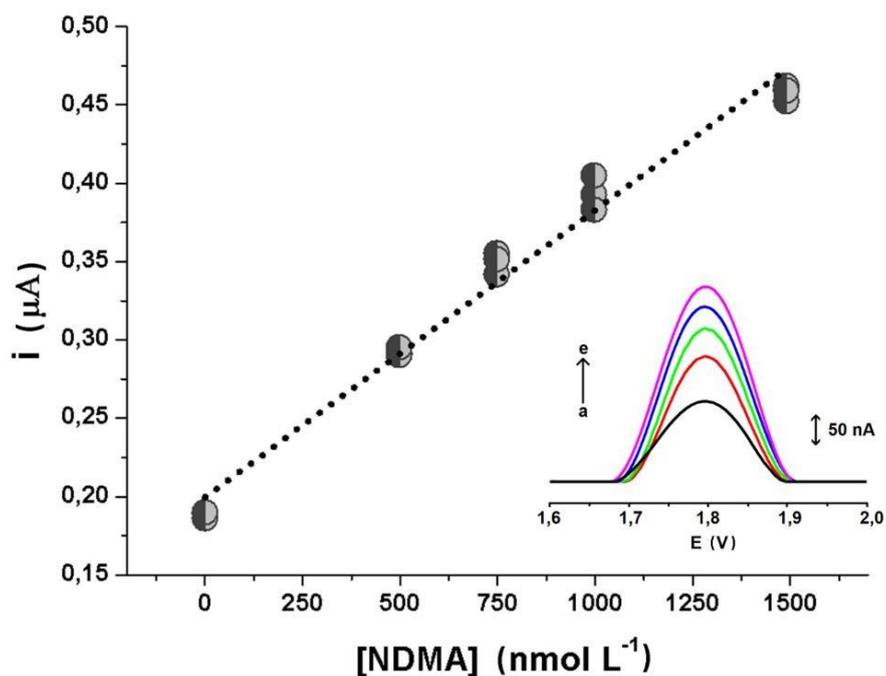


Figura 37 – Aplicação do método de adição de padrão da NDMA na amostra Losartana (B). Voltamograma: Losartana B (—), Losartana B + 500 nmol L⁻¹ NDMA (—), Losartana B + 750 nmol L⁻¹ NDMA (—), Losartana B + 1000 nmol L⁻¹ NDMA (—) e Losartana B + 1500 nmol L⁻¹ NDMA (—)



Os resultados obtidos apresentam boa concordância em relação ao método de referência já disponível na literatura (ANSM, 2021). A **Tabela 9** mostra o comparativo dos valores obtidos entre o método desenvolvido com o método de referência.

Tabela 9 – Comparação entre o método proposto e o método de referência na determinação de NDMA em amostras de medicamentos

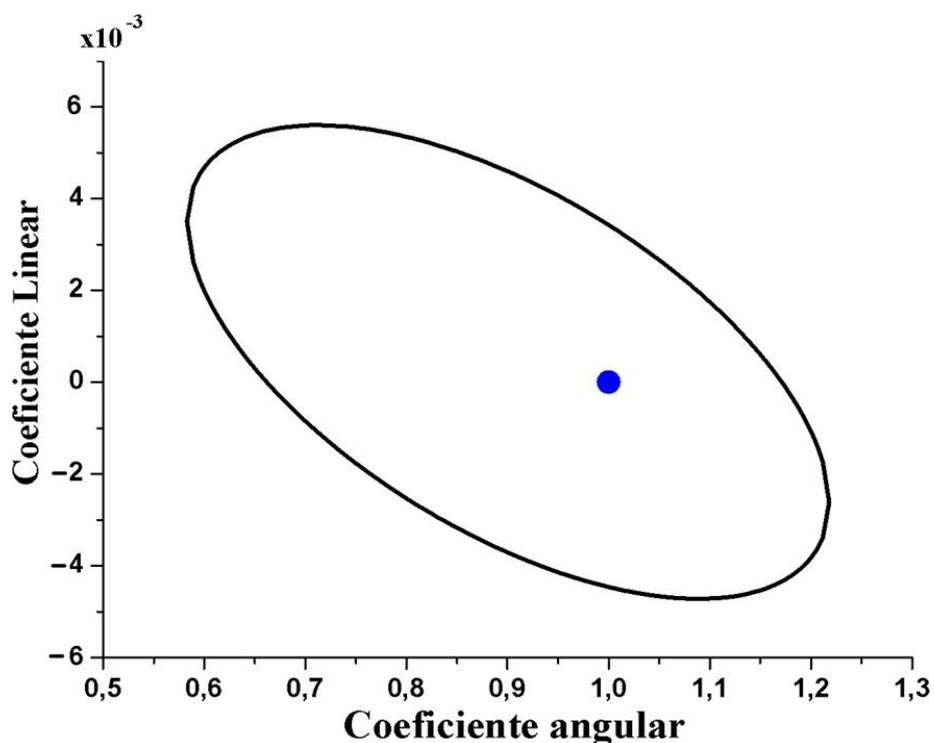
Medicamentos	Concentração de NDMA (nmol L ⁻¹) por comprimido			
	Método proposto	Média ± *CV (%)	HPLC – DAD)	Média ± *CV (%)
Losartana A ₁	448,27	445,13 ± 2,02	394,40	391,62 ± 1,01
	435,00		393,36	
	452,12		387,11	
Losartana B	206,17	205,50 ± 0,99	214,36	223,99 ± 4,13
	203,21		224,78	
	207,11		232,83	

*CV = Coeficiente de variação (n=3)

A partir dos dados mostrados na **Tabela 9** foi aplicado o teste t emparelhado, pelo qual o valor calculado correspondeu a 0,596, valor este abaixo do tabelado de 2,132 com 95% de confiança. Demonstrando que não há uma diferença significativa entre os resultados obtidos pelo método proposto e o método de referência.

Com o mesmo conjunto de dados foi realizado um teste F, pelo qual o valor calculado correspondeu a 0,853, valor este abaixo do tabelado de 6,39 com 95% de confiança. Demonstrando que os valores obtidos pelo método proposto podem ser comparados diretamente com os valores obtidos pelo método de referência. Por fim, foi realizado a análise estatística da elipse de confiança (**Figura 38**) indicando que os resultados obtidos pelo método proposto são confiáveis e adequados para análise de NDMA em amostras de medicamentos.

Figura 38 – Elipse de confiança referente ao método desenvolvido





Capítulo 5
Conclusão

5 . CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados com a NDMA, foi possível observar que o uso do EDDB utilizando o *stripping* voltamétrico a partir da VOQ, demonstrou que o método proposto é adequado para análises de amostras reais de medicamentos (losartana e olmesartana). Os estudos realizados em VPD e VOQ mostraram que o pH da solução tem influência na resposta voltamétrica da NDMA, sendo os valores ótimos de corrente obtidos em tampão Britton-Robisson (BR), pH 7. Além disso, o estudo de velocidade mostrou que as reações de oxidação da NDMA são governadas predominantemente por difusão. A curva analítica foi obtida a partir do uso da técnica da VOQ com *stripping* voltamétrico, em uma faixa de concentração de 250 – 2500 nmol L⁻¹ em tampão BR pH 7,0, utilizando os parâmetros de frequência de 15 Hz, incremento de potencial de 5 mV, amplitude de pulso de 70 mV e janela de potencial de +1,0 a +2,2 V. Na aplicação do método desenvolvido nas amostras de medicamentos foi constatado a presença de NDMA em duas amostras de marcas comerciais conhecidas (Losartana A₁ e Losartana B), na amostra A₁ foi encontrado 445,13 nmol L⁻¹ de NDMA por comprimido e na amostra B foi encontrado 205,50 nmol L⁻¹ por comprimido, indicando a contaminação desses fármacos.



Capítulo 6
Referências

6 . REFERÊNCIAS

Agence National de Sécurité du Médicament (ANSM). **Determination of NDMA and NDEA in SARTAN drug substances by HPLC/UV**. Method Reference: 19A0416-01, 2021.

Aboagye, E. A.; Chea, J. D.; Yenkie, K. M. **Systems level roadmap for solvent recovery and reuse in industries**. iScience v.24, n.103114, 2021.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 272, DE 14 DE MARÇO DE 2019**.

Ministério da Saúde, Brasil, 2019.

Ahirrao, S. P.; Bhambere, D. S.; Ahire, E. D.; Dashputre, N. L.; Kakad, S. P.; Laddha, U. D. **Formulation and evaluation of Olmesartan Medoxomil nanosuspension**, Materials Today: Proceedings, 2023.

Akkaraju, H.; Tatia, R.; Mane, S. S.; Khade, A. B.; Dengale, S. J. **A comprehensive review of sources of nitrosamine contamination of pharmaceutical substances and products**. Regulatory Toxicology and Pharmacology. v.139, n.105355, 2023.

Archna, Sharma, S. K.; Sobti, R. C. **Nitrate removal from ground water: a review**. E-Journal Chem. v.9, p.1667–1675, 2012.

Bard, A. J.; Faulkner, L. R. **Electrochemical methods: Fundamentals and applications**. John Wiley & Sons, Inc. 2001.

Barnes, J. M.; Magee, P. N. **Some toxic properties of dimethylnitrosamine**. Br. J. Ind. Med., v.11, n.167, 1954.

Barker, G. C.; Jenkins, I. L. **Square-wave polarography**. The Analyst, v.77, n.920, p.685-696, 1952.

Bakshi, K.; Brusick, D. **Bioactivation of dimethylnitrosamine in intrasanguineous host-mediated assay and its association with in vitro mutagenesis assay**. Mutat. Res., v.72, n.79, 1980.

Bhairam, M.; Prasad, J.; Verma, K.; Jain, P.; Gidwani, B. **Formulation of transdermal patch of Losartan Potassium & Glipizide for the treatment of hypertension**

&diabetes. *Materials Today: Proceedings*, v. 83, p.59-68, 2023

Bharate, S. S. **Critical analysis of drug product recalls due to nitrosamine impurities**. *J. Med. Chem.* v.64, p.2923–2936, 2021.

Bockris, J. O. M.; Devanathan, M. A. V.; Muller, K. **On the structure of charged interfaces**. *Proc. Roy. Soc. A274*, 55. 1963.

Chaplin, B. P., Schrader, G., & Farrell, J. **Electrochemical Oxidation of N-Nitrosodimethylamine with Boron-doped Diamond Film Electrodes**. *Environmental Science & Technology*, v.43, n.21, p.8302–8307, 2009.

Conselho Federal de Farmácia (CFF). Acessado em: <https://site.cff.org.br/noticia/Noticias-gerais/11/08/2023/cloreto-de-sodio-e-losartana-lideram-ranking-dos-principios-ativos-mais-vendidos-em2022#:~:text=Cloreto%20de%20s%C3%B3dio%20e%20Losartana,Anu%C3%A1rio%20Estat%C3%ADstico%20do%20Mercado%20Farmac%C3%AAutico>.

Crews, C. **Processing Contaminants: N-Nitrosamines**. *Encyclopedia of Food Safety*, p. 409–415, 2014.

Ellen, G.; Schuller, P. L.; Froeling, P. G.; Bruijns, E. **No volatile N-nitrosamines detected in blood and urine from patients ingesting daily large amounts of ammonium nitrate**. *Food Chem Toxicol*, v.20, p.879–882, 1982.

Fatibello-Filho, O.; Silva, T. A.; Moraes, F. C.; Sitta, E. **Electroanalyses: Theoretical and practical aspects**. EDUFSCar, 2022.

Fiddler, W.; Pensabene, J. W.; Doerr, R. C.; Dooley, C. J. **The presence of dimethyl and diethyl-nitrosamines in deionized water**. *Food Chem. Toxicol.* v.15, p.441–443, 1977.

Flowers, R. C.; Singer, P. C. **Anion exchange resins as a source of nitrosamines and nitrosamine precursors**. *Environ. Sci. Technol.* v.47, p.7365–7372, 2013.

Gabe, D. R. **Heyrovsky – the inventor of polarography**. *Transactions of the IMF*, v.93, n.3, p.118, 2015.

Ghassempour, A.; Abbaci, M.; Talebpour, Z.; Spengler, B.; Römpf, A. **Monitoring of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by ion-pair complex liquid chromatography and identification with negative ion electrospray ionization mass spectrometry.** v.1185, n.1, p.43–48, 2008.

Gough, T. A.; Webb, K. S.; McPhail, M. F. **Volatile nitrosamines from ion-exchange resins.** Food Chem. Toxicol. v.15, p.437–440, 1977.

Haorah, J.; Zhou, L.; Wang, X.; Xu, G.; Mirvish, S. S. **Determination of total N-nitroso compounds and their precursors in frankfurters, fresh meat, dried salted fish, sauces, tobacco, and tobacco smoke particulates.** *J Agric Food Chem*, v.49, p.6068–6078, 2001.

Heads of medicines agency. **Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines.** 2020.

Herrmann, S.S.; Duedahl-Olesen, L.; Granby, K. **Occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment.** Food Control, v.48, p.163–169, 2015.

Heyrovský, J. **The trends of polarography.** Nobel Lecture, 1959.

Heyrovský, J. **Reprodução de: J. Heyrovský, Chemické Listy1922,16, 256-264.** The Chemical Record, v.12, n.1, p.17–25, 2012.

Heyrovsky, J. **The Significance of the Electrode Potential.** Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, v.102, n.718, p.628–640, 1923.

Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. **Principles of instrumental analysis.** 6 ed. Bookman, 2009.

International Agency for Research on Cancer In: WHO, I.A.f.R.o.C. (Ed.), **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** World Health Organization. 2015.

Keire, D. **FDA's Overview of the Guidance for Industry: Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs.** 2020.

Kemper, J. M.; Walse, S. S.; Mitch, W. A. **Quaternary amines as nitrosamine precursors: a role for consumer products?** *Environ. Sci. Technol.* v.44, p.1224–1231, 2010.

Kimoto, W.; Dooley, C.; Carre, J.; Fiddler, W. **Role of strong ion exchange resins in nitrosamine formation in water.** *Water Res.* v.14, p.869–876, 1980.

Krasner, S. W.; Mitch, W. A.; McCurry, D. L.; Hanigan, D.; Westerhoff, P. **Formation, precursors, control, and occurrence of nitrosamines in drinking water: a review.** *Water Res.* v.47, p.4433–4450, 2013.

Laitinen, H. A.; Kolthoff, I. M. *J. Phys. Chem.*, v.45, p.1062, 1941.

Lim, H. H; Oh, Y. S.; Shin, H. S. **Determination of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosomethylethylamine in drug substances and products of sartans, metformin and ranitidine by precipitation and solid phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, p.113460, 2020.

Lourenço, A. S.; Nunes, T. A.; Silva, A. C.; Ribeiro, W. F.; Araujo, M. C. U. **Simultaneous Voltammetric Determination of Tryptamine and Histamine in Wines Using a Carbon Paste Electrode Modified with Nickel Phthalocyanine.** *Food Analytical Methods.* v.15, p.3257–3269, 2022.

Mahan, H. **Nitrosamine – A Big No for Printing Inks for Food and Pharma Packaging.** 2020. *The Packman*. URL. <https://thepackman.in/nitrosamine-a-big-no-for-printing-inks-for-food-and-pharma-packaging/>.

Magee, P. N.; Barnes, J. M. **The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine.** *Br. J. Canc.* 10, 114. 1956.

Magee, P. N.; Barnes, J. M. **Toxic liver injury: Inhibition of protein synthesis in rat liver by dimethylnitrosamine in vivo.** *Biochem. J.*, v.70, n.106, 1958.

Magee, P. N.; Barnes, J. M. **Induction of kidney tumours in the rat with dimethylnitrosamine (N-nitrosodimethylamine).** *J. Pathol. Bacterio.*, v.84, n.19, 1962.

Magee, P. N.; Hultin, T. **Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of proteins of rat liver slices by dimethylnitrosamine in vitro.** *Biochem. J.*, v.83, n.106, 1962.

Magee, P. N.; Farber, E. **Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo.** *Biochem. J.*, v.83, n.114, 1962.

Magee, P. N.; Barnes, J. M. **Carcinogenic nitroso compounds.** *Adv. Cancer Res.*, v.10, n.163, 1967.

Moack, J. A.; Bond, A. M., Mitchell, S.; Scollary, G. **Statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques.** *Pure & Applied Chemistry*, v.69, n.2, p.297, 1997.

Mitch, W. A.; Schreiber, I. M. **Degradation of tertiary alkylamines during chlorination/chloramination: implications for formation of aldehydes, nitriles, halonitroalkanes, and nitrosamines.** *Environ. Sci. Technol.* v.42, p.4811–4817, 2008.

Najm, I.; Trussell, R. R. **NDMA formation in water and wastewater.** *J. Am. Water Works Assoc.* v.93, p.92–99, 2001.

Niklas, A. A.; Borge, G. I. A.; Rødbotten, R.; Berget, I.; Müller, M. H. B.; Herrmann, S. S.; Granby, K.; Kirkhus, B. **Levels of nitrate, nitrite and nitrosamines in model sausages during heat treatment and in vitro digestion – The impact of adding nitrite and spinach (*Spinacia oleracea* L.).** *Food Research International*, v.166, n.112595, 2023.

Oliveira, J. E. S.; Araújo, A. P.; Alves, A. S.; Silva, M. W. F.; Almeida, J. P. B.; Nascimento, J. A. M.; Santos, V. B.; Oliveira, S. C. B. **Simultaneous voltammetric determination of 7-methyl-guanine and 5-methyl-cytosine using a cathodically pre-treated boron-doped diamond electrode.** *Analytical Biochemistry*, v. 671, p.115135, 2023.

Oliveira, R. T. S., Garbellini, G. S., Salazar-Banda, G. R., & Avaca, L. A. **The Use of Ultrasound for the Analytical Determination of Nitrite on Diamond Electrodes by**

- Square Wave Voltammetry.** *Analytical Letters*, v.40, n.14, p.2673–2682, 2007.
- Özbay, S. **Determination of volatile N-nitrosamines formed in salami cooked by different processes,** *Journal of Food Composition and Analysis*, v.112, n.104691, 2022.
- Parr, M. K., Joseph, J. F. **NDMA Impurity in Valsartan and other Pharmaceutical Products: Analytical Methods for the Determination of N-Nitrosamines.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018.
- Park, S. -H.; Wei, S.; Mizaikoff, B.; Taylor, A. E.; Favero, C.; Huang, C. -H. **Degradation of amine-based water treatment polymers during chloramination as Nnitrosodimethylamine (NDMA) precursors.** *Environ. Sci. Technol.* v.43, p.1360–1366, 2009.
- Randles, J. E. B. **A cathode ray polarograph. Part II. —The current-voltage curves.** *Trans. Faraday Soc.*, v.44, n.0, p.327–338, 1948.
- Robles, H. **Nitrosamines.** *Reference Module in Biomedical Sciences*, 2022.
- Roose, P.; Eller, K.; Henkes, E.; Rossbacher, R.; Höke, H., 2015. **Amines, Aliphatic,** Ullmann's. *Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2015.
- Rywotycki, R. **The effect of selected functional additives and heat treatment on nitrosamine content in pasteurized pork ham.** *Meat Science*, v.60, p.335-339, 2002.
- Schoental, R. **Lack of correlation between the presence of 7-methylguanine in DNA and RNA of organs and localization of tumors after a single carcinogenic dose of N-methyl-N-nitrosourethane.** *Biochem. J.*, v.114, n.55, 1969.
- Scientific Committee on Consumer Safety SCCS. **Opinion on Nitrosamines and Secondary Amines in Cosmetic Products (Brussels).** 2011.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman T. A. **Princípios de análise Instrumental.** 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- Resende, C.; Diniz, A. F.; Martelli, P. B.; Bueno, A. H. S. **Avaliação da Eficiência de Inibidores de Corrosão para Concretos em Ambientes Contaminados com CO2 e**

Íons Cloretos. *Rev. Virtual Quim.*, v.9, n.2, p.699-716, 2017.

Salazar-Banda, G. R. **Estudos da eletroquímica do diamante dopado com boro e da sua superfície modificada com catalisadores para a oxidação de metanol e etanol.** Universidade de São Paulo. 2006.

Ševčík, A. **Oscillographic polarography with periodical triangular voltage.** *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, v.13, p.349–377, 1948.

Soares, F. S.; Ramalho, R. T. E; Silva, A. C. **A voltammetric method for diuron determination in river water.** *Electroanalysis*, v.35, 2023.

Souza, G. F. P.; Matos, M. F. A. V.; Aglio, T. C.; Salles, A. G.; Rath, S. **A comprehensive LC-UHPLC-MS/MS method for the monitoring of N-nitrosamines in lipophilic drugs: A case study with rifampicin,** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.236, p.115685, 2023.

Swann, P. F.; Magee, P. N. **Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-methyl-N-nitrosourea, dimethylnitrosamine, dimethyl sulphate and methyl methanesulphonate.** *Biochem. J.*, v.110, n.39, 1968.

Swann, P. F.; Magee, P. N. **Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of N-7 of guanine of nucleic acids of the rat by diethylnitrosamine, N-ethyl-N-nitrosourea and ethyl methanesulphonate.** *Biochem. J.*, v.125, n.841, 1971.

Sun, C., Wang, R., Wang, T., Li, Q. **Primary evaluation of nine volatile N-nitrosamines in raw red meat from Tianjin, China, by HS-SPME-GC-MS.** *Food Chemistry*, v.310, n.125945, 2019.

Then, K. L.; Rankin, J. A. **Hypertension: a review for clinicians.** *Nursing Clinics of North America*, v.39, n.4, p.793–814, 2004.

Tricker A. R. **N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids.** *Eur J Cancer Prev*, v.6, p.226–268, 1997.

Torbjorn, L. **Reactions in the System Nitro-cellulose/Diphenylamine with the Special Reference to the Formation of Stabilising Product Bonded to Nitrocellulose.** *Uppsala University*. 2004.

Tubbs, J. L. **Encyclopedia of Biological Chemistry || DNA Damage: Alkylation**. The Scripps Research Institute, p.9–15, 2013.

US-FDA. **FDA Statement on the FDA’s Ongoing Investigation into Valsartan and ARB Class Impurities and the Agency’s Steps to Address the Root Causes of the Safety Issues**. 2019.

Wang, L. H.; Hsia, H. C.; Wang, C. C. **Simultaneous Determination of Five Volatile and Non-Volatile N-Nitrosamines in Biological Fluids and Cosmetic Products by Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection**. v.29, n.12, p.1737–1751, 2006.

White, C. M. **Ranitidine’s N-nitrosodimethylamine problem may be tip of the iceberg**. JAMA Netw. Open 4, e2035158. –e2035158. 2021.

Wilczak, A.; Assadi-Rad, A.; Lai, H. H.; Hoover, L. L.; Smith, J. F.; Berger, R.; Rodigari, F.; Beland, J. W.; Lazzelle, L. J.; Kincannon, E. G.; Baker, H.; Heaney, C.T. **formation of NDMA in chloraminated water coagulated with DAD-MAC cationic polymer**. J. Am. Water Works Assoc. v.95, p.94–106, 2003.

Witt, O. N. **XXIII - on aromatic nitrosamines**. J. Chem. Soc. Trans. v.33, p.202-211, 1878.

Wu, Y.; Levons, J.; Narang, A. S.; Raghavan, K.; Rao, V. M. **Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug–excipient incompatibility**. AAPS PharmSciTech. v.12, p.1248–1263, 2011.

Zhao, Y. Y.; Boyd, J.; Hrudey, S. E.; Li, X. F. **Characterization of New Nitrosamines in Drinking Water Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry**. Environmental Science & Technology.v.40, n.24, p.7636–7641, 2006.