

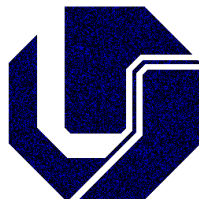
Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Determinação simultânea de aspirina e ácido ascórbico
em medicamentos usando análise por injeção em fluxo
com detecção amperométrica

Aluna: Joyce Aparecida Tavares de Miranda

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Uberlândia- 2011



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Determinação simultânea de aspirina e ácido ascórbico
em medicamentos usando análise por injeção em fluxo
com detecção amperométrica

Aluna: Joyce Aparecida Tavares de Miranda

Texto apresentado ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para defesa de dissertação de mestrado.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Uberlândia- 2011



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO: NÚMERO 131/COPGQ.

DATA: 24/11/2011

DISCENTE: Joyce Aparecida Tavares de Miranda

MATRÍCULA: 10922QM1010

TÍTULO DO TRABALHO: Determinação simultânea de aspirina e ácido ascórbico usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de métodos rápidos e de baixo custo para controle de qualidade de fármacos contendo mais de um princípio ativo.

Às oito horas e trinta minutos do dia vinte e quatro de novembro do ano dois mil e onze, na sala 306 do Bloco 5R-A, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores: Renato Camargo Matos, da Universidade Federal de Juiz de Fora; André Luiz dos Santos, da UFU, Campus do PONTAL e Eduardo Mathias Richter, professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa apresentou a candidata e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 01/2010/COPGQ. Em seguida, o presidente da mesa concedeu a palavra à candidata para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir a apresentadora. A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou a candidata. Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Determinação simultânea de aspirina e ácido ascórbico usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após ser lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Renato Camargo Matos
Prof. Dr. Renato Camargo Matos – UFJF

André Luiz dos Santos
Prof. Dr. André Luiz dos Santos – UFU/PONTAL

Eduardo Mathias Richter
Prof. Eduardo Mathias Richter – IQUFU
Orientador

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana. (**Carl Jung**)

O que é realização? É o momento em que você vê sua beleza interior, e é tão preenchido por ela que se esquece de tudo mais, e está livre de todas as amarras: você reconhece que é toda a Beleza, toda a Glória, todo o Poder. O indivíduo é o reflexo de Deus no espelho da natureza.
(**Sathya Sai Baba**)

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus de nosso interior.
- Agradeço à minha filha Alice pelo companheirismo e por dar sentido à minha vida.
- Agradeço aos meus familiares, especialmente meus pais Sonia e Virmones por todo amor e investimento.
- Agradeço aos amigos Daniela Arantes, Cassio Dias e Amani, e também à Fernanda Quaresma e Henrique Sol, pela sabedoria e espiritualidade.
- Aos amigos: Ana Luiza Brisa, Bruno Amarelo, Natália Ceschim, Bruno Peixoto, Ana Carolina Costa, Victoria Barão, bem como aos demais irmãos da Casa de Oração Peregrinos da Luz Divina Pai Benedito, e nossos respectivos guias pelo amor e orientação.
- À Caroline Marchine, Jack Will, Izadora Vidigal, Kárita Carrieri, e Lincoln Antonio por todo bom astral de que compartilhamos.
- Aos amigos Tatiana Vilarinho e Bráulio Garcia, que apesar da distância, mantemos o bem querer.
- Aos colegas de laboratório: Rafael Pisquilha, Thiago Tormim, Pollyane, Tatielle, Rodrigo Banana e Rodrigo Cabeça pelas experiências e experimentos de que compartilhamos. E principalmente à Denise Tofanello pela quase co-orientação.
- Agradeço ao Prof^o Eduardo Richter pela orientação e por acreditar em nosso trabalho.
- Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.
- A CAPES e a FAPEMIG.

LISTA DE ABREVIACÕES

AA – Ácido ascórbico

AAS- Ácido acetil salicílico

AINEs - Antiinflamatórios não-esteroidais.

AS – Ácido salicílico

ASWV - Absorptive Square Wave Voltametry (Voltametria de Onda Quadrada Absortiva)

ATN - Atenolol

BP – Britanic Pharmacopeia

BIA – Batch Injection Analysis (Análise por injeção em batelada)

CA - Cafeína

COX – Ciclooxygenase (enzima)

CV – Eletrodo de Carbono Vítreo

CVD – Chemical Vapor Deposition (Decomposição Química a Vapor)

DDB – Diamante Dopado com Boro

DHA - Ácido Dehidroascórbico

DHBA – Ácido Dihidroxi-benzóico

DPR – Desvio Padrão Relativo

DPV – Voltametria de Pulso Diferencial

EA – Eletrodo Auxiliar

ER – Eletrodo de Referência

ET – Eletrodo de Trabalho

E_p – Pico de Potencial

FIA – Flow Injection Analysis (Análise por injeção em fluxo)

FIA-AMP – FIA com detecção amperométrica de múltiplos pulsos

HAc/Ac - Tampão ácido acético/ acetato

HPHT – High pression high temperature (Método de Altas Pressões e Temperaturas)

HPLC – High Performance Liquid Cromatography (Cromatografia de Líquida de Alta Eficiência)

I_C – Corrente Capacitiva

I_F – Corrente Faradaica

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

LRC - Lercanidipena

MPA – Multiple Pulse Amperometry (Amperometria de Múltiplos Pulsos)

NFT - Nitrofurantoína

NIRS - Espectroscopia do Infravermelho Próximo

NO – Óxido Nítrico

PA – Paracetamol

PAD – Pulsed Amperometric Detection (Detecção Amperométrica Pulsada)

PLS - Mínimos Quadrados Parciais

PROP - Propranolol

R – Coeficiente de correlação linear

RQ – Reação química

SQR - Substância química de referência

SWV – Square Wave Voltametry (Voltametria de Onda Quadrada)

USP – United State Pharmacopeia

VC – Voltamograma cíclico ou voltametria cíclica

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Página 54: Desvios padrões relativos ($n = 9$) calculados a partir dos estudos de repetibilidade com o sistema FIA proposto sem e com o emprego de um pulso de potencial de limpeza (0,0 V/300 ms).

Tabela 3.2– Página 58: Variação do *fator* ($I_{AA+1,35\text{ V}}/I_{AA+0,90\text{ V}}$) em função da concentração de AA.

Tabela 3.3 – Página 65: Limites de detecção e quantificação e coeficiente de correlação nos potenciais 0,9 V e 1,35 V

Tabela 3.4 – Página 66: Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de AA e AAS em quatro formulações farmacêuticas empregando o método proposto (FIA-AMP) e HPLC.

Tabela 3.5 – Página 67: Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação na determinação seqüencial rápida de AA e AAS em formulações farmacêuticas usando o método proposto.

Tabela 3.6 – Página 75: Resultados obtidos na determinação seqüencial rápida de AA e AAS por SWV.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – **Página 4:** Fórmula estrutural do ácido acetil salicílico

Figura 1.2 – **Página 6:** Fórmula estrutural do ácido ascórbico

Figura 1.3 – Página: Mecanismo sugerido para o processo CVD de síntese de filmes de diamante por decomposição química a vapor

Figura 2.1– Página 19: Equação de hidrólise do ácido acetilsalicílico (AAS) em meio de hidróxido de sódio formando salicilato e acetato de sódio.

Figura 2.2 – Página 34: Célula “wal-jet” usada no sistema FIA.

Figura 2.3 – Página 36: Esquema ilustrativo do sistema FIA de linha única utilizado neste trabalho.

Figura 2.4 – Página 37: Imagem do sistema FIA usado neste trabalho.

Figura 2.5 – Página 38: Esquema da célula usada nas análises por análise por injeção em batelada (BIA)

Figura 3.1 – Página 43: Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sem (a) e com a adição de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA (b) ou $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AS (c).

Figura 3.2 – Página 44: (a) Representação da reação eletroquímica de oxidação do ácido ascórbico (AA), formando ácido dehidroascórbico (DHA) na superfície do eletrodo de diamante dopado com boro (DDB); (b) Reação do DHA com a água, formando um composto eletroquimicamente inativo.

Figura 3.3 – Página 45: Representação da reação eletroquímica de oxidação do ácido salicílico (AS), formando ácido 2,3 dihidroxi-benzóico (2,3-DHBA) e ácido 2,5 dihidroxi-benzóico (2,5-DHBA) na superfície do eletrodo de diamante dopado com boro (DDB).

Figura 3.4– Página 47: (A) Escada de potencial aplicada ao eletrodo de trabalho em função do tempo, todos os potenciais foram aplicados em 50 ms; (B) Amperogramas obtidos usando

o sistema FIA/AMP na injeção de: (a) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AAS; (b) $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA. Vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; Volume de injeção $100 \mu\text{L}$

Figura 3.5 – Página 48: Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos a partir dos resultados da Fig. 3.4. Soluções: $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AAS. Eletrólito tampão ácido acético/acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7). Vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$.

Figura 3.6 – Página 50: Amperogramas obtidos com a injeção de três soluções de composições diferentes. $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA; $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS e uma solução contendo ambos os compostos (AA+AS) na mesma concentração. Eletrólito: ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7); Vazão de $4,5 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção $100 \mu\text{L}$.

Figura 3.7 – Página 53: Amperogramas obtidos com o sistema FIA proposto em função de injeções sucessivas de soluções padrão contendo uma mistura de AA e AS em duas concentrações diferentes ($30 + 50$ e $80 + 130 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA + AS, respectivamente). (A) Sem aplicação do pulso de potencial de limpeza; (B) Com aplicação do pulso de potencial de $0,0 \text{ V}$ por 300 ms (amperograma não apresentado); Vazão de $4,5 \text{ mL min}^{-1}$; Volume injetado: $100 \mu\text{L}$.

Figura 3.8 – Página 56: Amperogramas obtidos em função da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de AA: a) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; b) $30 \mu\text{mol L}^{-1}$; c) $60 \mu\text{mol L}^{-1}$; d) $90 \mu\text{mol L}^{-1}$; e) $120 \mu\text{mol L}^{-1}$. Pulso de potencial de limpeza: $0,0 \text{ V}/300 \text{ ms}$; Vazão de $4,5 \text{ mL min}^{-1}$; Volume injetado: $100 \mu\text{L}$.

Figura 3.9 – Página 57: Curvas analíticas obtidas a partir das correntes de oxidação do AA dos amperogramas apresentados na Fig. 3.8. (a) $0,9 \text{ V}$; (b) $1,35 \text{ V}$.

Figura 3.10 – Página 59: Amperogramas obtidos em função da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de AS: a) 16 ; b) 50 ; c) 100 ; d) 150 ; e) $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Pulso de potencial de limpeza: $0,0 \text{ V}/300 \text{ ms}$; Vazão de $4,5 \text{ mL min}^{-1}$; Volume injetado: $100 \mu\text{L}$.

Figura 3.11 – Página 60: Curvas analítica obtida a partir das correntes de oxidação do AS do amperograma apresentado na Fig. 3.10.

Figura 3.12 – Página 62: Amperogramas obtidos a partir de injeções de soluções padrão contendo, respectivamente, concentrações crescentes de AA + AS: (a) 30 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (b) 40 e 65 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (c) 50 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (d) 60 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (e) 70 e 115 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (f) 80 e 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (g) apenas AA 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Pulso de potencial de limpeza: 0,0 V/300 ms. Vazão de 4,5 mL min^{-1} ; Volume de injeção: 100 μL .

Figura 3.13 – Página 63: Curvas analíticas obtidas para AA em ordem crescente (a) e decrescente (b) de concentração. Os dados foram obtidos a partir do amperograma da Fig. 3.12 (0,90 V/ 50 ms).

Figura 3.14 – Página 64: Curvas analíticas obtidas para AS em ordem crescente (a) e decrescente (b) de concentração. Os dados foram obtidos a partir do amperograma da Fig. 3.12 (1,35 V/ 50 ms) usando a seguinte equação: $I_{\text{AS}} = I_{+1,35 \text{ V}} - (fator \times I_{+0,9 \text{ V}})$.

Figura 3.15 – Página 70: Amperogramas obtidos através do estudo de repetibilidade com 10 injeções de 40 e 65 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AA e AS, respectivamente, com o uso de agitador mecânico. Pulso de potencial de limpeza: 0,0 V/300 ms. Eletrólito tampão ácido acético/acetato 0,10 mol L^{-1} (pH 4,7). Velocidade de injeção: 30 $\mu\text{L s}^{-1}$. Volume de injeção: 150 μL .

Figura 3.16 – Página 71: Amperogramas obtidos a partir de injeções de soluções padrão contendo (a) AA 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e concentrações crescentes de AA + AS, respectivamente (b) 30 e 50, (c) 40 e 65; (d) 50 e 80; (e) 60 e 100; (f) 70 e 115; (g) 80 e 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Pulso de potencial de limpeza: 0,0 V/300 ms. Eletrólito: tampão HAc/Ac⁻ 0,10 mol L^{-1} (pH 4,7). Velocidade de injeção: 30 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado: 150 μL .

Figura 3.17 – Página 72: Curvas analíticas obtidas para AA (a) e AS (b). Os dados foram obtidos a partir dos amperogramas da Figura 3.16.

Figura 3.18 – Página 74: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução amostra convenientemente diluída (a) e três adições sucessivas de alíquotas de uma solução padrão contendo, respectivamente, AA e AS: (b) 25 e 40; (c) 50 e 80; (d) 75 e 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Frequência: 20 Hz; Amplitude: 4 mV; Incremento de potencial: 4 mV; Potencial de pré-tratamento: 0,0 V/ 10 s; Eletrodo de trabalho: DDB; Eletrólito: Tampão HAc/Ac⁻ 0,1 mol L⁻¹

Figura 3.19 – Página 75: Gráficos de regressão linear obtidas para uma amostra simulada contendo AA (a) e AS (b). Os dados foram obtidos da Fig. 3.19.

RESUMO

No presente trabalho foi investigada uma metodologia simples, de baixo custo e com alta frequência analítica para determinação simultânea ácido ascórbico (AA) e ácido acetilsalicílico (AAS) em comprimidos efervescentes. A metodologia desenvolvida é baseada na Análise por Injeção em Fluxo com detecção por Amperometria de Múltiplos Pulsos (FIA-AMP) e diamante dopado com boro (DDB) como eletrodo de trabalho .

O AA apresentou pico de oxidação máximo próximo a 0,9 V e o ácido salicílico (AAS hidrolisado) próximo 1,35 V (tampão ácido acético/ acetato; pH 4,7). A estratégia usada na quantificação simultânea dos dois fármacos por FIA-AMP foi a seguinte:

- (1) +0,9 V/50ms: oxidação e quantificação seletiva de AA:
- (2) +1,35 V/50ms: oxidação de ambos os analitos (AA e AS) e quantificação de AS através da subtração da corrente detectada nos dois pulsos de potenciais mediante o uso de um *fator de correção*, pois o AA não apresenta a mesma magnitude de sinal em ambos os pulsos de potencial ($fator = I_{AA \text{ em } +1,35 \text{ V}} / I_{AA \text{ em } +0,9 \text{ V}}$). A corrente proveniente da oxidação do AS é obtida com a seguinte equação:
$$I_{AS} = I_{1,35 \text{ V}} - (I_{0,9 \text{ V}} \times fator)$$

- (3) 0,0 V/300 ms: potencial aplicado para constante limpeza eletroquímica do eletrodo de DDB;

O método proposto apresentou faixa linear de resposta entre 10 e 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e entre 16 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AA e AS, respectivamente. O estudo de repetibilidade ($n = 10$) demonstrou que o método é estável com um desvio padrão relativo (DPR) calculado em 0,5 %. A frequência analítica do método é de 125 injeções h^{-1} com um limite de detecção de 174 e 164 nmol L^{-1} de AA e AAS, respectivamente. Os resultados obtidos foram comparados aos obtidos por HPLC,

sendo que foi verificado que ambos os métodos apresentaram resultados similares (*teste t*) e precisões equivalentes (*teste F*), considerando um nível de confiança de 95%.

Estudos complementares para determinação simultânea de AA e AAS também foram realizados usando Análise por Injeção em Batelada (BIA) e voltametria de onda quadrada (SWV).

ABSTRACT

The present study investigated a simple, low-cost and, high analytical frequency method for simultaneous determination of ascorbic acid (AA) and acetylsalicylic acid (ASA) in pharmaceutical formulations. The methodology is based on flow injection analysis with multiple-pulse amperometric detection (FIA-MPA) using boron-doped diamond (BDD) as working electrode.

The oxidation current peak of AA reaches a maximum near to 0.9 V and for salicylic acid (hydrolyzed AAS) near to 1.35 V (acetic acid/acetate buffer; pH = 4,7). The strategy used for simultaneous determination of the two compounds by FIA-MPA was the following:

- (1) +0.90 V/50 ms: AA oxidation and its selective quantification;
- (2) +1.35 V/50 ms: Oxidation of both AA and AS compounds. AS can be then quantified by subtraction of the currents obtained from both potential pulses (using a correction factor), because the oxidation currents of AA are not the same at both potential pulses. The current from the oxidation of AS is obtained from the following equations:

$$factor = I_{AA+1.35\text{ V}}/I_{AA+0.9\text{ V}}$$

$$I_{AS} = I_{1.35\text{ V}} - (I_{0.90\text{ V}} \times factor)$$

- (3) +0.00 V/300 ms: applied to avoid contamination of the working electrode surface.

The proposed method presented linear range response between 10 and 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and between 16 and 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for AA and AS, respectively. The repeatability study (n = 10) demonstrated that the method is stable with the RSD equal to 0.5 %. The analytical frequency was estimated to be 125 injections per hour and the limit of detection of 174 and 164 nmol L^{-1} for AA and AAS, respectively. Results were compared to those obtained by an HPLC method and statistical analysis was used to compare these results. At a 95% confidence

level it was verified that both methods showed similar results (Student's *t*-test) and equivalent accuracies (*F test*).

Additional studies for simultaneous determination of AA and AAS were also carried out using Batch Injection Analysis (BIA) and Square Wave Voltammetry (SWV).

SUMÁRIO

| | |
|---|-------|
| Lista de abreviações | iv |
| Índice de tabelas | vi |
| Índice de figuras | vii |
| Resumo | xi |
| Abstract | xiii |
| Sumário | xv |
| Introdução e objetivos do trabalho | 1 |
| 1.1 - Fármacos estudados | 2 |
| 1.1.1 - Ácido Acetil Salicílico | 3 |
| 1.1.1.1 - Tratamento em que AAS é indicado | 4 |
| A) Inflamação | 4 |
| B) Artrite reumatóide | 5 |
| C) Trombose | 5 |
| 1.1.2 - Ácido Ascórbico | 6 |
| 1.1.2.1 - Tratamento em que AA é indicado | 7 |
| A) Anemia Ferropriva | 7 |
| B) Estresse Oxidativo | 7 |
| 1.2 - Determinação de AA e AAS | 8 |
| 1.3 – Técnicas e procedimentos explorados no trabalho | 10 |
| 1.3.1 - Análise por injeção em fluxo | 10 |
| 1.3.2 – Amperometria | 12 |
| 1.3.3 – Amperometria de múltiplos pulsos | 15 |

| | |
|--|----|
| 1.3.4 - Voltametria cíclica | 16 |
| 1.3.5 - Eletrodo de diamante dopado com boro | 17 |
| 1.3.5.1 - Análises eletroquímicas de fármacos empregando DDB como eletrodo de trabalho | 22 |
| 1.4 – Objetivos | 28 |
| 1.1.4 – Objetivos específicos | 28 |
| Procedimentos experimentais | 30 |
| 2.1 – Reagentes, soluções e amostras | 31 |
| 2.1.1 - Solução tampão ácido acético (Ac^-) 0,2 mol L^{-1} | 31 |
| 2.1.2 – Solução de hidróxido de sódio 0,2 mol L^{-1} | 31 |
| 2.1.3 – Solução estoque de AAS 0,01 mol L^{-1} hidrolisado | 31 |
| 2.1.4 – Solução estoque de AA 0,01 mol L^{-1} | 32 |
| 2.1.5 – Preparo da solução tampão Britton-Robbinson | 32 |
| 2.1.6 – Solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L^{-1} | 32 |
| 2.1.7 – Preparo das soluções amostras | 33 |
| 2.2 -Instrumentação | 34 |
| 2.2.1 – Análises eletroquímicas | 34 |
| 2.2.1.1 - Célula eletroquímica | 34 |
| 2.2.1.2 – Eletrodo de referência | 36 |
| 2.2.1.3 – Eletrodo de trabalho | 36 |
| 2.2.1.4 – Eletrodo auxiliar | 37 |
| 2.2.1.5 – Sistema FIA | 37 |
| 2.2.1.6 - Sistema BIA | 39 |
| 2.2.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) | 40 |
| 2.3 – Metodologia | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.1 – Estudo do comportamento eletroquímico do AA e AS usando DDB como eletrodo de trabalho | 39 |
| 2.3.2 – Estudo de repetibilidade | 41 |
| 2.3.3 – Limite de detecção e quantificação | 41 |
| 2.3.4 – Estudo de adição e recuperação | 42 |
| Capítulo 3 - Resultados e discussão | 43 |
| 3.1 – Estudo do comportamento eletroquímico do AA e AS sobre o eletrodo DDB | 44 |
| 3.2 – Estudo da resposta eletroquímica do AA e AS em FIA com detecção amperométrica usando DDB como eletrodo de trabalho | 47 |
| 3.3 – Estudos para identificação dos pulsos de potenciais que possibilitem a análise simultânea de AA e AS em FIA/AMP | 50 |
| 3.4 – Estudo da repetibilidade | 52 |
| 3.5 – Estudos para a identificação da faixa linear de resposta entre concentração e corrente de oxidação de AA e AS | 56 |
| 3.6 – Curvas analíticas para determinação simultânea de AA e AAS | 62 |
| 3.7 – Limites de detecção e quantificação | 66 |
| 3.8 - Análise do comprimido efervescente contendo AA e AAS | 66 |
| 3.9 - Estudos complementares | 69 |
| 3.9.1 - Análise por injeção em batelada (BIA) | 69 |
| 3.9.1.1 - Breve introdução sobre a técnica | 69 |
| 3.9.1.2 - Aplicação da técnica neste trabalho | 70 |
| 3.9.2 – Análise simultânea de AA e AAS por voltametria de onda quadrada | 74 |
| Capítulo 4- Conclusões | 77 |
| 4.1 – Conclusões | 78 |
| Capítulo 5 - Referências bibliográficas | 80 |

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO

1.1 – Fármacos estudados

O ácido acetilsalicílico (AAS) ou aspirina e ácido ascórbico (AA) ou vitamina C são princípios ativos presentes simultaneamente em algumas formulações farmacêuticas disponíveis no mercado. Geralmente, estes medicamentos são indicados para o alívio de sintomas de gripes e resfriados. O primeiro atua como antiinflamatório e o segundo, pertencente à classe das vitaminas essenciais, age como auxiliar na produção de células de defesa [1]. As contra-indicações dessa associação de fármacos se devem unicamente à presença do AAS, uma vez que a toxicidade do AA é baixa por essa vitamina não ser completamente absorvida quando ingerida em grandes doses, sendo rapidamente excretada pela urina [2].

Várias hipóteses são aceitas para explicar o mecanismo da reação adversa gástrica da aspirina, incluindo sua acumulação nas células mucosais, alteração de permeabilidade das células de membrana devido ao efeito íon trapping (armadilha iônica) e difusão do íon H^+ do lúmen gastrointestinal, inibição da prostaglandina E_2 levando à estimulação de ácido gástrico e secreção da pepsina, lesão de microvasos e formação de radicais livres devido à ativação de neutrófilos [3]. Ademais, até o momento não foram identificadas interações medicamentosas negativas na associação dessas duas substâncias.

Damman *et. al.*, em 2003, fizeram um estudo em que foram avaliadas pessoas saudáveis por meio de esofagogastroduodenoscopia e determinação de hemoglobina, antes e depois do uso de medicamentos contendo aspirina, por quatro dias. Os participantes foram divididos igualmente em quatro grupos: alguns fizeram uso de formulação comercial de AAS tamponada sem associação, outros de AAS não tamponada sem associação, outros de AAS não tamponada associada à paracetamol e cafeína, e alguns fizeram uso de formulação

tamponada de AAS associada a ácido ascórbico (aspirina C efervescente). Nos participantes do último grupo foi verificado um menor número de lesões gástricas, menor número de petéquias e microsangramento na mucosa entérica, quando comparado aos demais [3].

Além disso, segundo Candelario-Jalil *et. al* (2006), há eficácia no tratamento anti-inflamatório de AAS em pequenas doses, quando combinado com AA, que por sua vez, também apresenta os benefícios de um fármaco antioxidante [4].

Nos comprimidos efervescentes, os excipientes diluentes dessas duas substâncias são hidrogeno carbonato de sódio, manitol, ácido cítrico, sorbitol, polivinilpirrolidona, lactose, flavorizante sabor limão, ácido adípico e sacarina sódica.

1.1.1 – Ácido Acetil Salicílico (AAS)

Esse fármaco apresenta-se na forma de pó cristalino ou cristais incolores a brancos. Inodoro ou quase inodoro. Solúvel em 1:300 de água e 1:5 em álcool. Possui maior solubilidade em hidróxidos alcalinos, uma vez que a hidrólise descarboxila o H^+ , tornando-se iônico e, portanto, facilmente solúvel em água. A massa molecular do AAS é de 180,16 g mol^{-1} [1,5].

Desde o início do século vinte, depois de ter sido sintetizado em 1897 por Felix Hoffman [5], o AAS é amplamente utilizado como antiinflamatório. Pertence à classe dos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs). Sua principal atividade é a inativação não seletiva da ciclooxigenase (COX) por acetilação irreversível. Essa enzima é catalisadora da transformação do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxano, ambos prostanóides. Prostaglandinas são os mediadores mais importantes do processo de inflamação. Os principais efeitos do tromboxano consistem em agregação plaquetária e vasoconstrição [6, 7]. A estrutura química do AAS é apresentada na Figura 1.1.

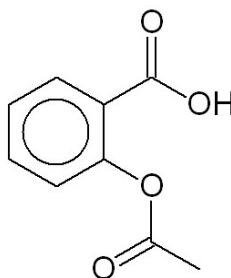


Figura 1.1: Fórmula estrutural do ácido acetil salicílico (AAS)

O AAS é indicado no alívio de sintomas de gripes e resfriados, febre, dores no corpo, no tratamento da artrite reumatóide e na prevenção da formação de trombos. Porém, por não ser um AINE inibidor seletivo da COX-2, inibe também a enzima COX-1 que sintetiza prostaglandinas responsáveis por protegerem a mucosa gástrica. Além das lesões gástricas, doses elevadas podem ocasionar salicilismo, caracterizado por reações adversas como tontura, surdez e zumbido. Está também ligada a um tipo de encefalite (síndrome de Reye) quando administrada em crianças com infecções virais. Portanto, seu uso deve ser avaliado principalmente em crianças, idosos e pessoas com úlcera gástrica [7].

1.1.1.1 – Tratamentos em que AAS é indicado

A) Inflamação

Inflamação ou flogose (do latim *inflamare* e do grego *phlogos*, que significam pegar fogo) é uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor. É caracterizada pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício. Embora, em geral, constitua um mecanismo defensivo muito importante contra inúmeras agressões, em muitos casos a reação inflamatória pode causar danos ao organismo [8].

O agente agressor que desencadeia a inflamação pode ser, entre outros: mecânico, térmico, químico ou microbiológico. Esse último é também chamado agente infeccioso, e pode ocasionar infecção com diferentes gravidades e formas de contágio.

Os sinais e sintomas são caracterizados pelo quinteto: rubor, calor - devido ao aumento da intensidade de irrigação dos vasos e capilares no local atingido, tumor (inchaço) – em função da exsudação plasmática, dor – por atingir e comprimir os nervos locais, e disfunção dos órgãos – esse último ocorre como forma de poupar esforços do local atingido durante os processos de regeneração e cicatrização.

B) Artrite reumatóide

As alterações articulares na maioria dos casos representam uma reação auto-imune e consistem em inflamação, proliferação da membrana sinovial e erosão da cartilagem do osso. Os medicamentos indicados para esse tratamento incluem AINEs e, em casos mais graves, agentes imunossupressores [7].

C) Trombose

A inativação inadequada dos mecanismos hemostáticos, como a secreção inapropriada de tromboxano, entre outros mediadores, pode causar trombose venosa que é associada à ocorrência de estase do sangue, ou trombose arterial que geralmente é associada à aterosclerose. Parte do trombo pode desprender-se, e alojar-se mais adiante, causando isquemia ou infarto agudo do miocárdio [8]. A posologia comum de administração da aspirina para essa enfermidade é de 100 mg (um quarto do usual no caso de inflamação) uma vez ao dia, uso contínuo.

1.1.2 – Ácido Ascórbico

O L-ácido ascórbico ou 3-oxo-L-gulofuranolactona (AA) ou vitamina C é uma cetolactona de seis carbonos, com massa molecular igual a $176,1 \text{ g mol}^{-1}$. Sua matéria-prima contém não menos que 99% e não mais que 100,5 % de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, de acordo com a Farmacopéia Americana 32ª edição [1, 6, 9, 10]. A estrutura química do AA é apresentada na Figura 1.2.

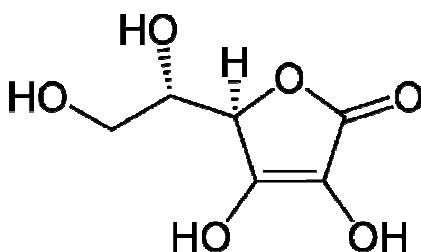


Figura 1.2: Fórmula estrutural do ácido ascórbico (AA)

A substância se apresenta como pó cristalino levemente amarelado ou cristais incolores a brancos, inodoro ou quase inodoro, solúvel em 1:3 de água, fotossensível, e sua solução aquosa se degrada (oxidação) rapidamente em contato com o ar [6, 11].

A vitamina C é também utilizada na hidroxilação de várias reações bioquímicas, sendo um cofator para a biossíntese de vários aminoácidos (entre eles triptofano), proteínas (colágeno), lipídios, carboidratos, ácido fólico e algumas catecolaminas como norepinefrina e serotonina. Também é um agente redutor que converte os radicais livres do oxigênio na forma singlete, a formas inertes. Devido à sua ação antioxidante, é também amplamente utilizado como conservante natural em produtos farmacêuticos e alimentícios [12].

1.1.2.1 – Tratamentos em que AA é indicado

A) Anemia Ferropriva

A molécula é um nutriente necessário à hematopoiese por estimular a absorção do ferro, em parte pela formação de quelatos solúveis e, em parte, através da redução do Fe^{3+} na sua forma ferrosa mais solúvel. Sua deficiência, portanto, causa a anemia [13].

B) Estresse oxidativo

O estresse oxidativo refere-se a condições de excitotoxicidade como hipóxia. É resultado da excessiva produção de espécies químicas reativas, como radicais livres de hidrogênio ou hidroxila ou peróxido de hidrogênio. Eles podem também ser produzidos como um subproduto de outras vias bioquímicas incluindo a síntese de óxido nítrico (NO) e o metabolismo do ácido araquidônico. Quando não controladas, as espécies reativas danificam muitas moléculas-chave como enzimas, lipídeos de membrana e o DNA. O AA interage com essas espécies tornando-as inertes [8].

1.2 – Determinação de AAS e AA

Conforme descrito nas farmacopéias Britânica (BP), Brasileira, Americana (USP), entre outras, tabletes contendo AAS ou AA não devem apresentar menos que 90% e não mais que 110% da quantidade indicada na bula [1]. A metodologia padrão indicada na análise de AAS descrita nos mesmos compêndios farmacêuticos oficiais é por espectrofotometria no infravermelho, após conversão a salicilato em meio de hidróxido de sódio [10].

Os compêndios farmacêuticos oficiais não apresentam a descrição da associação específica de AAS e AA, bem como a indicação de algum método para a determinação simultânea de ambos. Apenas cita o seguinte: tabletes efervescentes contendo AAS e mistura de ácidos orgânicos e um metal alquil carbonato ou bicarbonato. Neste caso, a preparação da amostra e o método indicado para a análise é o mesmo descrito no tópico próprio da aspirina, o qual descreve que o espectro de absorção da amostra no infravermelho (dispersa em brometo de potássio) apresenta máximos de absorção nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas daqueles observados no espectro de AAS SQR (substância química de referência) preparado de maneira idêntica [1,14].

Alguns métodos que possibilitam a quantificação simultânea de AAS e AA foram disponibilizados na literatura. Até o momento, segundo nosso conhecimento, as técnicas empregadas para este fim foram espectrometria (com tratamento quimiométrico) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Sena *et al.*, em 2000, demonstraram a possibilidade da determinação simultânea de AA e AAS por espectrometria no ultra-violeta e calibração multivariada usando regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Os estudos de adição e recuperação apresentaram resultados entre 98 e 104 %. Segundo os autores, o método também permite a detecção da presença de traços do produto de degradação do AAS (ácido acetilsalicílico), além de permitir estimar os pKas dos ácidos estudados (AAS e AA) [15].

Merckle *et al.*, em 1998, utilizaram a espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS) para determinar aspirina em três diferentes formulações farmacêuticas (AAS sem associação, AAS em combinação com ácido ascórbico e AAS em combinação com ácido ascórbico e paracetamol). As três formulações foram analisadas em tabletes intactos usando transmitância e reflectância difusa e em tabletes macerados usando somente reflectância difusa. A calibração foi realizada pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS) usando

os espectros de segunda ordem. Os resultados obtidos foram similares aos obtidos por HPLC, mas com vantagens em relação à simplicidade, rapidez, não requerer reagentes nocivos à saúde e permitir a análise sem destruição da amostra. [16].

Erdal Dinc, um pesquisador da Universidade de Ankara (Turquia) publicou cinco trabalhos onde o foco principal foi a determinação simultânea de AA e AAS ou de AA, AAS e paracetamol [17-20]. Em todos os trabalhos, o autor usou a técnica de espectrofotometria, sendo que a diferença entre os estudos está no método quimiométrico empregado no tratamento dos dados. Nesses trabalhos foi demonstrada a possibilidade do uso da calibração espectral multivariada [18], da transformação wavelet discreta e regressão pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS) [16,19], transformada wavelet contínua com razão espectral e com razão espectral derivativa [17] e empregando wavelets do tipo Haar e Chapéu Mexicano com divisor duplo de espectro [20]. Os limites de detecção foram calculados em 1,7 e 1,6 mg L⁻¹ para AA e AAS, respectivamente, sendo que este resultado somente foi disponibilizado no artigo publicado no JBCS em 2008 [20]. Estudos de adição e recuperação foram apresentados na maioria dos trabalhos, sendo que em todos os casos, os resultados obtidos ficaram próximos a 100 %. Em nenhum destes trabalhos, os resultados obtidos foram comparados aos obtidos por HPLC. No entanto, os métodos propostos são apresentados como alternativas (menor custo e maior rapidez) ao uso da cromatografia líquida em análises de rotina.

Toral *et al.*, em 2001, propuseram um método espectrofotométrico empregando derivada de primeira ordem para determinação simultânea de AA e AAS em formulações farmacêuticas. O método permitiu a determinação simultânea desses fármacos na faixa de concentração entre $6,6 \times 10^{-6}$ a $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AAS e $3,4 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AA. O limite de detecção foi calculado em 1,0 e $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de AA e AAS,

respectivamente. Os resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação ficaram entre 98 e 103 % [21].

Em 1998, Dogan *et al.*, descreveram um método espectrofotométrico com derivada de primeira ordem para determinação simultânea de AAS, AA e paracetamol em medicamentos. Conforme consta no abstract do trabalho, os resultados obtidos foram comparados aos obtidos por HPLC. No entanto, não temos a informação sobre a similaridade dos resultados (sem acesso ao texto completo) [22].

Kmetec *et al.*, em 1992, propuseram uma metodologia de análise simultânea de AA, AAS e paracetamol em medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os autores concluem que o método aparenta ser mais conveniente do que os métodos descritos na farmacopéia britânica para análise de cada um desses três fármacos separadamente [23].

1.3 – Técnicas e procedimentos explorados no trabalho

1.3.1 —Análise por injeção em fluxo

Análise por injeção em fluxo (do inglês, “Flow Injection Analysis” - FIA) baseia-se na inserção de uma alíquota da solução amostra ou padrão em um percurso analítico (tubulação), a qual sofre dispersão ao ser conduzida através deste percurso analítico por uma solução transportadora, que pode ser o próprio reagente ou eletrólito, até o detector.

Este procedimento de análise foi descrito pela primeira vez em 1975 por Růzicka & Hansen [24]. Desde então, em torno de 10.000 artigos científicos relacionados ao tema já foram publicados [25-27]. Seu reconhecimento ou sucesso se deve à versatilidade do procedimento que possibilita a execução em linha de etapas de pré-tratamento da amostra

(etapa muitas vezes tediosa em procedimentos de batelada). Além disso, sendo um sistema fechado, inclui vantagens como minimização de contaminações, tanto das amostras como do operador, alta frequência analítica, boa precisão, economia de reagentes e facilidade de associação a detectores diversos [28-31].

Basicamente, um sistema FIA pode ser dividido em quatro componentes: propulsão do fluido ou do eletrólito transportador, injeção da amostra, reação em linha ou transporte da solução e detecção.

O sistema de propulsão comumente usado em sistemas FIA faz uso de bombas peristálticas. O uso difundido destes equipamentos deve-se a algumas características, como: robustez, controle de vazão em um amplo intervalo e em vários canais simultaneamente, possibilidade de impulsionar e aspirar soluções e simplicidade de uso. Como limitação pode ser citada o ruído gerado na linha base pela pulsação do fluido transportador, o que é particularmente importante quando detectores amperométricos ou voltamétricos (sensíveis à vazão) são usados. Em função disto, alternativas ao emprego de bombas peristálticas em sistemas FIA foram investigadas por pesquisadores da área de eletroquímica sendo que o uso de mini-compressores de ar do tipo bomba de diafragma foi empregados com sucesso para impulsionar soluções em sistemas de análise em fluxo [32]. Baixo custo e geração de uma vazão isenta de pulsação, podem ser consideradas as principais características deste sistema. A alteração na vazão em função da variação na tensão da rede elétrica e do aquecimento do mini-compressor com o tempo de uso podem ser consideradas limitações do sistema. Posteriormente, estas limitações foram contornadas mediante a adaptação de uma coluna de água ao sistema (controle da vazão sem aquecimento da bomba) [33].

Outra etapa ou componente de um sistema FIA é a injeção. O injetor insere a solução amostra ou padrão ao percurso analítico contendo o fluido ou eletrólito transportador adequado. Růzicka & Hansen, em 1988 [24], descreveram um injetor de válvula giratória, o

qual foi e ainda é utilizado em vários trabalhos. Pesquisadores do CENA/USP (Piracicaba/SP) desenvolveram um injetor constituído por duas peças de acrílico dispostas paralelamente, fixas numa base de aproximadamente 50 a 100 cm², e entre elas uma peça central, que por movimentos adequados para frente e para trás, abre e fecha os pequenos canais de coleta e promove a inserção da amostra no percurso analítico [34].

Em relação à detecção, num primeiro momento, os trabalhos que empregavam FIA foram desenvolvidos acoplados a detectores de absorção molecular. Posteriormente, uma diversidade de detectores foi explorada, entre eles: absorção atômica, fluorescência, quimiluminescência, potenciometria, voltametria e amperometria, entre outros. Entre estes, os detectores eletroquímicos se destacam quando os analitos apresentam eletroatividade, pois a sensibilidade e a seletividade da análise são na maioria das vezes comparáveis aos espectrofotométricos. O baixo custo da instrumentação e a simplicidade nas etapas de preparação de amostras podem ser considerados vantagens adicionais. Em casos especiais, há possibilidade de pré-concentração de espécies sobre a superfície dos eletrodos, tanto pelos processos de adsorção como de eletrodeposição (oxidação ou redução) [34].

1.3.2 – Amperometria

O desenvolvimento da instrumentação eletroanalítica desencadeou o crescimento da utilização de técnicas de detecção eletroquímicas, tais como: a voltametria de onda quadrada (SWV), a voltametria de pulso diferencial (DPV) e a amperometria, com as quais é possível a aquisição de dados com sensibilidade comparável à obtida com o emprego de técnicas cromatográficas de separação e detecção [35]. Dentre essas técnicas, a amperometria é a mais utilizada e comumente acoplada a sistemas em fluxo.

A técnica se destaca em comparação aos métodos voltamétricos convencionais (estacionários) devido à maior sensibilidade em função do incremento no transporte de massa devido ao fluxo da solução (convecção), menor efeito de contaminação da superfície do eletrodo de trabalho devido ao curto tempo de contato da amostra e dos produtos do processo redox com o eletrodo e, principalmente, estabilidade e reprodutibilidade devido à virtual ausência de corrente capacitiva, quando em potencial constante (amperometria convencional), pois a corrente capacitiva cai rapidamente em função do tempo. Isso favorece medições de baixíssimas correntes (e consequentemente, de baixas concentrações).

Assim como na voltametria, na amperometria, três eletrodos são normalmente empregados: trabalho, referência e auxiliar (ou contra-eletrodo). Portanto, a célula é constituída de três eletrodos imersos em uma solução contendo o analito e também um excesso (+ de 50 vezes) de um eletrólito não reativo chamado eletrólito suporte. O eletrodo de trabalho é o dispositivo no qual o analito é oxidado ou reduzido. Neste eletrodo, o potencial é controlado através da aplicação de uma diferença de potencial (constante ou variável em função do tempo) entre o eletrodo trabalho e de referência. Como o potencial no eletrodo de referência é constante e conhecido, independentemente da composição da solução contendo o analito, a diferença de potencial aplicado ao eletrodo de trabalho também passa a ser conhecido. No entanto, para que o potencial no eletrodo de referência permaneça constante, este eletrodo deve operar na ausência de corrente, o que é obtido mediante o uso do eletrodo auxiliar. Assim, a corrente de eletrólise flui entre o eletrodo de trabalho e auxiliar e o controle de potencial é estabelecido entre o eletrodo de trabalho e de referência. No eletrodo auxiliar ocorre, normalmente, a reação redox da água, que é contrária à reação redox que ocorre no eletrodo de trabalho durante a aplicação do potencial elétrico. Assim, quando o eletrodo de trabalho é o anodo, o auxiliar é o catodo e vice-versa [35].

A principal limitação da amperometria convencional (aplicação de um potencial constante) é comum às demais técnicas voltamétricas, e diz respeito à falta de estabilidade do sinal eletroquímico em função do tempo quando determinados compostos são analisados. A estabilidade do sinal eletroquímico é governada pela taxa de transferência de carga (elétrons) entre o eletrodo e a espécie eletroativa (presente na interface eletrodo-solução), que por sua vez depende das condições da superfície do eletrodo. No emprego de eletrodos de trabalho sólidos, a superfície do eletrodo pode ser gradativamente modificada (de modo irreversível ou quase irreversível) durante a análise, devido à adsorção do composto envolvido no processo eletroquímico ou de subprodutos de reações. Ocorre, portanto, a contaminação ou passivação gradativa do eletrodo de trabalho durante a análise [34].

Porém, é importante mencionar que por não se tratar de um sistema estacionário, e sim, de um sistema em fluxo, a FIA acoplada à detecção amperométrica minimiza o problema de passivação (em relação a sistemas estacionários), pois a amostra permanece em contato com o eletrodo por um tempo muito reduzido (sinais transientes). Além disso, o volume de amostra injetado normalmente é pequeno (em geral na ordem de microlitros).

Apesar disto, dependendo do tipo de analito e de sua concentração (mais comum em altas concentrações), os sistemas FIA também apresentam problemas relacionados com a contaminação ou passivação da superfície do eletrodo em função do tempo de uso. A adsorção rápida de produtos da reação redox podem passivar o eletrodo, mesmo em técnicas em fluxo. Diversos artifícios são usados visando evitar o problema de contaminação da superfície do eletrodo de trabalho a começar pela escolha do eletrodo de trabalho adequado de acordo com a natureza da espécie envolvida na reação de oxidação ou redução ou a realização da limpeza da superfície do eletrodo por polimento mecânico. Outro artifício usado é a periódica limpeza eletroquímica com a aplicação de um pulso de potencial de limpeza durante o experimento (amperometria pulsada) [36]. Recentemente foi proposta por Gimenes *et al*

[37], a adição de um padrão interno à solução amostra e solução padrão a ser injetada, pois no caso da contaminação, há decréscimo gradativo do pico de corrente em todas as espécies envolvidas. Considera-se, portanto, o valor da razão entre o sinal da espécie analítica pelo do padrão interno. Mesmo com a contaminação ou passivação gradativa do eletrodo de trabalho, a razão continua a ser constante, pois o decréscimo ocorre em ambos os sinais [37].

1.3.3 – Amperometria de múltiplos pulsos

A detecção amperométrica acoplada a sistemas em fluxo também pode ser implementada no modo pulsado, onde pulsos de potenciais são aplicados ao eletrodo de trabalho sequencialmente e continuamente, em função do tempo. Esse modo de detecção é conhecido na literatura como detecção amperométrica pulsada, representada pela sigla PAD, do inglês “Pulsed Amperometric Detection”. A PAD geralmente contorna de forma simples as limitações da detecção amperométrica convencional em relação à estabilidade do sinal eletroquímico em função do tempo. Esta técnica permite que a resposta do eletrodo apresente estabilidade por um período de tempo maior devido à periódica limpeza eletroquímica realizada durante o experimento, evitando ou diminuindo a contaminação da superfície do eletrodo [37].

A técnica PAD é disponibilizada em diversos softwares comerciais de potenciostatos do mercado. O número de pulsos de potenciais aplicáveis varia entre os diferentes equipamentos comercializados (mínimo de dois até seis pulsos de potenciais). Porém, a aquisição do sinal de corrente é normalmente restrita a um único pulso de potencial. Uma alternativa bastante vantajosa a esta técnica somente é disponibilizada (segundo nosso conhecimento) pelo software que controla os potenciostatos comercializados pela empresa Metrohm - Eco Chemie (software GPES). Este software permite a aplicação de até 10 pulsos

de potenciais com a possibilidade de aquisição da corrente em função do tempo em cada pulso de potencial (o que corresponde à aquisição de 10 amperogramas distintos “simultaneamente”). A técnica é conhecida como Amperometria de Múltiplos Pulsos, representada pela sigla MPA, do inglês “Multiple Pulse Amperometry”. O tempo mínimo de aplicação de cada pulso é de 30 ms (limitação do software).

Na literatura são descritos diversos trabalhos que aplicam a detecção MPA ou PAD associados a sistemas em fluxo, com a finalidade de melhorar o desempenho de métodos analíticos empregados em amostras de origens diversas. Grande parte dessas aplicações tem o intuito de realizar a limpeza e/ou ativação da superfície do eletrodo de trabalho. Ainda que pouco explorada, alguns artigos descrevem a utilização da MPA em FIA para detecção indireta ou simultânea de analitos eletroativos. Informações sobre as recentes aplicações da técnica de amperometria de múltiplos pulsos, assim como alguns aspectos teóricos relevantes e pouco explorados na literatura sobre esta técnica podem ser localizados em um artigo de revisão aceito para publicação na revista Química Nova [34] e em trabalhos do grupo onde este estudo foi desenvolvido [38].

1.3.4 - Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica em que se estuda a relação corrente potencial em uma célula eletrolítica apropriada quando submetida a uma varredura de potencial cíclico e linear. A célula voltamétrica normalmente consiste de três eletrodos, como na amperometria, imersos em uma solução da espécie eletroativa de interesse, contendo excesso de eletrólito inerte, responsável por diminuir a resistência da solução e garantir que os fenômenos de migração e difusão das espécies de interesse sejam constantes. Os três eletrodos estão conectados a um potenciostato que aplica potenciais num intervalo pré-definido e faz

aquisição do sinal de corrente. O sinal de corrente registrado dá origem ao voltamograma, que se trata de uma curva de corrente *vs* potencial.

O gráfico gerado usando a técnica de voltametria cíclica (voltamograma cíclico) indica em que região de potencial ocorre determinada reação de oxidação ou redução da espécie de interesse. Além disto, fornece também informações a respeito de: reversibilidade do sistema eletroquímico, quantidade de elétrons envolvidos; possível formação de espécies intermediárias; parâmetros cinéticos através da variação da velocidade de varredura; e do processo em que espécies interagem com a superfície do eletrodo (adsorção ou difusão). Devido a estas características, essa técnica normalmente é o primeiro experimento realizado quando se deseja estudar o comportamento eletroquímico de um composto ou a superfície do eletrodo.

Um sensor amperométrico mede corrente em um potencial aplicado fixo, o que corresponde a um ponto da curva de corrente-potencial, enquanto que um sensor voltamétrico registra vários pontos em uma região selecionada do perfil corrente potencial. Pode-se considerar, então, que um sensor amperométrico é um sensor voltamétrico com a aplicação de um potencial fixo [27].

1.3.5 – Eletrodo de Diamante Dopado com Boro

As respostas obtidas pelas técnicas eletroquímicas são relacionadas às reações redox que ocorrem na interface eletrodo-solução de maneira que o analito de interesse interaja com a superfície eletródica, resultando na transferência de elétrons. Assim sendo, a escolha do material do eletrodo de trabalho é de grande importância, devendo ser levado em conta algumas informações a ele relacionadas, como: razão sinal-ruído, reprodutibilidade em função do tempo, intensidade das correntes residuais, janela de potencial de trabalho, condutividade

elétrica, reprodutibilidade da superfície, propriedades mecânicas, além do custo da fabricação, disponibilidade e toxicidade [39, 40].

Há vários tipos de materiais à base de carbono utilizados como eletrodos de trabalho, tais como: carbono pirolítico, carbono vítreo, pasta de carbono, nanotubos de carbono, diamante dopado com boro (DDB), etc. Estes materiais apresentam algumas vantagens, como: ampla janela de potencial de trabalho, razoável inércia química e facilidade na modificação de sua superfície [40].

A descoberta de que o diamante é constituído apenas de carbono se deu por volta de 1772, por Antoine Lavoiser [39]. Este cristal é de grande interesse para diferentes áreas tecnológicas, devido a propriedades exclusivas que possui, tais como: alta dureza e densidade atômica, capacidade de isolamento elétrico, alta condutividade térmica e força de flexão [42, 44].

Em função dessas características, desde o final do século 19, vários estudiosos tentavam sintetizar o diamante, sendo que a façanha somente foi conseguida em 1950, por pesquisadores da empresa *General Electric* através de um método de altas pressões e temperaturas (HPHT – High pressure high temperature). Porém, seu alto custo impossibilitou a produção em larga escala. Na mesma década, um pesquisador da *Union Carbide* conseguiu sintetizar filmes de diamante a um custo bem inferior, por decomposição química a vapor (CVD – chemical vapor deposition) usando um fluxo de metano sobre uma grade de diamante aquecida. A Figura 2.1 apresenta um esquema da produção de diamante por CVD [39]. Esse método baseia-se em produzir hidrogênio atômico e ativar uma fonte carbonácea gasosa produzindo um precursor de carbono sp^3 nas proximidades de um substrato. Na escolha do substrato deve ser considerado a tolerância a temperaturas maiores do que 700 a 900° C e a similaridade do coeficiente de expansão térmica com o diamante ($1,1 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$). Os substratos mais empregados para síntese de filmes de diamante são: silício, molibdênio,

coeficiente de fricção, extraordinária estabilidade morfológica e micro-estrutural a altas temperaturas (em torno de 180° C) e alta resistência química [49].

Nos últimos anos, um número considerável de trabalhos têm sido publicados em que o eletrodo de diamante dopado com boro (do inglês, boron-doped diamond - BDD) é utilizado. Nestes estudos são descritas suas vantagens frente a eletrodos de outros materiais comuns, como as demais formas de carbono ligados por sp^2 (vítreo – CV, nanotubos, fulereno, grafite pirolítico, pasta e fibras), e frente a eletrodos de ouro e platina. São elas: [5, 46, 50, 51]:

- boa resposta a alguns analitos em soluções aquosas e não-aquosas, sem qualquer pré-tratamento convencional (polimento mecânico);
- estabilidade morfológica e microestrutural a altas temperaturas;
- transparência óptica;
- estabilidade a corrosão em meios muito agressivos;
- fraca adsorção de moléculas polares, o que melhora a resistência do eletrodo à desativação ou envenenamento;
- estabilidade de resposta a longo prazo;
- corrente de fundo muito baixa o que possibilita determinação de quantidades bem pequenas da espécie analítica;
- larga janela de potencial elétrico, tendo sido descrito até +3,5 V;
- alta sensibilidade;

O estabelecimento do contato elétrico, normalmente ôhmico (contato entre um metal e um semi-condutor), bem como o isolamento para que somente a superfície do diamante dopado fique em contato com a solução de medida são parâmetros de extrema importância na montagem do eletrodo de BDD. Alguns dos contatos mais usados são: índio/gálio, gálio, subcamada de titânio, pasta de prata, ouro ou Au/Ta [44].

1.3.5.1 Análises eletroquímicas de fármacos empregando DDB como eletrodo de trabalho

O DDB vem sendo usado como eletrodo de trabalho na determinação eletroanalítica de fármacos em preparações farmacêuticas a mais de uma década. Em alguns destes trabalhos, a determinação destes fármacos também foi implementada em amostras biológicas e ambientais (principalmente água). Segue uma breve revisão sobre trabalhos localizados na literatura sobre este tema.

Wangfuengkanagul *et al.*, em 2002, desenvolveram uma metodologia de eletroanálise de medicamento contendo D-penicilamina em meio de tampão fosfato 0,1mol L⁻¹ (pH 7,0) empregando eletrodo de DDB. Os resultados obtidos com o DDB foram comparados aos obtidos com um eletrodo de carbono vítreo (CV). Sobre DDB e usando voltametria cíclica, a D-penicilamina apresentou um pico de oxidação irreversível bem definido (~0,7 V), com sensibilidade e definição superiores ao do eletrodo de CV. A análise foi realizada por FIA com detecção amperométrica (0,75 V). A faixa de resposta linear foi entre 0,5 a 50,0 μmol L⁻¹ e o limite de detecção foi calculado em 10 nmol L⁻¹. Os resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação ficaram entre 98 e 104 %. Os resultados obtidos não foram comparados com os de outro método de análise [52].

Posteriormente (2004), Wangfuengkanagul *et al.* propuseram um método usando FIA com detecção amperométrica e DDB como eletrodo de trabalho para a determinação de antibióticos (tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina). O comportamento eletroquímico foi estudado por voltametria cíclica, sendo que todos os antibióticos estudados apresentaram pico de oxidação e comportamento irreversível. Assim como no trabalho anterior, o eletrodo de DDB apresentou melhor sensibilidade quando comparado ao de CV. A

faixa linear de resposta obtida foi de 0,1 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para tetraciclina e 0,5-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para clortetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina. As substâncias apresentaram quantidades percentuais entre 99 - 103% em relação ao declarado na bula. Estudos de adição e recuperação geraram resultados entre 98 e 102 %. O limite de detecção foi calculado em 10 nmol L^{-1} para cada antibiótico [53].

Suryanarayan *et al.*, em 2005, publicaram um estudo envolvendo a determinação de naproxeno em formulações farmacêuticas usando voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial (DPV) e DDB como eletrodo de trabalho em meio não aquoso. O eletrodo DDB proporcionou melhor relação sinal-ruído e voltamogramas cíclicos mais reprodutíveis em comparação ao eletrodo CV. O método apresentou faixa linear de resposta entre 0,5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 30 nmol L^{-1} . Segundo os autores, o método proposto é rápido, preciso e tem boa seletividade [54].

Karuwan *et al.* [55], em 2006, propuseram a amperometria pulsada em substituição à amperometria a potencial constante (usando DDB) para a determinação de três medicamentos da classe dos agonistas beta adrenérgicos: salbutamol, terbutalina e clenbuterol. As faixas lineares obtidas para estes compostos foram entre 0,5-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1,0-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,5-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os limites de detecção de 0,1; 0,5 e 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Segundo o teste *t* a um nível de confiança de 95%, o método proposto não apresentou diferença significativa em relação aos resultados obtidos por eletroforese capilar [55].

Voltametria de onda quadrada e DDB como eletrodo de trabalho foi a estratégia usada por Oliveira *et al.* [56] na determinação de lidocaína em água e géis comerciais em meio de tampão Britton-Robinson 0,1 mol L^{-1} . Nessas condições, a lidocaína apresentou comportamento irreversível e pico de oxidação em aproximadamente 1,7 V (versus Ag/AgCl). Os limites de detecção e quantificação obtidos em água pura foram de 10,0 e 34,4 $\mu\text{g L}^{-1}$,

respectivamente. O propilenoglicol, veículo do gel, não apresentou interferência na resposta voltamétrica. Estudos de adição e recuperação geraram resultados entre 97 e 99% [56].

O comportamento eletroquímico da atorvastatina cálcica foi estudado por Dogan-Tubal *et al.* [57], em 2007, sobre eletrodos de CV e DDB. Sobre estes eletrodos, a atorvastatina é oxidada (processo irreversível) e o processo é controlado por difusão. O método apresentou faixa linear de resposta entre $9,65 \times 10^{-7}$ a $3,86 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (CV e DDB). Os limites de detecção (por SWV) foram estimados em $2,05 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (CV) e $1,31 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (DDB). O método foi aplicado com sucesso na determinação de atorvastatina em medicamentos, plasma humano e urina [57].

O comportamento anódico do fármaco perfloxacina sobre eletrodos DDB e CV, bem como sua determinação em amostras farmacêuticas e plasma humano foi tema de um trabalho desenvolvido por Uslu *et al* [58]., em 2008. Este composto apresentou pico de oxidação (comportamento irreversível) em torno de $+1,20 \text{ V}$ (versus Ag/AgCl) em meio de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com linearidade na faixa de concentração entre 2×10^{-6} a $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (SWV e DPV). O método apresentou repetibilidade, reprodutibilidade, precisão e seletividade adequada para análise deste composto em amostras farmacêuticas e biológicas (urina e plasma) [58].

Ribeiro *et al.* [59], em 2008, descreveram um método de determinação de cloreto de prometazina em medicamentos usando voltametria de onda quadrada adsorptiva (ASWV) e DDB como eletrodo de trabalho. O mecanismo de oxidação envolve a formação de dois picos de oxidação, o primeiro relacionado com a oxidação direta do composto em $+0,77 \text{ V}$ (primeiro ciclo) e o segundo com a oxidação do produto de oxidação ($+0,44 \text{ V}$), o qual adsorve na superfície do eletrodo durante o primeiro ciclo. O melhor resultado foi obtido com a pré-concentração da prometazina em $0,77 \text{ V}$ durante 30 s e conseqüente análise por redissolução. Nessas condições, o método apresentou linearidade na faixa de concentração

entre $5,96 \times 10^{-7}$ e $4,76 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $2,66 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ em 0,44 V e de $4,61 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ em 0,77 V. Os resultados obtidos com o método proposto foram similares aos obtidos pelo método espectrofotométrico recomendado pela farmacopéia britânica, considerando o teste *t* a um nível de confiança de 95 % [59].

Souza *et. al* [60]., em 2008, apresentaram um método por voltametria de onda quadrada usando DDB como eletrodo de trabalho para a quantificação de sulfadiazina e sulfametoxazol, separadamente, em produtos farmacêuticos. A determinação eletroquímica da sulfadiazina ocorreu em meio de etanol/ H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (50/50; v/v) e de sulfametoxazol em meio de etanol/tampão fosfato (50/50; v/v). Ambos os analitos apresentam pico de oxidação irreversível em aproximadamente +1,1 V. O método apresentou faixa linear de resposta entre $8,01 \times 10^{-6}$ e $1,19 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para a sulfadiazina e entre $6,10 \times 10^{-6}$ e $6,01 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para a sulfametoxazol. Os limites de detecção foram calculados em $2,19 \times 10^{-6}$ e $1,15 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos com método proposto foram similares aos obtidos por HPLC considerando o teste *t* a um nível de confiança de 95 % [60].

A determinação do AAS em formulações farmacêuticas usando BDD como eletrodo de trabalho foi explorada por Sartori *et al.* [61], em 2009, empregando SWV. Neste trabalho, o AAS é oxidado (H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) sem prévia hidrólise a ácido salicílico. Nesta condição, o AAS apresenta um pico de oxidação próximo à +1,97 V vs. Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) com características de uma reação irreversível. A curva analítica obtida foi linear na faixa de concentração entre $2,50 \times 10^{-6}$ e $1,05 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com o limite de detecção calculado em $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. No estudo de repetibilidade ($n = 10$), o desvio padrão relativo foi menor que 1,4% para uma solução contendo $45 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de AAS. Os resultados obtidos foram concordantes com um método oficial da Farmacopéia Britânica, a um nível de confiança de 95% [61].

A determinação de nitrofutantoína (NFT) em medicamentos, bem como a influência do nível de dopagem (5.000; 10.000 e 20.000 mg L⁻¹) do eletrodo de DDB com boro em seu respectivo comportamento eletroquímico foram investigados por de Lima-Neto *et al.*, em 2009. Em meio de tampão Britton-Robinson (pH 4,0), o NFT apresentou um pico de redução em torno de -0,5 V, sendo que o nível de dopagem do DDB de 10.000 e 20.000 mg L⁻¹ apresentou os melhores resultados em relação a definição e intensidade do pico. Empregando a técnica de SWV, o método proposto apresentou boa linearidade ($R = 0,9998$), faixa linear de resposta entre 5 e 60×10^{-7} mol L⁻¹ e baixos limites de detecção ($2,69 \times 10^{-8}$ e $8,96 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) para o eletrodo de DDB com 10.000 e 20.000 mg L⁻¹ de boro, respectivamente. Os resultados obtidos na determinação de NFT em formulações farmacêuticas são comparáveis aos do método recomendado pela Farmacopéia Britânica (UV-vis) [62].

Lourenção *et al.*, em 2009, desenvolveram uma metodologia para determinação simultânea de paracetamol (PA) e cafeína (CA) em medicamentos usando eletrodo de DDB em meio de tampão acetato pH 4,5. Tanto por DPV como por SWV, os fármacos apresentaram uma boa separação entre seus respectivos picos de oxidação (~ 550 mV). As curvas analíticas apresentaram linearidade entre $5,0 \times 10^{-7}$ e $8,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para PA e CA. Os limites de detecção para PA e CA foram calculados em $4,9 \times 10^{-7}$ e $3,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente. Os resultados foram similares aos obtidos HPLC (nível de confiança de 95%) [63].

Altun *et al.*, em 2010, fizeram um estudo com intuito de determinar os níveis de sertindol em plasma humano e em formulações farmacêuticas usando os eletrodos de CV e DDB. Segundo os autores, os eletrodos apresentaram resultados similares tanto por DPV como por SWV. As curvas de calibração apresentaram faixa linear de resposta entre 1×10^{-6} e

$1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato (pH 3,5). O limite de detecção foi calculado em $2,5 \times 10^{-7}$ e $2,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para o eletrodo de DDB e CV, respectivamente [64].

No mesmo ano (2010), Altun *et al.* publicaram outro trabalho usando DDB como eletrodo de trabalho. Um método foi desenvolvido para a determinação de lercanidipena (LRC) em plasma humano e em formulações farmacêuticas. A LRC apresentou um pico de oxidação bem definido próximo a 0,94 V em meio de H_2SO_4 como eletrólito suporte. O método apresentou faixa linear de resposta entre 4×10^{-6} e $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de LRC [65].

Em 2010, Sartori *et al.*, publicaram uma metodologia para determinação independente de dois agentes bloqueadores beta-adrenérgicos em formulações farmacêuticas: propranolol (PROP) e atenolol (ATN). Empregando a técnica de SWV e H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, o método proposto apresentou linearidade entre 0,20 a $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para PROP e entre 2,0 a $41,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para ATN, com limite de detecção de 0,18 e $0,93 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos são similares aos obtidos com o método oficial (espectrofotometria) em um nível de confiança de 95% [66].

Lourenção *et al.*, em 2010, desenvolveram uma metodologia para análise simultânea de ácido ascórbico (AA) e cafeína (CAF) em formulações farmacêuticas por DPV utilizando o DDB como eletrodo de trabalho. Uma curva de calibração linear foi obtida na faixa de concentração entre $1,9 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AA e entre $9,7 \times 10^{-6}$ a $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CAF, com limite de detecção de $19 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos foram similares aos obtidos por HPLC [67].

Citrato de sildenafil, princípio ativo do medicamento de nome comercial “Viagra” foi o fármaco estudado por Batista *et al.* usando DDB como eletrodo de trabalho. A técnica de análise explorada foi DPV em meio de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. A curva de calibração mostrou-se linear nas concentrações entre $7,3 \times 10^{-7}$ a $7,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com um

limite de detecção de $6,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos são similares aos obtidos por HPLC a um nível de confiança de 95% [68].

1.4 – Objetivos

1.4.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um método simples, rápido e economicamente viável para determinação simultânea de ácido acetil-salicílico (AAS) e ácido ascórbico (AA) em formulações farmacêuticas. Propõem-se o emprego do sistema de Análise por Injeção em Fluxo com detecção Amperométrica de Múltiplos Pulsos (FIA-AMP) e diamante dopado com boro (DDB) como eletrodo de trabalho.

1.4.1. Objetivos específicos

- Investigação do comportamento eletroquímico do AA e AAS por voltametria cíclica e hidrodinâmica, empregando DDB como eletrodo de trabalho;
- Identificação dos pulsos de potenciais que permitam a determinação simultânea de AA e AAS, usando FIA com detecção amperométrica;
- Otimização dos parâmetros FIA objetivando prioritariamente: (1) obtenção de estabilidade no sinal de corrente em função do tempo, usando um eletrodo sólido sem modificação química ou eletroquímica; (2) elevada frequência analítica; (3) geração de um volume reduzido de resíduos por análise;

- Validação da metodologia proposta: linearidade, repetibilidade, limites de detecção e quantificação, estudos de adição e recuperação, frequência analítica e comparação dos resultados obtidos com o método proposto aos obtidos por HPLC.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.1 – Reagentes, soluções e amostras

As soluções utilizadas nos experimentos foram preparadas com água deionizada (resistividade superior a 18 MΩ cm) obtida do ultra purificador de água Master System Gehaka. Os reagentes utilizados na preparação das soluções eram de pureza analítica e foram utilizados sem purificação prévia.

2.1.1 - Solução tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹: No preparo desse eletrólito, aproximadamente a metade de um balão volumétrico de 1000,0 mL foi previamente preenchida com água deionizada. Em uma capela de exaustão, foram adicionados ao balão 12,0 mL de ácido acético glacial (Vetec) e 4,0 g de hidróxido de sódio (Dinâmica) previamente pesado em béquer. Em seguida, o volume do balão volumétrico foi completado com água deionizada.

2.1.2 – Solução de hidróxido de sódio 0,2 mol L⁻¹: 8,0 g de hidróxido de sódio (Dinâmica) foram adicionados a um balão volumétrico de 1000,0 mL, cujo volume foi completado com água deionizada. Essa solução foi utilizada na hidrólise do AAS formando ácido salicílico (AS).

2.1.3 – Solução estoque de AAS 0,01 mol L⁻¹ hidrolisado: Uma massa de 0,018 g de AAS (Vetec) foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL. Em seguida, o balão foi completado com uma solução de hidróxido de sódio 0,2 mol L⁻¹. Nesse meio, o AAS é hidrolisado a AS rapidamente (menos de 10 minutos) [69]. A Figura 2.1 apresenta a reação de hidrólise do AAS gerando salicilato e acetato. O estoque é preparado em cada dia de experimento.

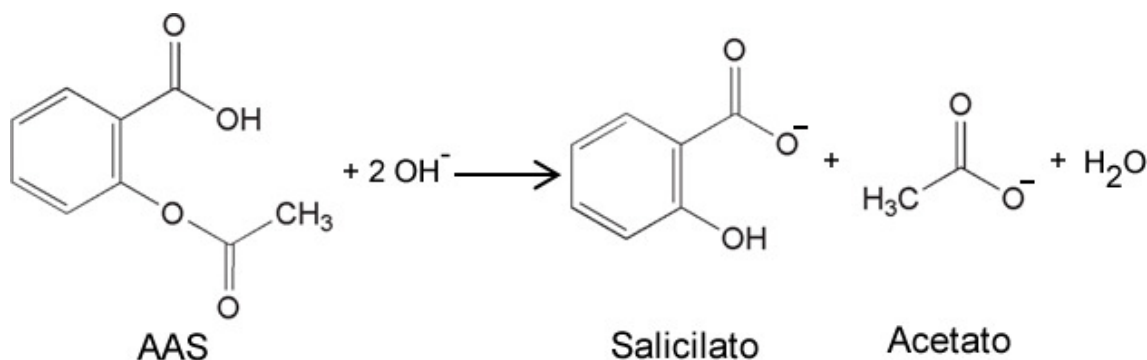


Figura 2.1 - Equação de hidrólise do ácido acetilsalicílico (AAS) em meio de hidróxido de sódio formando salicilato e acetato de sódio.

2.1.4— Solução estoque de AA 0,01 mol L⁻¹: Uma massa de 0,0176 g de AA (Vetec) foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL. Em seguida, o balão foi completado com água deionizada. O estoque é preparado a cada dia de experimento.

2.1.5 – Solução tampão Britton-Robbinson 0,04 mol L⁻¹: Aproximadamente 500,00 mL de água deionizada foram transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL. Em seguida foram transferidos para esse balão 2,472 g de ácido bórico, 2,30 mL de ácido acético glacial e 2,33 mL de ácido fosfórico. Posteriormente o recipiente foi completado com água deionizada. Finalmente, o pH da solução foi ajustado em 2,0 com uma solução de NaOH descrita no item 2.1.2, e o volume do balão foi completado com água destilada.

2.1.6 – Solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹: uma alíquota de 27 mL de ácido sulfúrico 98% (Synth) foi adicionada a um balão volumétrico de 1000,0 mL, em que previamente continha água destilada até quase metade de sua capacidade. Em seguida, o balão foi completado até o menisco com água deionizada.

2.1.7 – Preparo das soluções amostras de medicamentos: As amostras de quatro diferentes lotes de comprimidos efervescentes de Aspirina C[®] (400 mg de AAS + 240 mg de AA) foram adquiridas em drogarias na cidade de Uberlândia. Os comprimidos de cada lote foram macerados gerando quatro amostras. No preparo da amostra, uma massa de aproximadamente 0,144 g do pó foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com uma solução de hidróxido de sódio 0,2 mol L⁻¹. As soluções injetadas no sistema FIA consistiam de alíquotas de 100 µL e 120 µL de solução, diluídas em 10 mL de eletrólito suporte (tampão HAc/NaAc 0,1 mol L⁻¹).

Estudos realizados no transcorrer do trabalho demonstraram que uma solução de ácido ascórbico diluída em água ou em solução de NaOH gerava o mesmo sinal no sistema FIA empregado neste trabalho. Como as diluições realizadas nas amostras eram grandes, a força iônica e o pH eram controlados pela solução tampão usada no trabalho (HAc/NaAc 0,1 mol L⁻¹).

Na análise comparativa das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o mesmo procedimento de preparo de amostras foi seguido, ou seja, o AAS também foi previamente convertido em ácido salicílico (AS). Isto se deve ao fato de que na injeção de AAS no sistema HPLC sem prévia hidrólise, dois picos foram detectados, sendo que o pico correspondente ao AS aumentava a cada injeção, enquanto o pico observado para o AAS decrescia.

2.2 – Instrumentação

2.2.1 – Análises eletroquímicas

As medidas amperométricas em fluxo (amperometria de múltiplos pulsos) e de voltametria cíclica foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato μ Autolab Type III (Eco Chemie - Metrohm) interfaceado a um computador em gerenciado pelo software GPES versão 4.9. O mesmo equipamento foi usado na limpeza eletroquímica do eletrodo de DDB e na confecção do eletrodo de referência (formação de AgCl sobre um fio de prata) [70]. Em ambos os casos, a técnica de amperometria foi utilizada.

2.2.1.1 - Célula eletroquímica usada no sistema FIA

Uma célula eletroquímica do tipo “wall jet” com três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) foi utilizada nos estudos estacionários e em fluxo. Na Figura 2.2 é apresentado um esquema da célula.

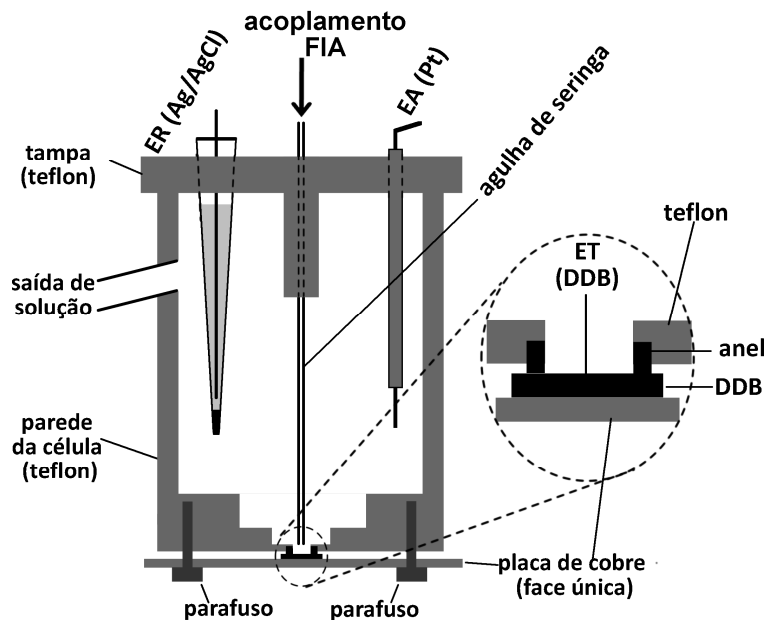


Figura 2.2: Célula do tipo “wall-jet” usada no sistema FIA.

A célula do tipo “wall-jet”, com capacidade de aproximadamente 10 mL foi construída a partir de um tarugo de teflon (2,0 cm de comprimento e 3,0 cm de diâmetro). A partir de um dos lados do tarugo, um orifício foi aberto com auxílio de um torno mecânico (0,9 cm de profundidade e 1,2 cm de diâmetro), permanecendo, desta forma, um dos lados do tarugo obstruído (parte de baixo da célula). Neste lado, um orifício central foi confeccionado (3,0 mm de diâmetro), no qual, com auxílio de um anel de borracha (oring) [71] foi posicionado o substrato condutor de silício (7 x 7 mm) com 1 mm de espessura coberto em um dos lados com um filme de DDB (~ 8000 ppm; 1,2 μ m de espessura). A dimensão do anel de borracha (diâmetro interno) é responsável pela definição da área do eletrodo. A tampa da célula contém três orifícios para o posicionamento dos eletrodos de referência e auxiliar e uma agulha de uma seringa descartável (entrada da solução do sistema FIA). A agulha também foi posicionada no centro da tampa superior a menos de 2 mm do eletrodo de trabalho (célula do tipo “wall-jet”) [72]. Esta célula permite que o procedimento de limpeza eletroquímica seja realizada com o eletrodo de trabalho posicionado na célula em fluxo, o que

pode ser considerado uma vantagem em relação à célula semelhante usada por outros autores [73].

2.2.1.2 - Eletrodo de referência: foi utilizado um mini eletrodo de Ag/AgCl (KCl_{sat}) construído no próprio laboratório através da eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag. Um potencial de +0,3 V foi aplicado ao fio de Ag em meio de uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ durante uma hora. O fio de Ag coberto com AgCl foi inserido em uma ponteira de micropipeta de 100 ou 1000 µL cuja extremidade inferior (diâmetro menor) foi obstruído com um polímero poroso (separador de bateria). Para finalizar, o volume interno da ponteira foi preenchida com uma solução saturada em KCl e em Ag⁺ [70].

2.2.1.3 - Eletrodo de trabalho: Diamante dopado com boro (DDB). O material foi adquirido da empresa Adamant Technologies SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça. O material consiste de uma pequena placa de silício de aproximadamente 49 mm² (7 x 7 mm) coberta com uma fina película de diamante dopado com boro (DDB), que foi pressionada sobre um anel de borracha posicionado na parte inferior da célula. Como a película de DDB é muito fina (~ 1,2 µm), o eletrodo não pode ser submetido à limpeza mecânica (polimento com alumina, por exemplo), como comumente é realizado com eletrodos sólidos de carbono vítreo, ouro, platina, entre outros. Portanto, com este tipo de eletrodo, apenas a limpeza eletroquímica é possível. Neste trabalho, dois tipos de limpezas (ativações) foram realizadas com o eletrodo de DDB, a anódica e a catódica. Inicialmente, a ativação anódica era realizada com a aplicação de um potencial de +2,6 V, durante 2000 s em meio de tampão Britton-Robinson (pH 2,0), seguida da ativação catódica aplicando um potencial de -3,0 V durante 2000 s em meio de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ [74]. O procedimento catódico era realizado diariamente antes do início dos trabalhos. O anódico somente quando limpezas mais extremas eram necessárias.

2.2.1.4 - Eletrodo auxiliar: Um fio de platina posicionado no interior de uma ponteira de micropipeta (10 μL).

2.2.1.5 – Sistema FIA: A Figura 2.3 apresenta um esquema do sistema FIA de linha única usada no presente trabalho. A bomba peristáltica usada é da marca Gilson modelo Minipuls 3. O injetor comutador manual (acrílico) foi adquirido do CENA-USP, o qual foi construído de forma semelhante ao injetor apresentado em um trabalho publicado anteriormente [75]. O diâmetro interno das tubulações de polietileno utilizadas era de 1 mm. O comprimento da tubulação entre o injetor e o detector era de aproximadamente 20 cm.

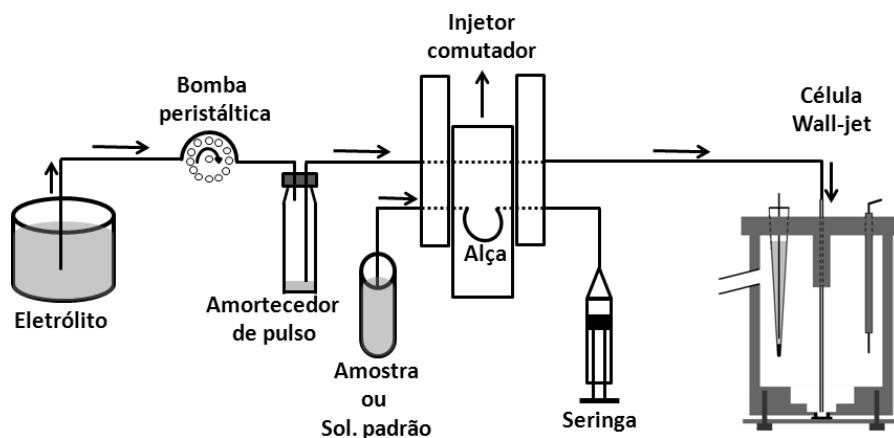


Figura 2.3: Esquema ilustrativo do sistema FIA de linha única utilizado neste trabalho.

A Figura 2.4 apresenta uma imagem do sistema FIA montado no laboratório.

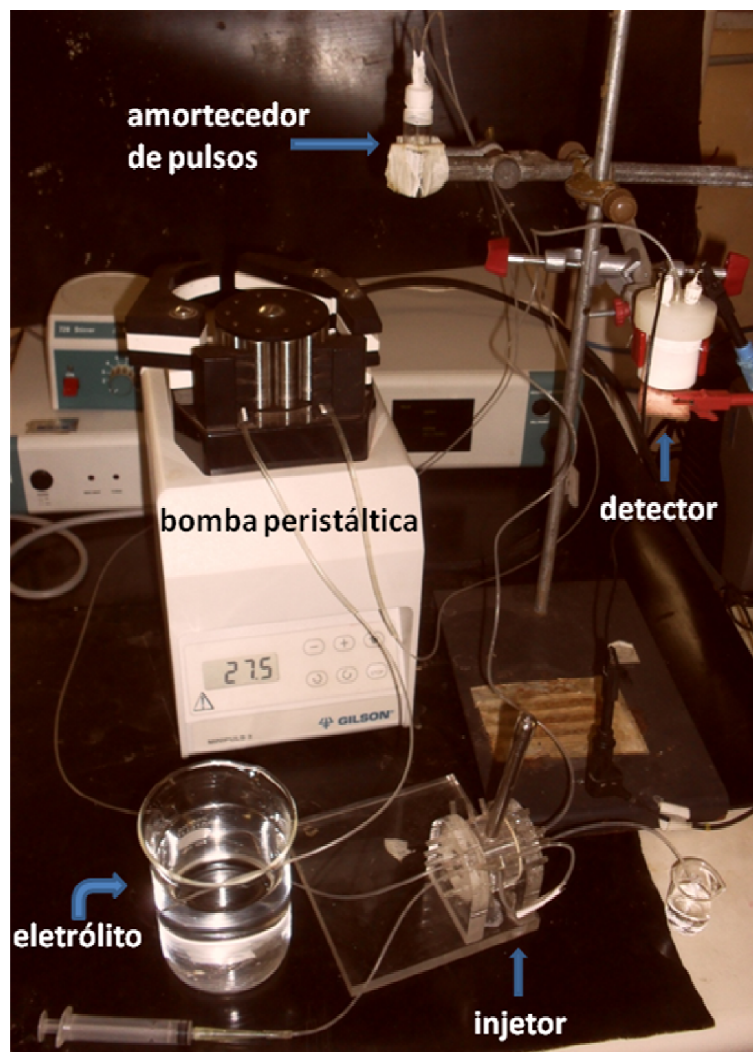


Figura 2.4: Imagem do sistema FIA usado neste trabalho.

2.2.1.5 – Sistema BIA

A Figura 2.5 apresenta um esquema da célula BIA usada no trabalho.

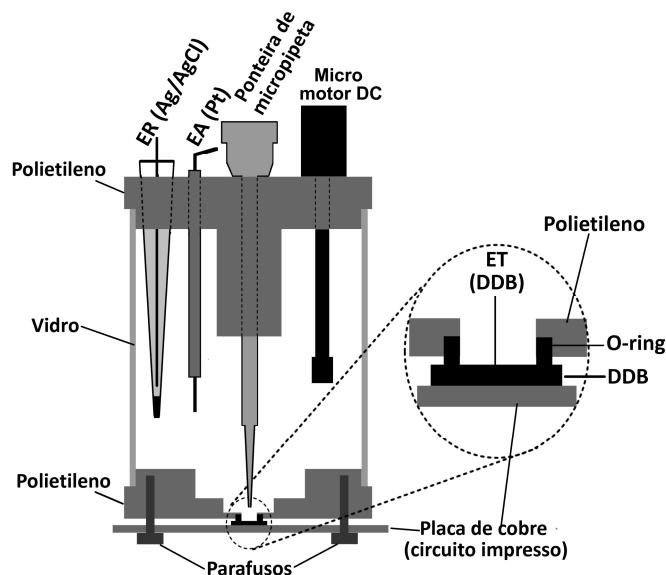


Figura 2.5. Esquema da célula usada nas análises por análise por injeção em batelada (BIA)

A célula BIA foi construída a partir de um tubo de vidro ($\varnothing_{\text{interno}} = 6,5 \text{ cm}$; altura = 6,5 cm; Volume = 200 mL). As duas extremidades foram tampadas com polietileno. Um orifício central foi aberto em ambas as tampas. Na tampa inferior foi posicionado o eletrodo DDB com auxílio de um anel de borracha e a tampa superior foi posicionada a ponteira (1 mL) da pipeta eletrônica usada na injeção (Eppendorf Multipette® stream). A célula foi construída de forma que a ponteira (durante a injeção) fique posicionada reprodutivelmente a ~2 mm do eletrodo de DDB.

2.2.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O equipamento de cromatografia de líquida de alta eficiência utilizado na validação da metodologia proposta consistiu de uma bomba L-2130 da marca HITACHI VWR; fase estacionária coluna C18 marca SHIM-PAC CLC-ODS, detector UV-VIS marca MERCK-HITACHI, com o comprimento de onda (λ) ajustado em 210 nm.

As condições cromatográficas foram adaptadas a partir de um artigo no qual fármacos AAS, paracetamol, cafeína e fenobarbital são quantificados por HPLC [76]. A fase móvel usada na análise de AAS e AA foi definida após testes com diferentes proporções de uma mistura de solução aquosa de ácido fosfórico (pH ajustado em 2,1) e acetonitrila grau HPLC. Uma boa resolução entre AA e AS foi obtida com a fase móvel composta com 60% da solução aquosa e 40% de acetonitrila.

2.3 – Metodologia

2.3.1 – Estudo do comportamento eletroquímico do AA e AS usando DDB como eletrodo de trabalho

O comportamento eletroquímico do AA e AS foi inicialmente estudado empregando a técnica de voltametria cíclica. A varredura foi registrada na faixa de trabalho entre 0,0 e +1,6 V vs Ag/AgCl sobre eletrodo de DDB com velocidade de 50 mV s⁻¹, em meio de solução tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹ (eletrólito suporte). Posteriormente, este estudo foi repetido no sistema FIA, usando a técnica de amperometria de múltiplos pulsos.

2.3.2 – Estudo de repetibilidade

O estudo da repetibilidade do método proposto (FIA/AMP) foi realizado com injeções consecutivas de uma solução contendo simultaneamente AA e AS. Soluções de concentrações diferentes foram injetadas alternadamente para comprovar a ausência de efeitos de memória. O desvio padrão relativo (DPR) foi calculado usando o software Origin 7.0 (Estatística de colunas - desvio padrão da média).

2.3.3 – Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) refere-se à concentração mínima do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Em métodos que empregam uma curva analítica, o limite de detecção pode ser definido como a concentração do analito que produz um sinal que excede em três vezes o desvio padrão do sinal obtido ao passar o branco.

$$LD = 3 \times S_b / a$$

Onde,

S_b = desvio padrão do sinal do branco

a = coeficiente angular da curva analítica ou sensibilidade da calibração.

Precisão é definida como dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas, sendo avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ). Exatidão é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao supostamente conhecido, ou aceito como verdadeiro.

O Limite de Quantificação (LQ) representa a determinação do valor limite que define o quanto de uma amostra pode ser detectada e quantificada com elevada precisão estatística, sendo este valor acima do LD. Assim, o LQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas e pode ser medido multiplicando o LD por 3,33 [77].

2.3.4 – Estudos de adição e recuperação

Recuperação ou fator de recuperação pode ser definido como a proporção da quantidade da espécie de interesse, presente ou adicionado na amostra teste que é possível de ser extraída e/ou quantificada.

O procedimento analítico apresenta limitações se a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma do que a substância presente na amostra específica, implicando em avaliações excessivamente otimistas da recuperação. Os efeitos dos componentes de matriz também devem ser investigados, pois pode haver interferentes na separação, detecção ou quantificação da substância.

Os testes de recuperação devem ser realizados na faixa de concentração típica da substância de interesse na amostra em estudo, pois comumente, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração, e o fator de recuperação pode diferir substancialmente em altas e baixas concentrações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Estudo do comportamento eletroquímico do AA e AS sobre o eletrodo de DDB

Inicialmente, foram realizados estudos usando voltametria cíclica com o intuito de verificar o comportamento eletroquímico de AA e AS (AAS hidrolisado) sobre eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). A Figura 3.1 apresenta os resultados obtidos usando solução tampão de ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte.

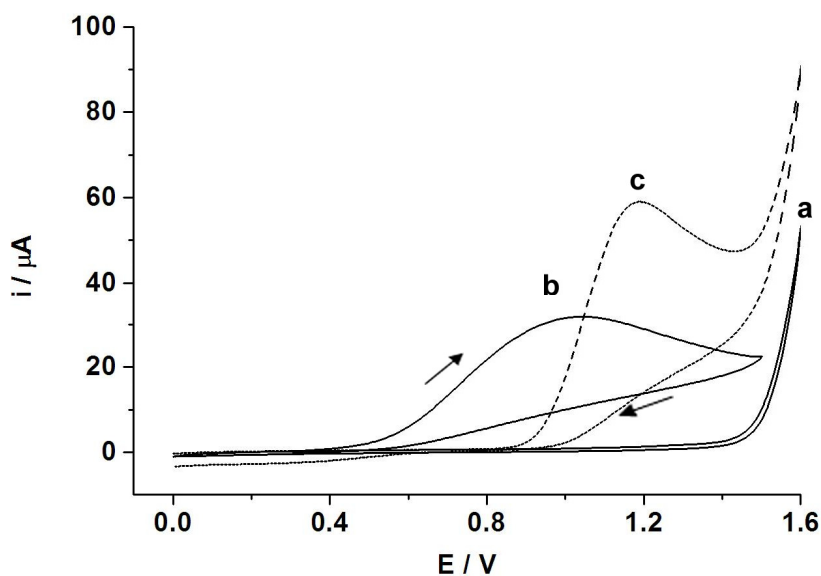


Figura 3.1: Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (a) sem e (b) com a adição de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AA ou (c) $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AS. $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Conforme pode ser observado na Figura 3.1, ambos os compostos apresentam picos voltamétricos, indicando que tanto o AA quanto o AS oxidam sobre o eletrodo de DDB, no intervalo de potencial estudado. A oxidação do AA (b) a ácido dehidroascórbico se inicia em torno de $+0,50 \text{ V}$, sendo que apresenta corrente de difusão máxima em $+1,0 \text{ V}$. Embora a oxidação do AA a ácido dehidroascórbico (DHA) seja uma reação reversível, o DHA gerado

reage rapidamente com a água tornando-se eletroquimicamente inativo. Sendo assim, o processo se caracteriza como irreversível nessas condições experimentais, não apresentando sinal no sentido inverso da varredura [78, 79]. A oxidação do AS (b) a ácido dihidroxibenzoico se inicia em aproximadamente +0,9 V apresentando um pico anódico máximo em +1,2 V. Diferentemente do AA, o AS apresenta um sinal no sentido inverso da varredura a partir de +0,45 V (redução). No entanto, a corrente de redução é diversas vezes inferior a corrente de oxidação (~20 vezes). Segundo a literatura, este sinal de menor intensidade se deve a redução de uma espécie formada em uma reação química acoplada ao processo de oxidação do AS [80]. Segundo Oliveira Brett *et al.* [81], durante a oxidação do AS sobre eletrodo de DDB, radicais hidroxila são gerados no eletrodo e ocorre uma hidroxilação do produto de oxidação formando o ácido dihidróxi-benzóico (2,3 e 2,5) [82]. As Figuras 3.2 e 3.3 apresentam, respectivamente, as reações de oxidação do AA e AS sobre o eletrodo de DDB.

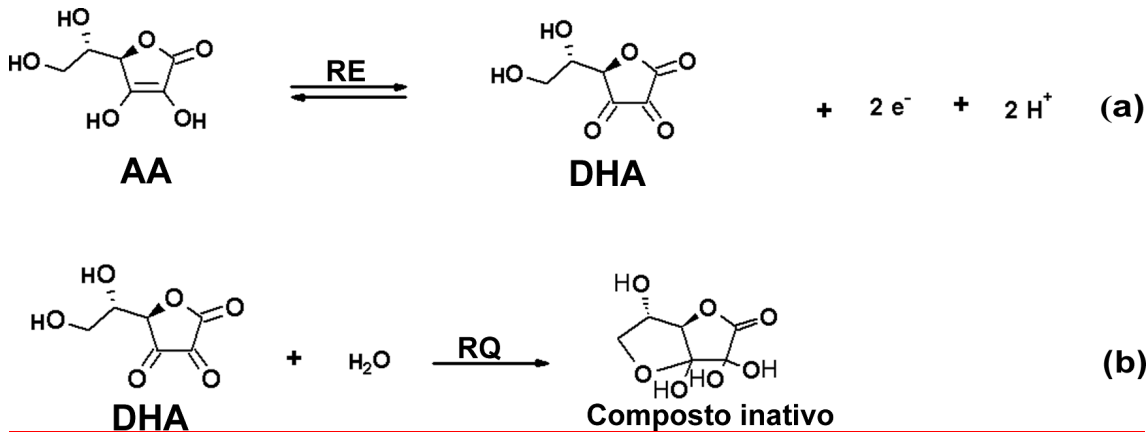


Figura 3.2: (a) Representação da reação eletroquímica (RE) de oxidação do ácido ascórbico (AA), formando ácido dehidroascórbico (DHA) na superfície do eletrodo de diamante dopado com boro (DDB); (b) Reação química (RQ) do DHA com a água, formando um composto eletroquimicamente inativo.

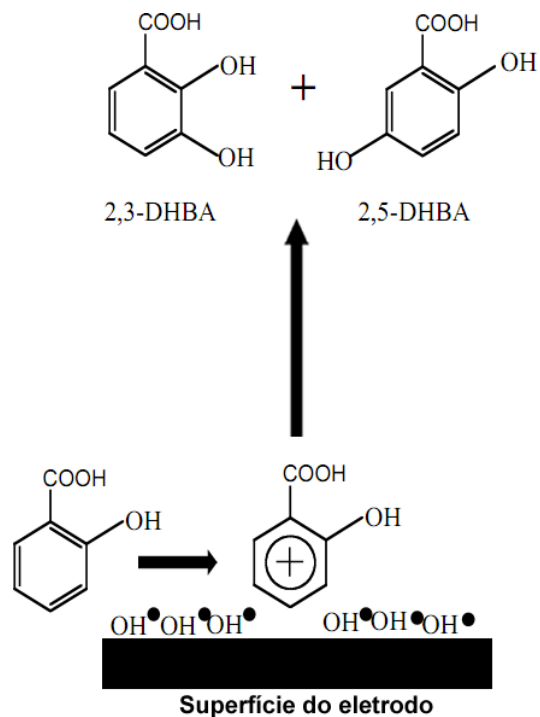


Figura 3.3: Representação da reação eletroquímica de oxidação do ácido salicílico (AS), formando ácido 2,3 dihidroxi-benzóico (2,3-DHBA) e ácido 2,5 dihidroxi-benzóico (2,5-DHBA), na superfície do eletrodo de diamante dopado com boro (DDB).

Antes de propor o uso do eletrodo de DDB em meio de tampão ácido acético/acetato na determinação simultânea de AA e AS, diversos estudos foram realizados com outros eletrodos de trabalho (ouro e carbono vítreo) e eletrólitos suportes (ácido sulfúrico, tampão fosfato, tampão Britton-Robinson e NaOH). Os eletrodos de ouro e carbono vítreo apresentaram problemas relacionados com repetibilidade de sinal em todos os meios estudados, com uma gradativa queda do sinal em função do tempo, provavelmente devido à adsorção do AS ou de algum produto de oxidação na superfície dos eletrodos. Estes resultados estão de acordo com os apresentados na literatura que informam que a oxidação do AS pode formar um filme polimérico isolante sobre o eletrodo de trabalho sólido usado [80].

O eletrodo de DDB não apresentou resultados reprodutíveis em meio de NaOH, tampão fosfato (pH = 7,2) e tampão Britton-Robinson (pH = 2,0). Porém, em meio de ácido

sulfúrico e tampão ácido acético/acetato, os resultados obtidos foram mais estáveis comparados com as outras soluções estudadas. Entre os eletrólitos que apresentaram bons resultados, a opção foi pelo emprego do tampão ácido acético/acetato como eletrólito suporte.

3.2 - Estudo da resposta eletroquímica do AA e AS em FIA com detecção amperométrica usando DDB como eletrodo de trabalho

Tradicionalmente, o comportamento eletroquímico de um composto é estudado usando voltametria cíclica (resultados obtidos no modo estacionário), conforme estudos apresentados no item 3.1. No entanto, o objetivo do presente trabalho é a determinação de AA e AS por FIA com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (FIA/AMP), a qual é uma técnica hidrodinâmica, ou seja, as soluções estão sob constante convecção. Dependendo da configuração da célula FIA, os resultados obtidos podem ser diferentes dos obtidos por voltametria cíclica. Portanto, as respostas eletroquímicas do AA e AS também foram estudadas neste sistema.

A Figura 3.4A apresenta a escada de potencial aplicada ao sistema FIA/AMP em função do tempo (forma cíclica) e a Figura 3.4B apresenta os amperogramas obtidos após a injeção de duas soluções de composições diferentes (100 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS e AA, respectivamente).

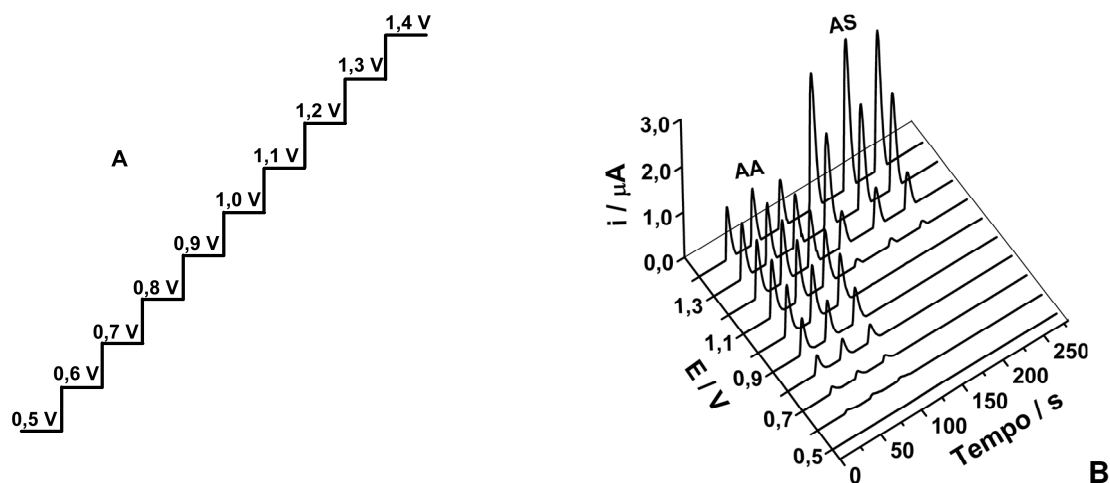


Figura 3.4: (A) Escada de potencial aplicada ao eletrodo de trabalho em função do tempo (50 ms cada); (B) Amperogramas obtidos usando o sistema FIA/AMP na injeção de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS. Vazão: $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; Volume injetado: $100 \mu\text{L}$.

A Figura 3.5 apresenta os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos a partir dos resultados da Figura 3.4 em que as correntes de pico em função dos potenciais aplicados são plotados, gerando um gráfico $i (\mu\text{A})$ vs $E (\text{V})$.

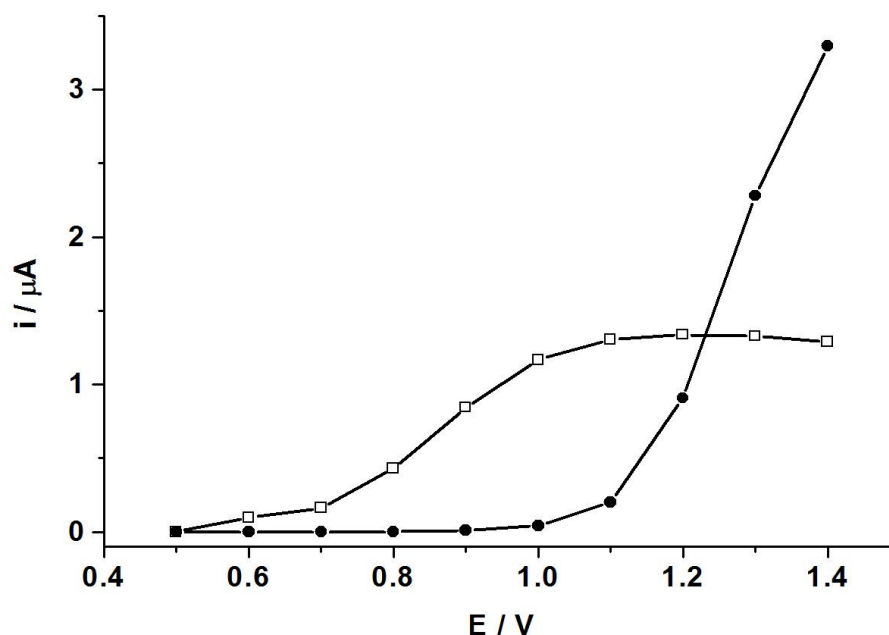


Figura 3.5: Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos a partir dos resultados da Fig. 3.4. Soluções: (□) $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA; (●) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AAS. Eletrólito: tampão ácido acético/acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7). Vazão: $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$.

Através das Figuras 3.4 e 3.5 é possível ser observado que em condições hidrodinâmicas (sistema FIA), a oxidação do AA inicia em torno de $+0,65 \text{ V}$ e atinge a corrente limite máxima em $+1,1 \text{ V}$. A oxidação do AS inicia em torno de $+1,1 \text{ V}$ e não atinge corrente limite máxima em $+1,40 \text{ V}$ versus Ag/AgCl , o que difere dos resultados obtidos por voltametria cíclica.

3.3 – Identificação dos pulsos de potenciais que possibilitem a análise simultânea de AA e AS por FIA/AMP

A partir de informações obtidas nas Figuras 3.1 e 3.4, uma sequência (escada) cíclica de dois pulsos de potenciais a ser aplicada em função do tempo foi selecionada, a qual é relacionada a seguir:

(1)+0,9 V/50ms: oxidação e quantificação de AA sem a interferência do AS;

(2)+1,35 V/50ms: oxidação de ambos os analitos (AA e AS);

A Figura 3.6 apresenta os amperogramas obtidos com a injeção de uma solução contendo somente AA ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$), somente AS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e uma solução contendo ambos os compostos (AA+AS) na mesma concentração anterior ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS) no sistema FIA com detecção amperométrica pulsada. Neste experimento foram aplicados em função do tempo dois pulsos de potenciais (alternadamente): 0,9 e 1,35 V (50 ms cada). As soluções foram injetadas em duplicata.

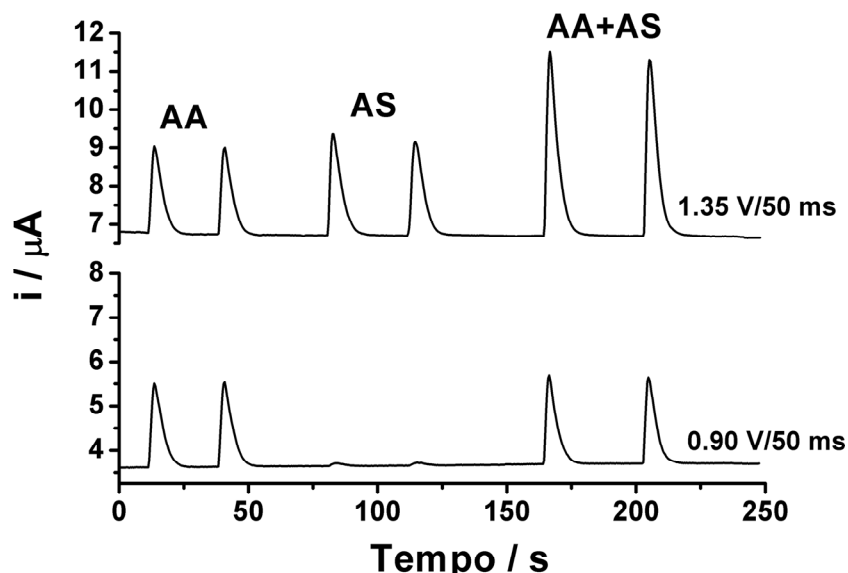


Figura 3.6: Amperogramas obtidos nos pulsos de potencial 0,9 V e 1,35 V com a injeção de três soluções de composições diferentes: 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AA; 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS e uma solução contendo ambos os compostos (AA+AS) na mesma concentração (60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AA; 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS). Eletrólito: ácido acético/acetato 0,10 mol L^{-1} (pH 4,7); Vazão: 4,5 mL min^{-1} ; Volume injetado: 100 μL .

Como pode ser observado na Figura 3.6, o AA é oxidado em ambos os pulsos de potenciais e AS somente em 1,35 V. Desta forma conclui-se que o AA pode ser detectado e quantificado no pulso de potencial de +0,9 V sem a interferência do AS. O AS, por sua vez, somente é eletroativo no pulso de potencial de 1,35 V, onde o AA também é oxidado. A estratégia proposta neste trabalho para a quantificação do AS sem a interferência do AA é o uso da diferença de sinal detectada nos dois pulsos de potenciais, segundo a Equação 1:

$$I_{\text{AS}} = I_{+1,35 \text{ V}} - I_{+0,9 \text{ V}} \quad \text{Equação 1}$$

Porém, conforme pode ser observado na Figura 3.6, a corrente de oxidação do AA não apresenta a mesma magnitude em ambos os pulsos de potenciais, o que impede o uso de uma subtração simples de sinal para ter acesso à corrente proveniente da oxidação de somente o AS em 1,35 V. Uma opção adotada neste trabalho foi a seguinte: soluções contendo somente AA são injetadas para determinar a intensidade (diferença) de corrente detectada para este composto nos dois pulsos de potenciais utilizados (+0,9 e +1,35 V). A partir deste resultado experimental, um fator pode ser calculado, utilizando-se a Equação 2:

$$fator = I_{+1,35 \text{ V}} / I_{+0,9 \text{ V}} \quad \textbf{Equação 2}$$

O *fator* é usado para determinar a corrente proveniente da oxidação do AS no pulso de potencial de +1,35 V quando uma solução contendo os analitos é injetada. No caso do estudo de seletividade (Figura 3.6), o fator encontrado foi de 1,16.

$$I_{AS} = I_{+1,35 \text{ V}} - (fator \times I_{+0,9 \text{ V}}) \quad \textbf{Equação 3}$$

3.4 – Estudo de repetibilidade

Conforme já descrito anteriormente [80], a oxidação do AS pode contaminar a superfície de um eletrodo de trabalho sólido usado no procedimento eletroquímico. Este problema pode ser minimizado em sistemas FIA devido a um menor tempo de contato entre a superfície do eletrodo de trabalho e o(s) analito(s) em questão. Com o objetivo de minimizar os problemas relacionados à contaminação do eletrodo, uma vazão considerada relativamente alta para sistemas FIA passou a ser usada ($4,5 \text{ mL min}^{-1}$), assim como um volume de injeção relativamente baixo ($100 \text{ }\mu\text{L}$). Desta forma, o tempo de contato entre o analito e o eletrodo

passou a ser menor e, simultaneamente, a frequência analítica (número de injeções h^{-1}) foi incrementada. Outro parâmetro que também foi considerado nesta etapa do estudo é o número de aquisições (leituras) realizadas pelo software do equipamento durante a aquisição de um pico transiente. Neste trabalho, por segurança, 20 pontos foi considerado o número mínimo aquisições por pico transiente.

Empregando estes parâmetros (vazão = $4,5 \text{ mL min}^{-1}$; volume injetado = $100 \text{ }\mu\text{L}$), um estudo de repetibilidade foi realizado com o sistema proposto. A Figura 3.7A apresenta os resultados obtidos em função de injeções sucessivas de soluções padrão contendo uma mistura de AA e AS em duas concentrações diferentes ($30 + 50$ e $80 + 130 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de AA + AS, respectivamente) no sistema FIA com detecção amperométrica pulsada ($0,90 \text{ V}/50 \text{ ms}$ e $1,35 \text{ V}/50 \text{ ms}$ V) usando DDB como eletrodo de trabalho e tampão ácido acético/acetato ($\text{pH} = 4,7$) como eletrólito suporte. Como pode ser observado, apesar do eletrodo de DDB apresentar boa resistência à passivação ou envenenamento de sua superfície eletródica (além do curto período de tempo de contato entre eletrodo e a solução amostra), uma queda na corrente de oxidação dos compostos estudados em função do tempo foi verificada, o que pode ser facilmente observado com auxílio das linhas tracejadas inseridas na Fig. 3.7A. Uma opção para tentar melhorar este desempenho seria diminuir o número de injeções hora, pois assim aumentaria o tempo de aplicação do pulso de potencial de limpeza. Porém, isto iria diminuir a frequência analítica e aumentaria a quantidade de resíduo gerado por análise.

Como a técnica de amperometria de múltiplos pulsos (AMP) permite a aplicação de até 10 pulsos de potenciais sequenciais (tempo de aplicação de cada pulso na ordem de milissegundos) em função do tempo (software GPES – Metrohm Autolab), a estratégia testada foi à inclusão de um terceiro pulso de potencial no sistema de detecção (com a função de periódica ou “constante” limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo).

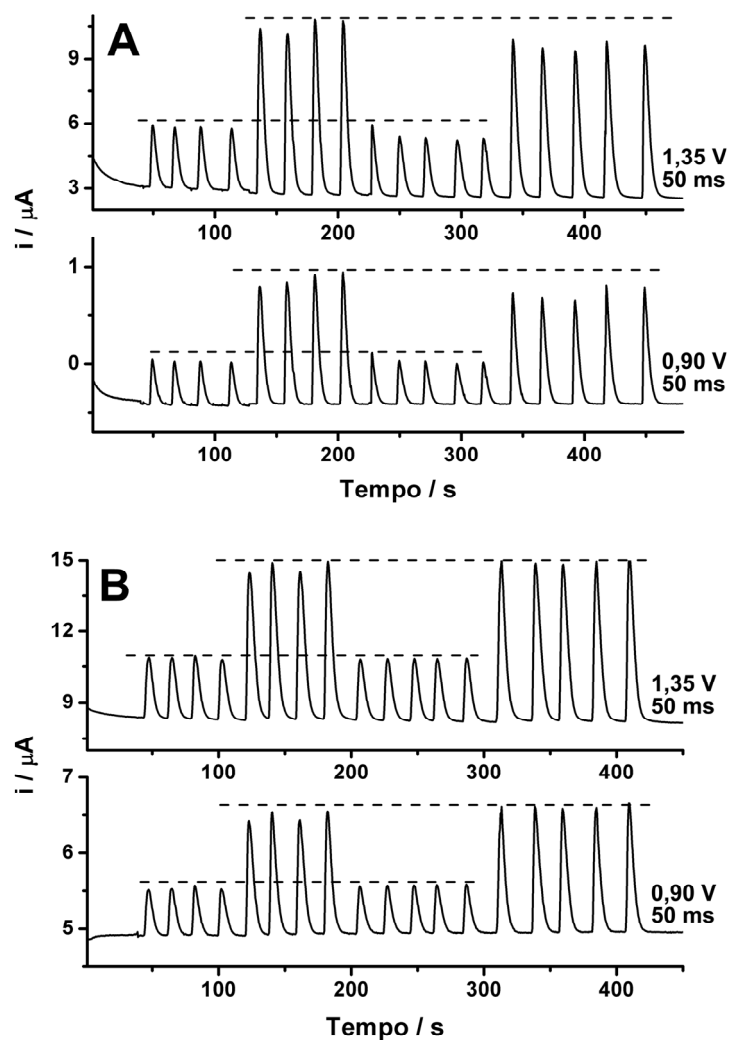


Figura 3.7. Amperogramas obtidos com o sistema FIA proposto mostrando injeções sucessivas de soluções padrão contendo uma mistura de AA e AS em duas concentrações diferentes ($30 + 50$ e $80 + 130 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA + AS, respectivamente). (A) Sem aplicação do pulso de potencial de limpeza; (B) Com aplicação do pulso de potencial de $0,0 \text{ V}$ por 300 ms (amperograma não apresentado); Vazão de $4,5 \text{ mL min}^{-1}$; Volume injetado: $100 \mu\text{L}$.

A Figura 3.7B apresenta os resultados obtidos com injeções sucessivas das mesmas soluções injetadas no experimento 3.7A, mas com a inclusão de um terceiro pulso de potencial no sistema de detecção (0,90 V/50 ms; 1,35 V/50 ms V e 0,00 V/ 300 ms). Neste caso, é importante observar que o eletrodo de trabalho permanece por 100 ms promovendo a oxidação de AA ou AA+AS (etapa de contaminação) e por 300 ms promovendo a limpeza eletroquímica do eletrodo. Em outras palavras, o eletrodo permanecerá 25 % do tempo na etapa de contaminação e 75 % do tempo na etapa de limpeza eletroquímica. A opção pelo pulso de potencial de 0,0 V se deve ao fato de que neste potencial um sinal de redução ou dessorção é observado para o AS no experimento de voltametria cíclica (Fig. 3.1). A Tabela 3.1 apresenta os resultados obtidos nos estudo de repetibilidade.

Tabela 3.1. Desvios padrões relativos (n = 9) calculados a partir dos estudos de repetibilidade com o sistema FIA proposto sem e com o emprego de um pulso de potencial de limpeza (0,0 V/300 ms).

| Solução Injetada (AA + AS) / $\mu\text{mol L}^{-1}$ | Sem <i>E</i> de limpeza | | Com <i>E</i> de limpeza (0,0 V/300 ms) | |
|--|----------------------------|--------|---|--------|
| | 0,90 V | 1,35 V | 0,90 V | 1,35 V |
| 30 + 50 | 2,23% | 2,21% | 0,95% | 0,66% |
| 80 + 130 | 2,91% | 2,15% | 1,48% | 1,09% |

Como pode ser observado, uma melhora considerável nos resultados foi obtida após a inclusão do pulso de potencial que promove “constante” limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho (DDB). É importante salientar que o uso do pulso de potencial de limpeza não implica em perda de desempenho do método. Somente ocorre um aumento na corrente

capacitiva devido ao incremento na amplitude do pulso de potencial. A média ($n = 10$) do ruído da linha base foi de $5,3 \pm 0,6$ e $7,0 \pm 1,0$ nA no experimento sem e com o uso do pulso de potencial de limpeza eletroquímica, respectivamente. Assim, podemos concluir que com a inclusão do pulso de potencial de limpeza, o limite de detecção varia muito pouco.

3.5 – Estudos para a identificação da faixa linear de resposta entre concentração e corrente de oxidação de AA e AS

Uma vez definidos os pulsos de potenciais de oxidação e limpeza eletroquímica na determinação simultânea de AA e AS, estudos foram realizados com o objetivo de identificar o intervalo no qual existe uma relação linear entre a corrente de oxidação e a concentração de cada composto.

A Figura 3.8 apresenta os resultados obtidos com a injeção de soluções contendo concentrações crescentes de AA no sistema FIA-AMP com o objetivo de identificação da faixa em que há uma relação linear entre a corrente de oxidação e a concentração de AA. As soluções injetadas continham as seguintes concentrações de AA: $a = 10$; $b = 30$; $c = 60$; $d = 90$; $e = 120 \mu\text{mol L}^{-1}$.

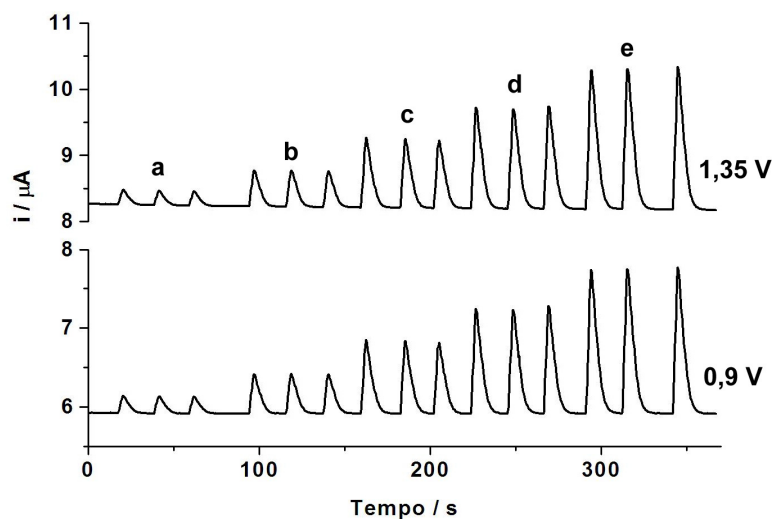


Figura 3.8: Amperogramas obtidos com a injeção no sistema FIA de soluções padrão contendo concentrações crescentes de AA: a) 10 ; b) 30 ; c) 60 ; d) 90 ; e) 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Pulso de potencial de limpeza: 0,0 V/300 ms; Vazão de 4,5 mL min^{-1} ; Volume injetado: 100 μL .

Usando a média ($n = 3$) das correntes de pico de cada concentração injetada no estudo de identificação da faixa linear, duas curvas analíticas foram construídas. Uma referente ao à corrente detectada no pulso de potencial 0,9V e a outra referente ao pulso de potencial 1,35 V, tendo sido obtidos excelentes coeficientes de correlação linear em ambos os pulsos de potenciais ($R = 0,999$), conforme apresentado na Figura 3.9.

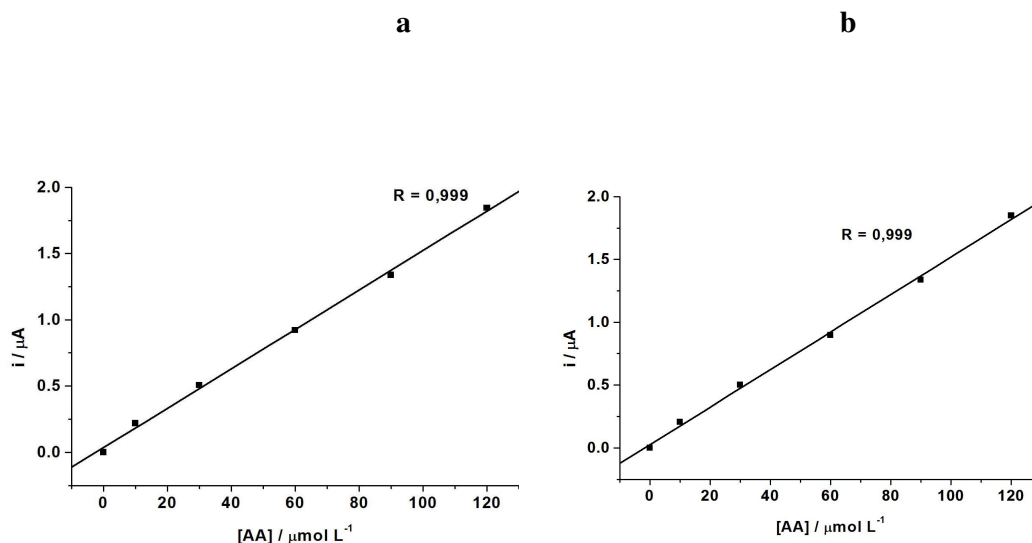


Figura 3.9: Curvas analíticas obtidas a partir das correntes de oxidação do AA nos amperogramas apresentados na Fig. 3.8. (a) 0,9 V; (b) 1,35 V.

A equação de regressão linear entre a corrente de oxidação de AA e sua respectiva concentração no pulso de potencial de +0,9 V é dada por:

$$I (\mu\text{A}) = 0,03543 + 0,01488 C (\mu\text{mol L}^{-1}); R = 0,999 \quad \text{Equação 4}$$

No pulso de potencial de +1,35 V, a equação da regressão linear entre a corrente de oxidação de AA e sua respectiva concentração é dada por:

$$I (\mu\text{A}) = 0,02648 + 0,01493 C (\mu\text{mol L}^{-1}); R = 0,999 \quad \text{Equação 5}$$

Para o AA, uma resposta linear na faixa de concentração estudada (10 a 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi observada em ambos os pulsos de potenciais (0,90 e 1,35 V), e com coeficientes lineares iguais a 0,999 em ambos os casos.

Os estudos realizados para a identificação da faixa de concentração no qual o sinal amperométrico de oxidação de AA é linear versus concentração também foram usados para averiguar em que faixa de concentração o *fator* entre a corrente de oxidação do AA em +1,35 V e +0,90 V ($I_{AA \text{ em } +1,35 \text{ V}}/I_{AA \text{ em } +0,90 \text{ V}}$) é constante. Este *fator* será usado para identificar a corrente proveniente da oxidação de AS no pulso de potencial de + 1,35 V, de acordo com equação 3. A Tabela 3.1 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 3.2: Variação do *fator* ($I_{AA+1,35 \text{ V}}/I_{AA+0,90 \text{ V}}$) em função da concentração de AA.

| AA ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Média $I_{1,35\text{V}} (\mu\text{A})$ | Média $I_{0,9\text{V}} (\mu\text{A})$ | *Fator de correção* |
|-------------------------------|---|--|------------------------|
| 10 | 0,207 | 0,200 | 1,03 |
| 30 | 0,513 | 0,500 | 1,03 |
| 60 | 0,897 | 0,896 | 1,00 |
| 90 | 1,337 | 1,336 | 1,00 |
| 120 | 1,847 | 1,847 | 1,00 |

*Fator = $I_{1,35 \text{ V}} / I_{0,90 \text{ V}}$

Os resultados apresentados na Tabela 3.1 demonstram que o *fator de correção* ($I_{AA+1,35}/I_{AA+0,90}$) a ser usado para identificar a corrente proveniente da oxidação do AS em +1,35 V é relativamente constante na faixa de concentração estudada (entre 10 e 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Nesta faixa, o valor médio foi calculado em $1,01 \pm 0,02$, o que corresponde a um desvio médio relativo de 2,75% ($n = 5$). Segundo estudos realizados, em cada nova calibração do método para análise simultânea de AA e AS é aconselhável que uma solução contendo somente AA seja injetada para a determinação do fator existente entre os sinais adquiridos nos pulsos de potenciais de +0,90 e 1,35 V. Pequenas variações podem ocorrer no

fator (entre um experimento e outro) em função da vazão, do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais e principalmente em função do procedimento de limpeza eletroquímico usado com o eletrodo de DDB.

O mesmo estudo foi repetido para o AS (estudo de linearidade). Na Figura 3.10 são apresentados os resultados obtidos na injeção de soluções contendo concentrações crescentes de AS, com o objetivo de identificar a faixa de concentração em que há uma relação linear entre corrente de oxidação e sua respectiva concentração. As soluções injetadas continham as seguintes concentrações de AS: a = 16; b = 50; c = 100; d = 150; e = 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

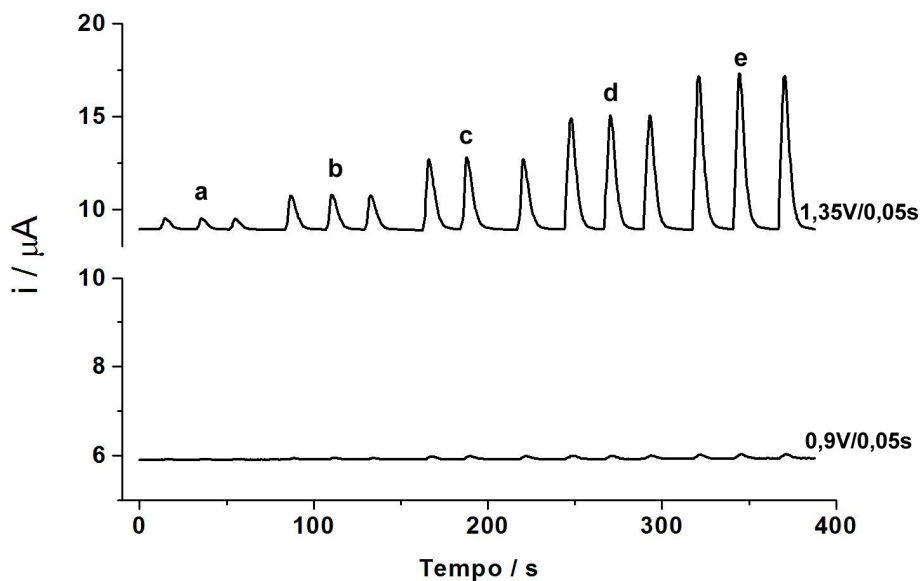


Figura 3.10: Amperogramas obtidos em função da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de AS: a) 16; b) 50; c) 100; d) 150; e) 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Pulso de potencial de limpeza: 0,0 V/300 ms; Vazão: 4,5 mL min^{-1} ; Volume injetado: 100 μL .

Considerando o sinal médio de corrente ($n = 3$) detectado em 1,35 V, uma curva analítica foi construída, com a obtenção de excelente coeficiente de correlação linear ($R=0,999$), conforme apresentado na Figura 3.11

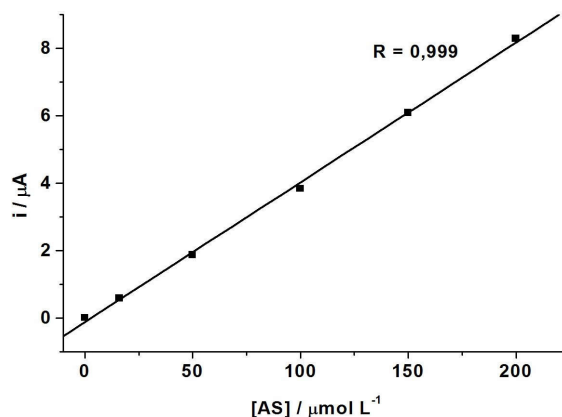


Figura 3.11: Curva analítica obtida a partir das correntes de oxidação do AS do amperograma apresentado na Fig. 3.11.

No pulso de potencial de +1,35 V, a equação da regressão linear para a análise do AS é dada por:

$$I (\mu\text{A}) = -0,12216 + 0,04143 C (\mu\text{mol L}^{-1}); R = 0,999 \quad \text{Equação 6}$$

Conforme pode ser observado, o AS apresenta uma relação linear entre concentração e corrente amperométrica de oxidação na faixa estudada. Além disto, também pode ser observado que o AS somente é eletroativo no pulso de potencial de 1,35 V, sendo que não apresenta sinal em 0,90 V. A corrente detectada em 0,90 V na injeção da solução contendo $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ é negligenciável, pois a corrente detectada no pulso de potencial de 1,35 V é noventa vezes maior. No entanto, na injeção de concentrações superiores de AS (nestas condições experimentais), este problema tende a se agravar. Portanto, neste estudo, a concentração de $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi considerada a concentração máxima de AS a ser utilizada.

3.6 – Curvas analíticas para determinação simultânea de AA e AAS em formulações farmacêuticas

Três condições foram consideradas para definir a faixa de concentração a ser usada na construção da curva de calibração na análise simultânea de AA e AAS em formulações farmacêuticas:

- (1) Faixa de concentração onde há linearidade entre corrente de oxidação detectada e a concentração, tanto para AA, como de AS;
- (2) Faixa de concentração de AA onde o *fator de correção* ($i_{AA+1,35\text{ V}}/i_{AA+0,9\text{ V}}$) é constante;
- (3) Relação entre a concentração de AA e AS existente em formulações farmacêuticas comerciais (AA = 240 mg; AAS = 400 mg; 1,7 vezes).

A Figura 3.12 apresenta os amperogramas obtidos nos pulsos de potenciais de +0,90 V e +1,35 V em função da injeção, em triplicata, de soluções padrão contendo, respectivamente, AA e AS: (a) 30 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (b) 40 e 65 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (c) 50 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (d) 60 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (e) 70 e 115 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (f) 80 e 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Além disto, uma solução contendo somente (g) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AA também foi injetada com o objetivo de obter (calcular) o fator de correção a ser usado na Equação 3 para ter acesso à corrente proveniente da oxidação do AS no pulso de potencial de 1,35 V. As soluções contendo AA + AS foram injetadas em ordem crescente e decrescente de concentração.

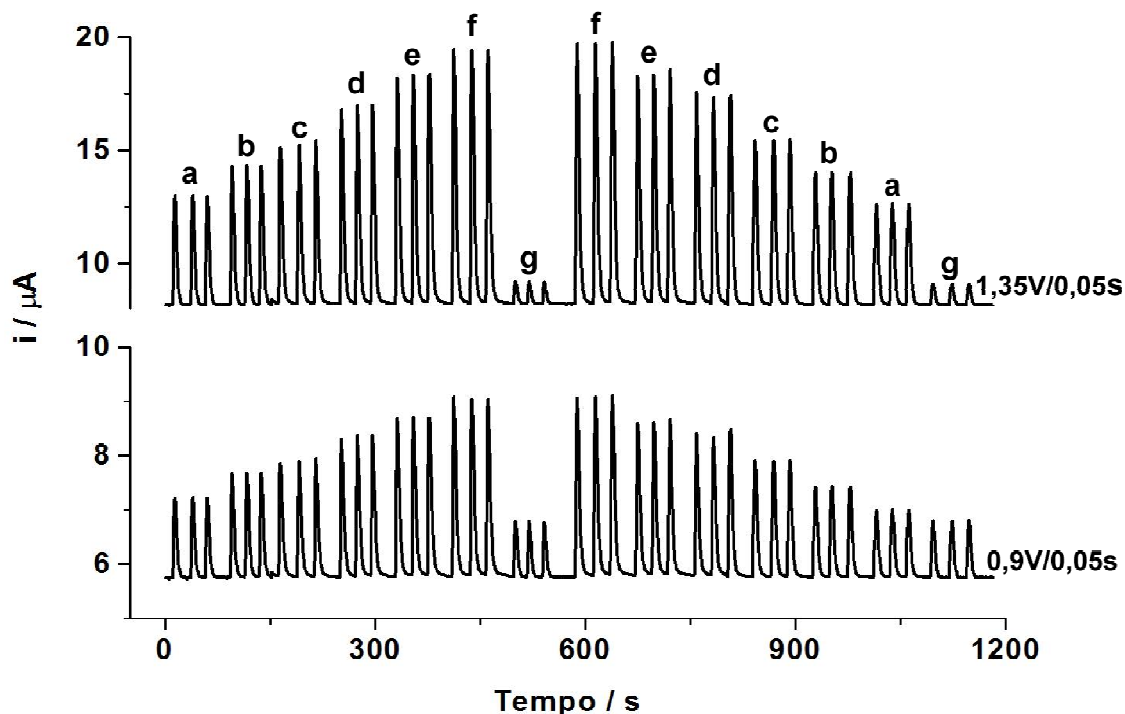


Figura 3.12: Amperogramas obtidos a partir de injeções de soluções padrão contendo, respectivamente, as seguintes concentrações de AA + AS: (a) 30 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (b) 40 e 65 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (c) 50 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (d) 60 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (e) 70 e 115 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (f) 80 e 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (g) apenas AA 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Pulso de potencial de limpeza: 0,0 V/300 ms. Vazão: 4,5 mL min^{-1} ; Volume de injeção: 100 μL .

A Figura 3.13 apresenta as curvas analíticas (em ordem crescente e decrescente de concentração), para a quantificação de AA, obtidas a partir do amperograma (médias das alturas das correntes) detectado no pulso de potencial de 0,90 V (detecção do AA).

Ambas as curvas apresentaram bom coeficiente de correlação linear ($R=0,994$ na curva da concentração crescente, e $R=0,999$ na curva da concentração decrescente).

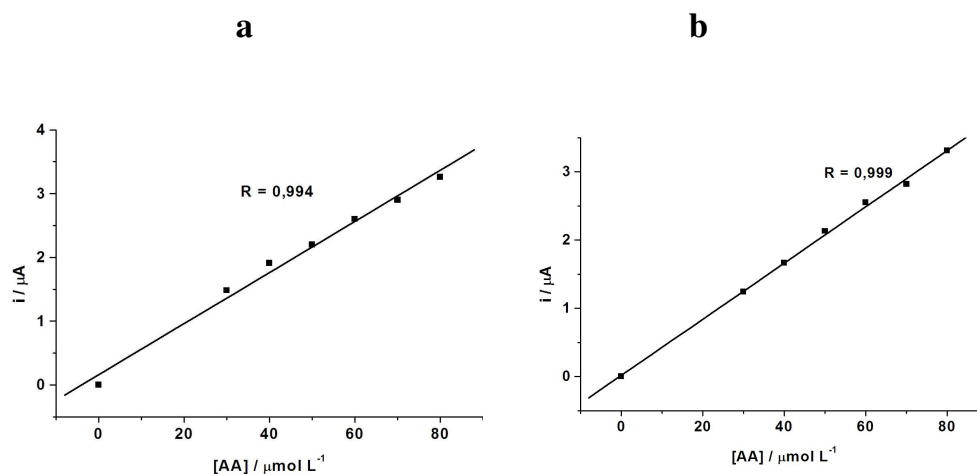


Figura 3.13: Curvas analíticas obtidas para AA com a injeção das soluções em ordem crescente (a) e decrescente (b) de concentração. Os dados foram obtidos a partir do amperograma da Fig. 3.12 (0,90 V/ 50 ms).

As equações de regressão linear (análise de AA) obtidas a partir do gráfico da Fig. 3.13 são as seguintes (0,90 V):

- Ordem crescente de concentração: $I (\mu A) = 0,1601 + 0,04009 C (\mu mol L^{-1})$**Equação 7**

- Ordem decrescente de concentração: $I (\mu A) = 0,01732 + 0,04118 C (\mu mol L^{-1})$ **Equação 8**

A Figura 3.14 apresenta as curvas analíticas (em ordem crescente e decrescente de concentração) para a quantificação de AS obtidas a partir do amperograma (médias das alturas das correntes) detectado no pulso de potencial de 1,35 V (Fig. 3.13). Neste caso, a corrente de oxidação de AS foi obtida mediante o uso da equação 3:

$$I_{AS} = I_{+1,35 V} - (fator \times I_{+0,9 V})$$

O fator usado na equação acima foi obtido a partir do sinal gerado pela injeção de uma solução contendo somente AA (Fig. 3.13 g). O valor do fator encontrado foi de 0,9

$$\text{Fator de correção} = I_{+1,35 \text{ V}} / I_{+0,9 \text{ V}} \text{ (solução contendo somente AA)}$$

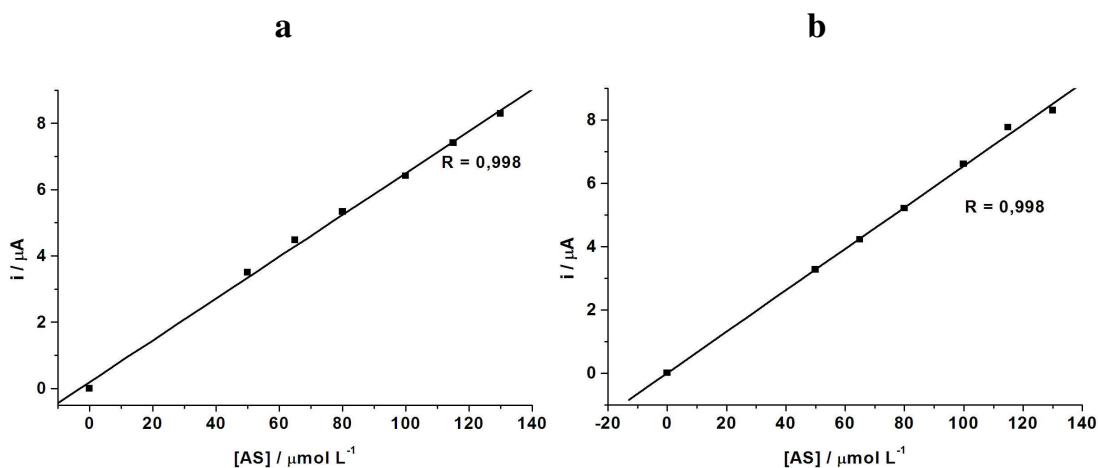


Figura 3.14: Curvas analíticas obtidas para AS com a injeção das soluções em ordem crescente (a) e decrescente (b) de concentração. Os dados foram obtidos a partir do amperograma da Fig. 3.13 (1,35 V/ 50 ms) usando a seguinte equação:

$$I_{\text{AS}} = I_{+1,35 \text{ V}} - (\text{fator} \times I_{+0,9 \text{ V}}).$$

As equações de regressão linear (análise de AS) obtidas a partir do gráfico da Fig. 3.14 são as seguintes (1,35 V):

- Ordem crescente de concentração: $I (\mu\text{A}) = 0,019238 + 0,06309 C (\mu\text{mol L}^{-1})$ **Equação 9**

- Ordem decrescente de concentração: $I (\mu\text{A}) = 0,00441 + 0,06541 C (\mu\text{mol L}^{-1})$ **Equação 10**

3.7 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação calculados para AA e AS com o método proposto, bem como o coeficiente de correlação (R) são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.3: Limites de detecção e quantificação e coeficiente de correlação

| Fármacos | R | LD | LQ |
|-----------------|----------|--------------------------|--------------------------|
| AA | 0,998 | 174 nmol L ⁻¹ | 579 nmol L ⁻¹ |
| AAS | 0,999 | 164 nmol L ⁻¹ | 547 nmol L ⁻¹ |

3.8 - Análise de amostras de formulações farmacêuticas contendo AA e AAS

Amostras de quatro lotes diferentes de comprimidos efervescentes contendo AA e AAS foram adquiridas e preparadas conforme descrito no procedimento experimental. A Tabela 3.2 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos usando o método proposto e os obtidos por HPLC.

Tabela 3.4: Comparação entre os resultados obtidos na determinação simultânea de AA e AAS em quatro formulações farmacêuticas empregando o método proposto (FIA-AMP) e HPLC.

| Amostra | Fármaco | Bula ¹ | FIA-AMP ¹ | HPLC ¹ | E ₁ (%) ² | E ₂ (%) ³ |
|----------|---------|-------------------|----------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1 | AA | 240 | 224 ± 4 | 233 ± 3 | -7 | -3,7 |
| | AAS | 400 | 364 ± 6 | 349 ± 3 | -9 | 4,3 |
| 2 | AA | 240 | 229 ± 7 | 238 ± 4 | -4,5 | -3,7 |
| | AAS | 400 | 392 ± 9 | 385 ± 5 | -2 | 2 |
| 3 | AA | 240 | 279 ± 6 | 280 ± 4 | 16 | -1 |
| | AAS | 400 | 430 ± 3 | 430 ± 4 | 7,5 | 0 |
| 4 | AA | 240 | 287 ± 6 | 287 ± 6 | 19,5 | 0 |
| | AAS | 400 | 424 ± 4 | 430 ± 5 | 6 | -1,4 |

1 - Em mg; **2**– Erro relativo em relação à bula do comprimido efervescente; **3** – Erro relativo em relação ao HPLC.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 3.3, o método proposto de determinação simultânea de AA e AAS apresentou resultados similares aos obtidos por HPLC. Os resultados obtidos com ambos os métodos foram comparados estatisticamente usando o “*teste F*” e o “*teste t*” [83, 84]. Aplicando o “*teste F*”, foi possível verificar que dois métodos fornecem precisões equivalentes considerando um nível de confiança de 95 %. Todos os valores calculados foram inferiores ao valor tabelado ($F_{\text{tabelado}} = 19,00$). Considerando o *teste t*, os resultados médios ($n = 3$) de ambos os métodos não apresentaram diferença significativa em um nível de confiança de 95%, sendo que o $t_{\text{calculado}}$ foi inferior ao t_{tabelado} (2,78). Somente a amostra 1 apresentou um valor calculado superior ao valor tabelado.

Além disso, estudos de adição e recuperação também foram realizados com as amostras contendo simultaneamente AA e AAS. O objetivo deste estudo foi de obter

informações sobre possíveis interferências geradas pela matriz dessas amostras sobre a resposta obtida. Para este estudo foram feitos experimentos em triplicata, por meio da adição de alíquotas de solução padrão de AA e AAS às soluções contendo amostras diluídas das formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação na determinação de AA e AAS em formulações farmacêuticas usando o método proposto.

| Amostra | Fármaco | Concentração encontrada (mg) | Concentração adicionada (mg) | Concentração encontrada (mg) | Recuperação (%) |
|----------|---------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| 1 | AA | 38 ± 2 | 54 | 102 ± 3 | 111 |
| | AAS | 82 ± 3 | 90 | 171 ± 2 | 99 |
| 2 | AA | 38 ± 2 | 70 | 117 ± 1 | 108 |
| | AAS | 82 ± 1 | 117 | 217 ± 1 | 109 |
| 3 | AA | 43 ± 1 | 54 | 102 ± 1 | 105 |
| | AAS | 82 ± 1 | 90 | 170 ± 2 | 99 |
| 4 | AA | 43 ± 2 | 70 | 102 ± 1 | 90 |
| | AAS | 82 ± 3 | 117 | 219 ± 3 | 110 |

Como pode ser observado na Tabela 3.5, as recuperações variaram entre 90 e 111% para o AA e 99 % e 110% para o AAS. Esses valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras nas determinações de AA e AAS nas formulações farmacêuticas comerciais estudadas.

3.8 - Estudos complementares

3.8.1 Análise por injeção em batelada (BIA)

3.8.1.1 – Breve introdução sobre a técnica

Em 1991, Wang e Taha [85] introduziram a técnica de Análise por Injeção por Batelada (BIA). Esse procedimento consiste na injeção de uma pequena quantidade da solução amostra ou padrão, por meio de uma micropipeta (normalmente eletrônica), que tem sua ponteira disposta próxima à interface do eletrodo de trabalho (~ 2 mm). Sendo assim, a célula eletroquímica, onde há a solução de eletrólito, é também considerada do tipo *wall-jet*. Por não depender de propulsão de eletrólito e tubulação para carreamento do analito, a técnica não é considerada em fluxo. O detector registra um pico de resposta transiente que reflete a passagem da amostra sobre a interface do eletrodo de trabalho.

Os autores deste trabalho descreveram as vantagens da operação por BIA, semelhantes às do sistema FIA. São elas: alta frequência analítica, necessidade de pouca quantidade de amostra ou padrão, boa sensibilidade e reprodutibilidade. Em adição, como vantagem sobre FIA, tem-se: não dependência de bomba de propulsão, minimização de problemas com vazamentos e com bolhas no sistema, consumo de menor quantidade de eletrólito (dependente do número de análises) e maior facilidade em sua implementação, principalmente fora do ambiente de laboratório (análises “in situ”) [86].

3.8.1.2 – Aplicação da técnica neste trabalho

Os estudos iniciais para a determinação simultânea de AA e AAS foram realizados empregando BIA. Porém, o sistema BIA não apresentou resultados reprodutíveis em função do tempo (no modo estacionário - sem agitação mecânica da solução), mesmo com a aplicação constante do pulso de potencial de limpeza eletroquímica. O uso de um agitador mecânico comum não era possível, pois na célula BIA usada nos estudos, o eletrodo de trabalho de DDB é posicionado na parte inferior da célula, local onde a barra magnética ficaria operando. Um agitador mecânico que permite a agitação da solução através da inserção de uma haste metálica pela parte superior da célula foi adquirido pelo grupo, mas o ruído gerado na linha base por este sistema de agitação foi excessivo, impossibilitando sua utilização. Assim, optamos em desenvolver a metodologia por FIA.

No entanto, recentemente, com auxílio de um micro-motor DC (24 V), normalmente usados em impressoras, máquinas copiadoras ou brinquedos, um agitador com melhor eficácia foi construído. Uma pequena adaptação foi necessária. Um tubo de teflon ($\varnothing = 1,0$ cm; comprimento = 5,0 cm) foi adaptado ao eixo do micro-motor. A velocidade de agitação pode ser controlada mediante o uso de uma fonte de tensão variável (1,5 a 12 V).

As condições otimizadas em FIA (eletrólito, eletrodos, pulsos de potenciais aplicados, faixa linear de resposta) foram mantidas no sistema BIA. Somente o volume de injeção foi variado de 100 para 150 μL e a velocidade de injeção usando da pipeta eletrônica foi de 30 $\mu\text{L s}^{-1}$. A velocidade e o volume de injeção foram definidos para aumentar o número de aquisições por pico transiente do sistema BIA.

A Figura 3.15 apresenta os resultados obtidos com o sistema BIA (sob agitação constante) e injeções sucessivas ($n = 10$) de uma solução padrão contendo uma mistura de AA

e AS (40 e $65 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente). Os pulsos de potenciais aplicados foram os seguintes: $0,90 \text{ V}/50 \text{ ms}$; $1,35 \text{ V}/50 \text{ ms}$ e $0,0 \text{ V}/300 \text{ ms}$.

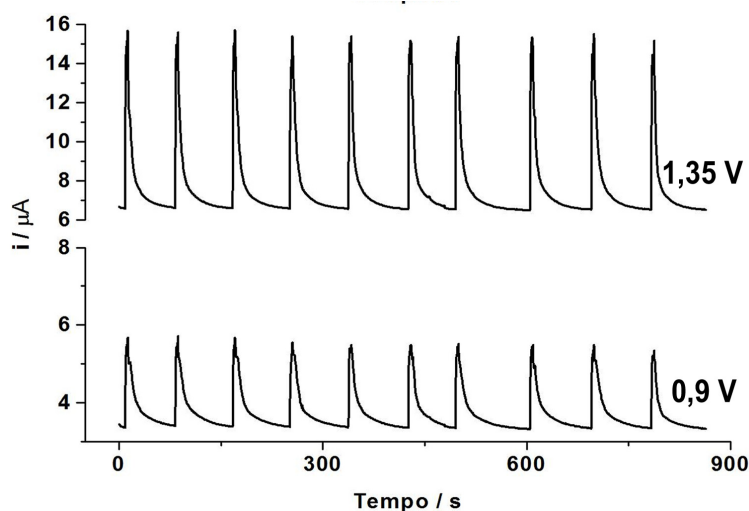


Figura 3.15: Amperogramas obtidos com o sistema BIA (sob agitação) em função de 10 injeções sucessivas de uma solução contendo 40 e $65 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA e AS, respectivamente. Pulso de potencial de limpeza: $0,0 \text{ V}/300 \text{ ms}$. Eletrólito tampão ácido acético/acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH $4,7$). Velocidade de injeção: $30 \mu\text{L s}^{-1}$. Volume de injeção: $150 \mu\text{L}$.

Os desvios padrões relativos foram calculados em $1,0$ e $0,6 \%$ nos amperogramas obtidos em $0,9 \text{ V}$ e $1,35 \text{ V}$, respectivamente. Quando o sistema BIA foi usado nas mesmas condições, porém, sem agitação mecânica da solução, os desvios padrões relativos foram calculados em 3 e 7% , respectivamente.

A Figura 3.16 apresenta os amperogramas obtidos com o sistema BIA (sob agitação constante) para a injeção de uma solução de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA (a) e de soluções contendo concentrações crescentes de AA e AS, respectivamente (30 e 50 ; 40 e 65 ; 50 e 80 ; 60 e 100 ; 70 e 115 , 80 e $130 \mu\text{mol L}^{-1}$).

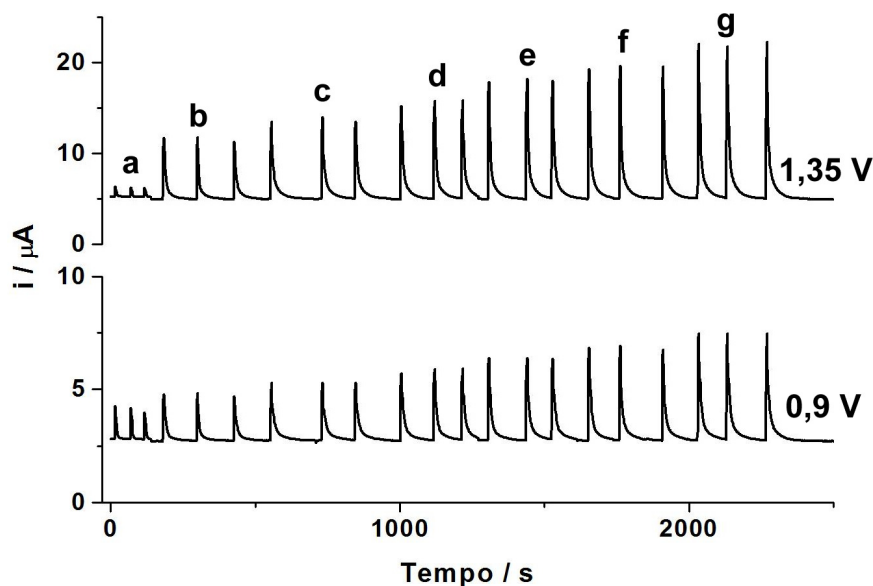


Figura 3.16: Amperogramas obtidos a partir de injeções de soluções padrão contendo (a) AA $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e concentrações crescentes de AA + AS, respectivamente: (b) 30 e 50, (c) 40 e 65; (d) 50 e 80; (e) 60 e 100; (f) 70 e 115; (g) 80 e 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Pulso de potencial de limpeza: 0,0 V/300 ms. Eletrólito: tampão HAc/Ac $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7). Velocidade de injeção: $30 \mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado: $150 \mu\text{L}$.

A Figura 3.17 apresenta as curvas analíticas obtidas a partir dos amperogramas apresentados na Figura 3.16. Assim como no sistema FIA, a quantificação de AA é realizada com a corrente detectada em 0,90 V (detecção do AA) e a quantificação de AS foi obtida mediante o uso da equação 3:

$$I_{\text{AS}} = I_{+1,35 \text{ V}} - (\text{fator} \times I_{+0,9 \text{ V}})$$

O *fator* de correção foi calculado a partir da injeção de uma solução contendo somente AA (*fator* = 0,83). Ambas as curvas analíticas apresentaram bom coeficiente linear de correlação ($R=0,999$ para AA e $R=0,998$ para AS).

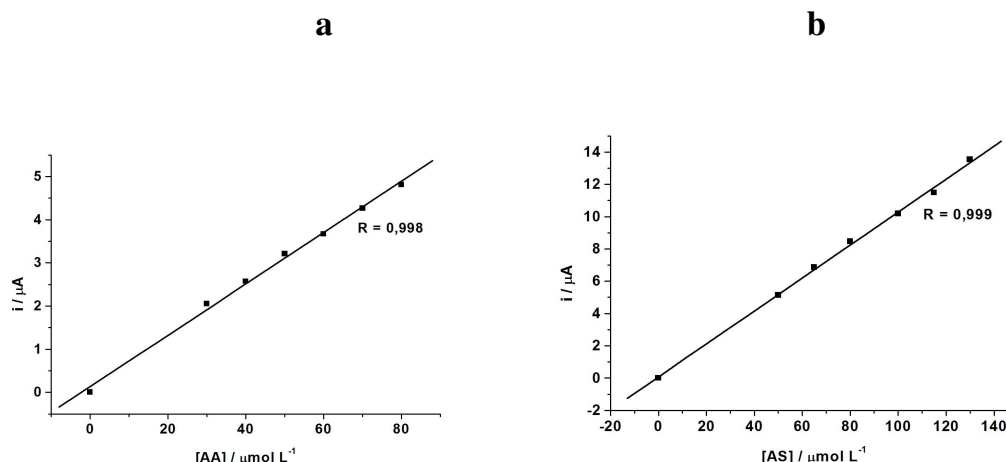


Figura 3.17: Curvas analíticas obtidas para AA (a) e AS (b) empregando o sistema BIA. Os dados foram obtidos a partir dos amperogramas da Figura 3.16.

As equações de regressão linear, obtidas a partir do gráfico da Fig. 3.17 são as seguintes:

- No potencial de 0,9 V (AA): $I_{AA} (\mu\text{A}) = 0,16667 + 0,05894 C (\mu\text{mol L}^{-1})$ **Equação 11**

- $I_{AS} = I_{+1,35 \text{ V}} - (\text{fator} \times I_{+0,9 \text{ V}})$: $I_{AAS} (\mu\text{A}) = 0,06825 + 0,10218 C (\mu\text{mol L}^{-1})$ **Equação 12**

Conforme os resultados apresentados empregando o sistema BIA e considerando a similaridade entre BIA e FIA, não é exagero afirmar (apesar do número reduzido de testes) que o sistema BIA pode ser usado com sucesso na determinação de simultânea de AA e AAS em formulações farmacêuticas. O sistema de injeção empregando a pipeta eletrônica adquirido da empresa Eppendorf (Multipette® stream) é altamente reprodutível, mesmo as injeções realizadas por diferentes operadores.

3.8.2 – Análise simultânea de AA e AAS por voltametria de onda quadrada

A análise simultânea de AA e AAS por FIA ou BIA é conveniente se um número considerável de amostras necessitam ser analisadas. Uma calibração externa é realizada e em seguida as amostras são rapidamente injetadas e o resultado é obtido rapidamente. No entanto, quando um número reduzido de amostras necessitam ser analisadas (menos de três, por exemplo), um procedimento usando uma célula estacionária, o método de adição de padrão e voltametria de onda quadrada (SWV) ou de pulso diferencial (DPV) pode ser vantajoso. Neste caso, certo volume de eletrólito é adicionado a uma célula, em seguida uma alíquota da amostra e três ou quatro alíquotas de uma solução padrão e o resultado pode ser fornecido (com registro de um voltamograma a cada adição).

A célula empregada neste estudo é semelhante à usada no procedimento BIA, mas com capacidade inferior em volume (100 mL). A Figura 3.18 apresenta os voltamogramas obtidos na análise de uma amostra simulada usando SWV. O experimento foi realizado sob constante agitação mecânica da solução e é apresentado com correção de linha de base (software GPES).

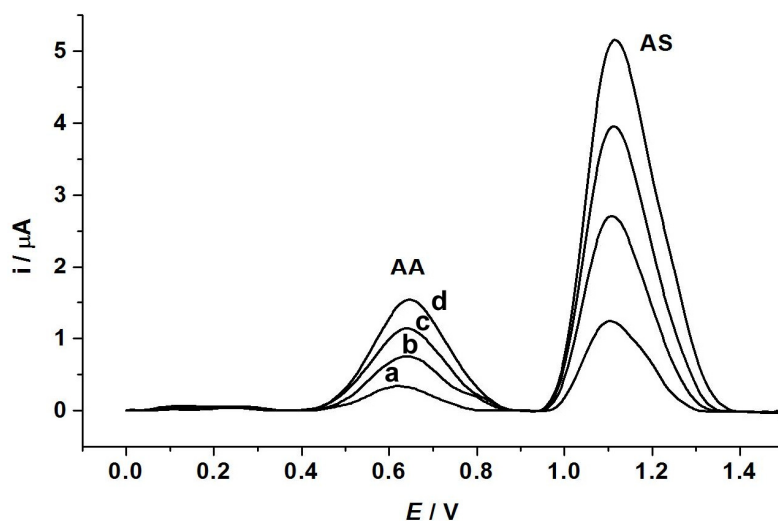


Figura 3.18: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução amostra convenientemente diluída (a) e três adições sucessivas de alíquotas de uma solução padrão contendo, respectivamente, AA e AS: (b) 25 e 40; (c) 50 e 80; (d) 75 e 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Frequência: 20 Hz; Amplitude: 40 mV; Incremento de potencial: 4 mV; Potencial de pré-tratamento: 0,0 V/ 10 s; Eletrodo de trabalho: DDB; Eletrólito: Tampão HAc/Ac⁻ 0,1 mol L⁻¹.

Apesar dos parâmetros da técnica de SWV não terem sido devidamente otimizados, o método apresentou boa estabilidade e seletividade adequada para a determinação de AA e AS nesta amostra (boa separação entre os picos), sendo que o AA apresentou um pico de oxidação em +0,7 V e o AS em +1,1 V. A análise foi realizada sob constante agitação e com a aplicação de um potencial de pré-tratamento (0,0 V/10 s), antes do registro de cada voltamograma.

A Figura 3.19 apresenta as regressões lineares obtidas a partir das correntes de pico dos voltamogramas apresentados na Fig. 3.18.

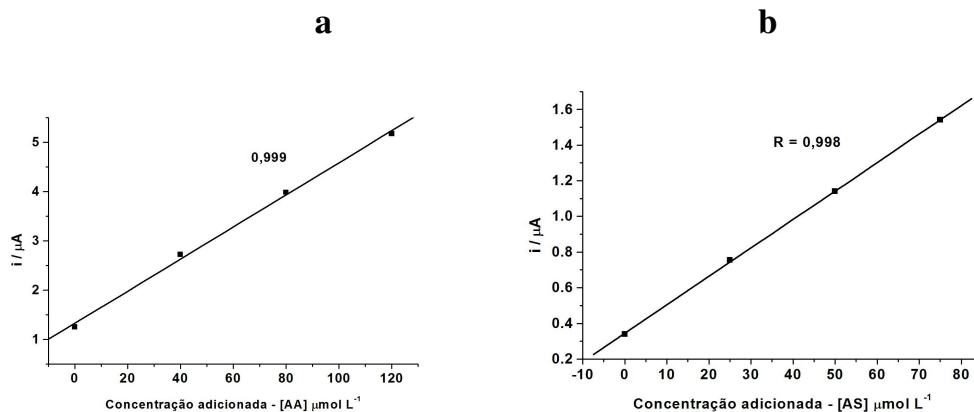


Figura 3.19: Gráficos de regressão linear obtidas para uma amostra simulada contendo AA (a) e AS (b). Os dados foram obtidos da Fig. 3.18.

As equações de regressão lineares obtidas a partir do gráfico da Fig. 3.19 são as seguintes:

- No potencial de 0,9 V (AA): $I_{AA} (\mu A) = 0,3449 + 0,01596 C (\mu mol L^{-1})$ **Equação 13**

- No potencial de 1,35 V (AS): $I_{As} (\mu A) = 1,327 + 0,03255 C (\mu mol L^{-1})$ **Equação 14**

Na Tabela 3.6 são apresentados os resultados obtidos na análise de duas amostras sintéticas usando voltametria de onda quadrada e o método de adição de padrão. Conforme pode ser observado, as recuperações estão próximas de 100 %, o que permite concluir que o método tem potencial para ser usado no controle de qualidade de formulações farmacêuticas com esta composição.

Tabela 3.6: Resultados obtidos na determinação sequencial rápida de AA e AAS por SWV

| Amostra | Fármaco | Conc. Simulada (mg) | Conc. analisada (mg) | Recuperação (%) |
|----------|---------|------------------------|-------------------------|--------------------|
| A | AA | 240 | 264 ± 2 | 110 |
| | AAS | 400 | 432 ± 3 | 108 |
| B | AA | 240 | 233 ± 1 | 97 |
| | AAS | 400 | 412 ± 4 | 103 |

CONCLUSÕES

4.1 – Conclusões

Neste trabalho foi demonstrado que o método proposto (Análise por injeção em Fluxo com detecção Amperométrica de Múltiplos Pulsos – FIA/AMP) é eficiente na determinação simultânea de aspirina (AAS) e vitamina C (AA) em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos são similares aos obtidos por HPLC a um nível de confiança de 95 %.

O sucesso foi obtido mediante o uso de DDB como eletrodo de trabalho em meio de tampão ácido acético/acetato (pH = 4,7) e a aplicação dos seguintes pulsos de potenciais:

- 0,9 V/ 50 ms – Oxidação do AA gerando ácido dehidroascórbico (DHA).
- 1,35 V/ 50 ms – Oxidação de ambos os compostos: ácido ascórbico gerando ácido dehidroascórbico e ácido salicílico gerando ácido benzóico 2,3-dihidroxilado (2,3-DHBA) e ácido benzóico 2,5-dihidroxilado (2,5-DHBA).
- 0,0 V/ 300 ms – pulso de potencial necessário para constante limpeza ou manutenção da superfície do eletro de trabalho.

A corrente detectada em 0,9 V foi usada na quantificação do AA, sendo que na quantificação de AAS, a estratégia usada foi a subtração da corrente detectada entre 1,35 e 0,9 V mediante o emprego de um fator de correção. O fator de correção é obtido com a injeção no sistema de uma solução contendo somente AA. Seguem as equações utilizadas:

$$fator = I_{AA \text{ em } 1,35 \text{ V}} / I_{AA \text{ em } 0,9 \text{ V}}; \quad I_{AS} = I_{1,35 \text{ V}} - (I_{0,9 \text{ V}} \times fator)$$

O método proposto apresentou faixa linear de resposta entre 30 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AA e entre 50 e 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AAS. Os coeficientes de regressão linear calculados estavam próximos a 0,999 para ambos os fármacos nesta faixa de concentração. O método é estável em função do tempo (DPR = $\sim 1,05 \%$; $n = 18$). Os limites de detecção foram calculados em 0,17 e 0,16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AA e AAS, respectivamente. A frequência analítica foi calculada em 125 injeções h^{-1} .

Adicionalmente foi demonstrado que o método FIA proposto pode ser implementado em BIA (análise por injeção em batelada), desde que o sistema esteja sob convecção constante (agitação mecânica da solução). Diversas condições otimizadas em FIA podem ser utilizadas no sistema BIA. Além disto, também foi demonstrado que a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) empregando o método de adição de padrão pode ser usada na determinação de AA e AAS em formulações farmacêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

1. ANVISA, *Farmacopéia Brasileira 5ª edição*, ed. edição. Vol. 2. 2010, Brasília-DF: Anvisa. 853.
2. NRC, *Dietary reference intakes: for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids*. 2000, Washington, D.C.: National Academy Press.
3. Dammann, H.G.; Saleki, M.; Torz, M.; Schulz, H; Krupp, S; Schurer, M; Timm, J; Gessner, U., *Effects of buffered and plain acetylsalicylic acid formulations with and without ascorbic acid on gastric mucosa in healthy subjects*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2004, **19**(3): p. 367.
4. Candelario-Jalil, E.; Akundi, R; Bhatia, H; Lieb, K.; Appel, K; Munoz, E; Hull, M; Fiebich, B., *Ascorbic acid enhances the inhibitory effect of aspirin on neuronal cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E-2 production*. *Journal of Neuroimmunology*, 2006, **174**(1-2): p. 39.
5. Sartori, E.; Rocha, R. C.; Fatibello, O., *Square-Wave Voltammetric Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Formulations using a Boron-Doped Diamond Electrode without the Need of Previous Alkaline Hydrolysis Step*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2009, **20**(2): p. 360.
6. Burckhalter, J. H.; Korolkovas, A, *Química Farmacêutica*. 1988, Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan. 783
7. Rang, H. P.; Dale, J. M.; Ritter, J. M; Moore, H., *Farmacologia*. 5ª ed. 2003, Rio de Janeiro - RJ: Elsevier. 904.
8. Filho, G. B., *Bogliolo Patologia*. sexta ed. 2000, Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan. 1328.
9. Korolkovas, A., *Dicionário Terapêutico Guanabara*. 2001, Bra Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan.15.5
10. USP, N., *United State Pharmacopeia The National Formulary*. 27, ed. 32. 2009, Rockville: United State Pharmacopeia Convention.
11. Martindale, *The Complete Drug Reference*. 31ª ed, Tanton Massachusetts: Word Color Service.
12. Yebra-Biurrun, M. C., *Flow injection determination methods of ascorbic acid*. *Talanta*, 2000, **52**(3): p. 367.
13. Halliwell, B., *Vitamin C and genomic stability*. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2001, **475**(1-2): p. 29.

14. Moraes, R. L. F.; Szenelwar, R. B., *Determinação de salicilemia pelo método colorimétrico de Trinder e espectrofluorimétrico de Baselt*. Revisão Farmacêutica e Bioquímica. Universidade de São Paulo, 1987, **23**(2): 159.
15. Sena, M. M.; Fernandes, J. C. B.; Rover, L.; Poppi, R. J.; Kubota, L. T., *Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry*. Analytica Chimica Acta, 2000, **409**(1-2): p. 159.
16. Merckle, P.; Kovar, K. A., *Assay of effervescent tablets by near-infrared spectroscopy in transmittance and reflectance mode: acetylsalicylic acid in mono and combination formulations*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1998, **17**(3): p. 365.
17. Dinc, E.; Ozdemir, A; Baleanu, D., *Comparative study of the continuous wavelet transform, derivative and partial least squares methods applied to the overlapping spectra for the simultaneous quantitative resolution of ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, **37**(3): p. 569.
18. Dinc, E.; Ozdemir, A., *Multivariate spectral calibration technique based on regression analysis for the quantitative multiresolution of a ternary mixture containing paracetamol, ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets*. Pharmazie, 2004, **59**(9): p. 700.
19. Dinc, E.; Baleanu, D., *Wavelet transform with chemometrics techniques for quantitative multiresolution analysis of a ternary mixture consisting of paracetamol, ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets*. Revista De Chimie, 2006, **57**(5): p. 505.
20. Dinc, E.; Baleanu, D., *Application of Haar and Mexican hat wavelets to double divisor-ratio spectra for the multicomponent determination of ascorbic acid, acetylsalicylic acid and paracetamol in effervescent tablets*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2008, **19**(3): p. 434.
21. Toral, M. I.; Lara, N; Richter, P.; Tassara, A.; Tapia, E; Rodriguez, C., *Simultaneous determination of ascorbic acid and acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations*. Journal of Aoac International, 2001, **84**(1): p. 37
22. Dogan, H. N.; Duran, A., *Simultaneous spectrophotometric determination of aspirin, acetaminophen and ascorbic acid in pharmaceutical preparations*. Pharmazie, 1998, **53**(11): p. 781.
23. Kmetec V., *Simultaneous determination of acetylsalicylic, salicylic, ascorbic and dehydroascorbic acid by HPLC*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1992, **10**(10-12): p. 107
24. Ruzicka, J.; Hansen, E. H., *Homogeneous and heterogeneous systems - Flow Injection Analysis today and tomorrow*. Analytica Chimica Acta, 1988, **214**(1-2): p. 1.

25. Zagatto, E. A. G.; Reis, B. F.; Bergamin, H., *The concept of volumetric fraction in Flow Injection Analysis*. Analytica Chimica Acta, 1989, **226**(1): p. 129.
26. Tue-Ngeun, O.; Jakmunee, J.; Grudpan, K., *A novel stopped flow injection-amperometric procedure for the determination of chlorate*. Talanta, 2005, **68**(2): p. 459.
27. Felix, F. S.; Angnes, L., *Fast and accurate analysis of drugs using amperometry associated with Flow Injection Analysis*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, **99**(12): p. 4784.
28. Gimenes, D. T., *Desenvolvimento de metodologias analíticas usando FIA com detecção amperométrica: análise de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico*, in Instituto de química. 2009, Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia: Uberlândia-MG.
29. Ruzicka, J.; Hansen, E. H., *Retro-review of flow-injection analysis*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2008, **27**(5): p. 390.
30. Mervartova, K.; Polasek, M.; Calatayud, J. M., *Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, **45**(3): p. 367.
31. Dunec, A. F.; Cheregi, M.; Calatayud, J. M.; Mateo, M. V. G.; Enein, H. Y. A., *Flow injection methods of analysis for waters. II. Organic pollutants*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2003, **33**(1): p. 57.
32. Matos, R. C.; Gutz I. G. R.; Angnes, L.; Fontenele, R. S.; Pedrotti, *Propulsor pneumático versátil e isento de pulsão para sistemas de análise em fluxo*. Química Nova, 2001, **24**: p. 4.
33. dos Santos, W. T. P.; Ceolin, M. P.; de Albuquerque, Y. D. T.; Richter, E. M., *Uso da pressão gerada por uma coluna de água para controle da vazão em sistemas de análises em fluxo*. Química Nova, 2007, **30**: p. 5.
34. dos Santos, W.T. P.; Gimenes, D. T.; Richter, E. M.; Angnes, L., *Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: Potencialidades e aplicações*. Química nova, 2011, **34**: p. 1753.
35. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A., *Princípios da Análise Instrumental*. Editora Bookman ed, ed. edição, 2002.
36. Chailapakul, O.; Siangproh, W.; Tryk, D. A., *Boron-doped diamond-based sensors: A review*. Sensor Letters, 2006, **4**(2): p. 99.

37. Gimenes, D. T.; dos Santos, W. T. Pio; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M., *Internal standard in flow injection analysis with amperometric detection*. Electrochemistry Communications, 2010, **12**(2): p. 216.
38. Silva, W.C., *Determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica*, in *Instituto de química*. Dissertação de mestrado, 2011, Universidade Federal de Uberlândia.
39. Medeiros, R. A., *Desenvolvimento de Procedimentos Eletroanalíticos para a Determinação de Antioxidantes e Corantes em Produtos Alimentícios Empregando um Eletrodo de Diamante Dopado com Boro*. Tese de doutorado - Departamento de Química. 2011, UFSCar: São Carlos.
40. Galli, A. D. S. D.; Garbellini, G. S.; Coutinho, C. F. B.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A.; Machado, S. A. S., "Electroanalytical techniques for the determination of pesticides in food." *Quimica nova*, 2006, **29**. p. 105.
41. Wang, J., *Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications*, Deerfield Beach: VCH Publishers, 1985.
42. Baranauskas, V., *O futuro brilhante dos diamantes sintéticos*. Ciência Hoje, 2000, **27**. p. 40.
43. de Barros, R. C. M.; Ribeiro, M. C.; An-Sumodjo, P. T.; Juliao, M. S. D.; Serrano, S. H. P.; Ferreira, N. G., *Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I: Histórico, produção e caracterização*. Química Nova 2005, **28**: p. 317.
44. Pleskov, Y. V., *Electrochemistry of diamond: A review*. Russian Journal of Electrochemistry, 2002, **38**(12): p. 1275.
45. Butler, J. E.; Woodin, R. L., *Thin-film diamond growth mechanism*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences, 1993, **342**(1664): p. 209.
46. Hupert, M.; Muck, A.; Wang, R.; Stotter, J.; Cvackova, Z.; Haymond, C.; Show, Y.; Swain, G. M., *Conductive diamond thin-films in electrochemistry*. Diamond and Related Materials, 2003, **12**(10-11): p. 1940.
47. Luong, J. H. T.; Male, K. B.; Glennon, J. D.; *Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications*. Analyst, 2009, **134**(10): p. 1965.
48. Carvalho, A. E., *Caracterização Eletroquímica de Eletrodos de Diamante Dopado com Boro em Função do seu Pré-Tratamento*. Tese de doutorado. Departamento de química. 2007, UFSCar: São Carlos.
49. Felix, F. S., *Novos materiais para aplicações analíticas nas determinações de compostos orgânicos de interesse farmacêutico e ambiental*. 2009, Tese de doutorado. USP: São Paulo.

50. Panizza, M.; Cerisola, G.; *Application of diamond electrodes to electrochemical processes*. *Electrochimica Acta*, 2005, **51**(2): p. 191.
51. Fatibello-Filho, O.; Medeiros R. A.; Carvalho, A.; Rocha-Filho, R., *Determinação voltamétrica de ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando um eletrodo de diamante dopado com boro*. *Quimica nova*, 2008, **31**: p. 5
52. Wangfuengkanagul, N.; Chailapakul, O., *Electrochemical analysis of D-penicillamine using a boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system*. *Talanta*, 2002, **58**(6): p. 1213.
53. Wangfuengkanagul, N.; Siangproh, W; Chailapakul, O., *A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode*. *Talanta*, 2004, **64**(5): p. 1183.
54. Suryanarayan, V.; Zhang, Y.; Yoshihara, S; Shirakashi, T., *Voltammetric assay of naproxen in pharmaceutical formulations using boron-doped diamond electrode*. *Electroanalysis*, 2005, **17**(11): p. 925.
55. Karuwan, C.; Mantim, T.; Chaisuwan, P.; Wilairat, P.; Grudpan, K; Jittangprasert, P.; Einaga, Y.; Chailapakul, O.; Suntornsuk, L. Anurukvorakun, O.; Nacapricha, D., *Pulsed amperometry for anti-fouling of boron-doped diamond in electroanalysis of beta-agonists: Application to flow injection for pharmaceutical analysis*. *Sensors*, 2006, **6**(12): p. 1837.
56. Oliveira, R. T. S.; Salazar-Banda, G. R.; Ferreira, V. S.; Oliveira, S. C.; Avaca, L. A., *Electroanalytical determination of lidocaine in pharmaceutical preparations using boron-doped diamond electrodes*. *Electroanalysis*, 2007, **19**(11): p. 1189.
57. Dogan-Topal, B.; Uslu, B.; Ozkan, B. A. *Investigation of electrochemical behavior of lipid lowering agent atorvastatin calcium in aqueous media and its determination from pharmaceutical dosage forms and biological fluids using boron-doped diamond and glassy carbon electrodes*. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2007, **10**(7): p. 571.
58. Uslu, B.; Topal, B. D.; Ozkan, S. A., *Electroanalytical investigation and determination of pefloxacin in pharmaceuticals and serum at boron-doped diamond and glassy carbon electrodes*. *Talanta*, 2008, **74**(5): p. 1191.
59. Ribeiro, F. W. P.; Cardoso, A. S.; Portela, R. R.; Lima, J. E. S.; Machado, S. A. S.; de Lima-Neto, P.; de Souza, D; Correia, A. N., *Electroanalytical determination of promethazine hydrochloride in pharmaceutical formulations on highly boron-doped diamond electrodes using square-wave adsorptive voltammetry*. *Electroanalysis*, 2008, **20**(18): p. 2031.
60. Souza, C. D.; Braga, O. C.; Vieira, I. C.; Spinelli, A., *Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2008. **135**(1): p. 66.

61. Sartori, E. R.; Medeiros, R. A.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O., *Square-Wave Voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a Boron-Doped Diamond Electrode without the need of previous alkaline hydrolysis step*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2009, **20**(2): p. 360.
62. de Lima-Neto, P.; Correia, A. N.; Portela, R. R.; Juliao, M. S.; Linhares-Junior, G. F.; de Lima, J. E. S.. *Square wave voltammetric determination of nitrofurantoin in pharmaceutical formulations on highly boron-doped diamond electrodes at different boron-doping contents*, 2010, Talanta. **80**(5): p. 1730.
63. Lourencao, B. C.; Medeiros, R. A.; Rocha-Filho, R. C.; Mazo, L.H.; Fatibello-Filho, O., *Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode*. Talanta, 2009, **78**(3): p. 748.
64. Altun, Y.; Dogan-Topal, B.; Uslu, B.; Ozkan, S. A., *Anodic behavior of sertindole and its voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum using glassy carbon and boron-doped diamond electrodes*. Electrochimica Acta, 2009, **54**(6): p. 1893.
65. Altun, Y.; Uslu, B.; Ozkan, S. A., *Electroanalytical characteristics of lercanidipine and its voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum on Boron-Doped Diamond Electrode*. Analytical Letters, 2010, **43**(12): p. 1958.
66. Sartori, E. R., Medeiros, R. A.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O., *Square-wave voltammetric determination of propranolol and atenolol in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode*. Talanta, 2010, **81**(4-5): p. 1418.
67. Lourenção, B. C.; Medeiros, R. A.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O., *Simultaneous differential pulse voltammetric determination of ascorbic acid and caffeine in pharmaceutical formulations using a Boron-Doped Diamond Electrode*. Electroanalysis, 2010, **22**(15): p. 1717.
68. Batista, E. F.; Sartori, E. R.; Medeiros, R. A.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O., *Differential pulse voltammetric determination of sildenafil citrate (viagra®) in pharmaceutical formulations using a Boron-Doped Diamond Electrode*. Analytical Letters, 2010, **43**(6): p. 1046.
69. Silva, E. M; de Melo, D.; de Moura, M. D.; de Farias, R. F., *An investigation about the solid state thermal degradation of acetylsalicylic acid: polymer formation*. Thermochemica Acta, 2004, **414**(1): p. 101-104.
70. Pedrotti, J.J.; Angnes, L.; Gutz, I. G. R., *Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions*. Electroanalysis, 1996, **8**(7): p. 673.
71. Granger, M.C.; Witek, M.; Xu, J. S.; Wang, J.; Hupert, M.; Hanks, A.; Koppang, M. D.; Butler, J. E.; Lucazeau, G.; Mermoux, M.; Strojek, J. W.; Swain, G. M., *Standard electrochemical behavior of high-quality, boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes*. Analytical Chemistry, 2000, **72**(16): p. 3793.

72. Tormin, T.; Gimenes, D. T.; Richter, E. M.; Lúcio, A.; *Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection*. Talanta, 2011, **85**(3): p.1274.
73. Bart, M. O.; van Os P. J. H. J.; Kamp, B.; Bult, A.; van Bennekom, W. P., *Development of a confined wall-jet flow-through cell for simultaneous electrochemical and surface plasmon resonance applications*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2002, **84**(2-3): p. 129.
74. Yagi, I.; Ishida, T.; Uosaki, K., *Electrocatalytic reduction of oxygen to water at Au nanoclusters vacuum-evaporated on boron-doped diamond in acidic solution*. Electrochemistry Communications, 2004, **6**(8): p. 773.
75. Bergamin, F.; Zagatto, E. A. G.; Krug, F. J.; Reis, B. F., *Merging zones in flow injection analysis double proportional injector and reagent consumption*. Analytica Chimica Acta, 1978, **101**(1): p. 17.
76. Franeta, J. T.; Agbaba, D.; Eric, S.; Pavkov, S.; Aleksic, M.; Vladimirov, S., *HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets*. Farmaco, 2002, **57**(9): p. 709.
77. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C., *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Química Nova, 2004, **27**: p. 10.
78. Gimenes, D. T.; dos Santos, W. T. P.; Tormin, T. F.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M., *Flow-Injection Amperometric method for indirect determination of dopamine in the presence of a large excess of ascorbic acid*. Electroanalysis, 2009, **22**(1): p. 74.
79. Wisser, K.; Gassner, R., *Investigation of redox equilibrium ascorbic acid dehydroascorbic acid with cyclic voltametry*. Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie, 1972, **259**(3): p. 209.
80. Torriero, A. A. J.; Luco, J. M.; Sereno, L.; Raba, J., *Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceutical formulations of acetylsalicylic acid*. Talanta, 2004, **62**(2): p. 247.
81. Oliveira-Brett, M.; Teodor, A. E; Fatibello-Filho, O; Oliveira-Brett, M., *Electrochemical Behavior of Triflusal, Aspirin and their Metabolites at Glassy Carbon and Boron Doped Diamond Electrodes*. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2010, **13**: p. 9.
82. Fornaro, A.; Coichev N., *L-ascorbic acid: Complexation and redox reactions with some transition metal ions*. Quimica nova, 1998, **21**(5): p. 642.
83. Pezza, L; Tubino, M.; Biono, .A. C.; Villa, .M.; Pezza, .H. R., *Spot-test identification and rapid quantitative sequential analysis of dipyrone*. Eclética química, 2010, **35**: p. 41.

84. Miller, J. N.; Miller J. C., *Estatística e quimiometria para química analítica*. Prentice Hall, 2002.
85. Wang, J; Taha, Z., *Batch injection analysis*. Analytical Chemistry, 1991, **63** (10): p. 1053.
86. Quintino, M. S. M.; Angnes, L., *Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool*. Electroanalysis, 2004, **16**(7): p. 513.