

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Determinação estequiométrica de dimenidrinato e simultânea de 8-cloroteofilina, difenidramina e piridoxina usando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos

JHONYS MACHADO DE FREITAS

Dissertação de Mestrado

UBERLÂNDIA

Fevereiro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Determinação estequiométrica de dimenidrinato e simultânea de 8-cloroteofilina, difenidramina e piridoxina usando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Aluno: Jhonys Machado De Freitas

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Área de concentração: Química Analítica

Fevereiro de 2015



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 209/PPQUI.

DATA: 6/2/2015

DISCENTE: Jhonys Machado de Freitas

MATRÍCULA: 11312QMI004

TÍTULO DO TRABALHO: Determinação rápida e simultânea de 8-cloroteofilina, difenidramina e piridoxina usando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de procedimentos alternativos e de baixo custo para controle de qualidade de formulações farmacêuticas usando FIA e/ou BIA com detecção amperométrica e Diamante Dopado com Boro (DDB) como eletrodo de trabalho.

Às nove horas do dia seis de fevereiro do ano dois mil e quinze, no Auditório do Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Valber de Albuquerque Pedrosa, da Universidade Estadual de São Paulo, Nívia Maria Melo Coelho e Eduardo Mathias Richter, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) 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 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). 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 A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Determinação estequiométrica de difenidramina e simultânea de 8-cloroteofilina, difenidramina e piridoxina por injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos.

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. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 55 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa
UNESP

Profª Dra. Nívia Maria Melo Coelho
IQUFU

Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter – IQUFU

À minha mãe, Vânia, e minha avó, Marlene,

por todo o amor, apoio, carinho, paciência, dedicação.

À minha irmã, Danielly, pelo amor e por sempre acreditar em mim

Ao meu orientador, Eduardo, por toda a paciência e ensinamentos.

Aos amigos e companheiros, Thiago, Matheus, Alysson e Pâmela.

AGRADECIMENTOS

- *Primeiro a Deus por estar sempre em minha vida, me abençoando sempre com muita força e vontade se seguir.*
- *À minha família, minha mãe, minha avó Marlene, meu avô Vivaldo, meu padrasto Gilmar, minha irmã Dany e meu cunhado Bruno, que são a base para tudo.*
- *Ao meu orientador, Prof. Eduardo M. Richter, pela orientação, paciência, incentivo confiança e exemplo de pessoa e profissional.*
- *Ao Prof. Rodrigo A. A. Munoz, pelo apoio durante todo o trabalho.*
- *À Denise T. Gimenes, que foi fundamental no início deste trabalho, pela presteza, paciência e por todos os ensinamentos.*
- *Ao Thiago Costa, pela amizade, apoio e presença constante em todos os momentos.*
- *Ao meu amigo e companheiro Matheus, por toda a paciência apoio e suporte.*
- *Aos amigos especiais, Alysson, Pâmela, Mirele, Juliana, Átila que sempre trazem alegria e apoio nas horas difíceis.*
- *Aos amigos do NUPE, pela amizade e momentos de descontração, ajuda e discussões: André Luis, Rodrigo (Banana), David, Denise, Gracy, Jéssica, Laiz, Mariana, Michelle, Rafael Melo, Rafael (Pisquilha), Thiago Tormin, Weberson, Renata, Almir, Polyana Luiza, Luiz André, Dalyelli, Eduardo, Polyana, Danielle, Ana Paula, Rodrigo Franco, Poliana Freire, Jian, Clarice, Helieder e a todos que não estão citados aqui.*
- *Aos professores do IQ-UFU que contribuíram para a minha formação.*
- *Aos técnicos e secretários do IQ-UFU e das coordenações pela ajuda sempre que necessário.*
- *Aos membros da banca pela aceitação e contribuições a serem concedidas para o aprimoramento deste trabalho.*
- *À CAPES e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.*
- *Ao IQ-UFU pelo espaço físico concedido.*

RESUMO

No presente trabalho investigou-se a potencialidade do sistema de Análise por Injeção em Batelada com detecção por Amperometria de Múltiplos Pulsos (BIA-MPA) usando diamante dopado com boro (BDD) na determinação simultânea de 8-cloroteofilina (CTF) e difenidramina (DIF), e destes simultaneamente com piridoxina (PIR) ou cafeína (CAF), em formulações farmacêuticas.

A determinação simultânea de CTF e DIF por BIA-MPA foi realizada através da aplicação de três pulsos de potenciais em função do tempo ao eletrodo de BDD usando NaAc/HAc 0,05 mol L⁻¹ (pH = 4,7) como eletrólito suporte. Em +1,35 V/50ms, CTF foi detectada (oxidação) sem a interferência de DIF. Em +1,80 V/50ms, ambos os compostos (CTF + DIF) foram oxidados. A corrente de oxidação da DIF foi obtida pela subtração entre as correntes detectadas em ambos os pulsos de potenciais mediante uso de um fator de correção. O pulso de 0,7 V/200 ms foi aplicado para evitar a contaminação/passivação da superfície do eletrodo de trabalho (BDD). O método proposto apresentou estabilidade (RSD = 2,4 e 2,5% para CTF e DIF, respectivamente; n=20), alta frequência analítica (70 injeções h⁻¹), faixa linear de resposta entre 10 e 60 µmol L⁻¹ (r > 0,998) e os LD e LQ de 2,2 e 7,3 µmol L⁻¹ para CTF e em 0,5 e 1,7 µmol L⁻¹ para DIF, respectivamente. O método proposto foi aplicado na determinação simultânea de CTF e DIF em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram similares ao obtidos por HPLC, a um nível de confiança de 95%.

O mesmo sistema (BIA-MPA) também foi adaptado para a determinação simultânea de PIR, CTF e DIF. Neste método, os seguintes pulsos de potenciais foram aplicados sequencialmente ao eletrodo de BDD usando H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte: a) + 1,25 V/50 ms: oxidação da CTF sem interferência dos demais compostos; b) + 1,60 V/50 ms: oxidação de CTF e PIR sem a interferência de DIF; c) + 1,80 V/50 ms: oxidação de CTF, PIR e DIF; d) + 1,0 V (150 ms): aplicado para evitar a contaminação do eletrodo de trabalho de BDD. Expressões matemáticas simples e fatores de correção foram utilizados para obtenção das correntes de oxidação de cada analito. Este método proposto apresentou os seguintes resultados: estabilidade (RSD= 0,9, 1,5 e 1,5% para CTF, PIR e DIF, respectivamente; n=20), alta frequência analítica (~60 injeções h⁻¹), faixa linear de resposta entre 20,0 e 60,0 µmol L⁻¹ para CTF e DIF e entre 10,0 e 30,0 µmol L⁻¹ para PIR e os LD e LQ de 0,19 e 0,62 µmol L⁻¹ para CTF, 0,54 e 1,81 µmol L⁻¹ para PIR e 0,18 e 0,60 µmol L⁻¹ para DIF. O método proposto

foi aplicado na determinação simultânea de CTF, PIR e DIF em amostras farmacêuticas comerciais e os resultados obtidos foram similares ao obtidos por HPLC a um nível de confiança de 95%.

Um terceiro método (similar ao segundo) foi proposto para a determinação simultânea de CAF, CTF e DIF. Os pulsos de potencial aplicados foram + 1,10 V (oxidação da CTF), +1,40 V (oxidação de CTF e CAF) e + 1,70 V (oxidação de CTF, CAF e DIF) usando NaAc/HAc 0,05 mol L⁻¹ (pH = 4,7) como eletrólito suporte. O sistema BIA-MPA proposto apresentou alta frequência analítica (120 injeções h⁻¹), elevada precisão (DPRs < 1,0%, n = 20) e baixos valores de LD e LQ, (0,31 e 1,03 µmol L⁻¹ para CTF; 0,49 e 1,63 µmol L⁻¹ para CAF e 0,76 e 4,09 µmol L⁻¹ para DIF, respectivamente). O método proposto foi aplicado na determinação de CTF, CAF e DIF em uma amostra farmacêutica manipulada e os resultados obtidos foram similares ao obtidos por HPLC, a um nível de confiança de 95%.

Palavras-Chave: Amperometria de múltiplos pulsos (MPA), Análise por Injeção em Batelada (BIA), análise simultânea, diamante dopado com boro (BDD), dimenidrinato, piridoxina, cafeína.

ABSTRACT

In this work, the potentiality of batch injection analysis with multiple pulse amperometric (BIA-MPA) detection using boron doped diamond (BDD) electrode was investigated for simultaneous determination of 8-chlorotheophylline (CTF) and diphenhydramine (DIP), and these simultaneously with pyridoxine (RIP) or caffeine (CAF) in pharmaceutical formulations.

The simultaneous determination of (CTF) and (DIF) was performed with the application of three sequential pulses in function of time to the BDD electrode using NaAc/HAc 0.05 mol L⁻¹ (pH = 4.7) as supporting electrolyte. At 1.35 V/50 ms, CTF was detected (oxidation) without interference of DIF. At 1.80 V/50 ms, both compounds (CTF + DIF) were oxidized. The current of DIF can then be obtained by subtraction of the currents detected during application of both potential pulses using a correction factor. The potential pulse of 0.7 V/200 ms was applied to avoid contamination/passivation of the BDD electrode surface. The proposed method presented stability (RSD = 2.4 e 2.5% for CTF e DIF, respectively; n=20), high analytical frequency (70 injections h⁻¹), linear concentration range between and LOD and DOQ of 2.2 and 7.3 µmol L⁻¹ for CTF and 0.5 e 1.7 µmol L⁻¹ for DIF, respectively. The proposed method was used for simultaneous determination of CTF and DIF in pharmaceutical formulations and the obtained results were similar to those obtained by HPLC (confidence interval = 95%).

The same system (BIA-MPA) has also been adapted for simultaneous determination of PIR, CTF e DIF. In this method, the following potential pulses were applied sequentially to the BDD working electrode using H₂SO₄ 0.1 mol L⁻¹ as supporting electrolyte: (a) + 1.25 V/50 ms: oxidation of CTF without interference of the other compounds; b) + 1.60 V/50 ms: oxidation of CTF e PIR without interference of DIF; c) + 1.80 V/50 ms: oxidation of CTF, PIR and, DIF; d) + 1.0 V (150 ms): applied to avoid contamination/passivation of the BDD electrode surface. Simple mathematical expressions and correction factors were used to access the oxidation current of each analyte. The proposed method presented the following results: stability (RSD= 0.9, 1.5 e 1.5% for CTF, PIR and DIF, respectively; n=20), high analytical frequency (~60 injections h⁻¹), linear concentration range between and 20.0 and 60.0 µmol L⁻¹ for CTF and DIF and between 10.0 and 30.0 µmol L⁻¹ for PIR and the LD and LQ of 0.19 and 0.62 µmol L⁻¹ for CTF, 0.54 and 1.81 µmol L⁻¹ for PIR and 0.18 e 0.60 µmol L⁻¹ for DIF. The proposed method was applied for simultaneous determination of CTF, PIR and DIF in pharmaceutical samples and the obtained results were similar to those obtained by HPLC (confidence interval = 95%).

A third method (similar to the second) was proposed for simultaneous determination of CAF, CTF e DIF. The applied potential pulses were + 1.10 V (CTF oxidation), +1.40 V (oxidation of CTF and CAF) and, + 1.70 V (oxidation of CTF, CAF and, DIF) using NaAc/HAc 0.05 mol L⁻¹(pH = 4.7) as supporting electrolyte. The proposed BIA-MPA system presented high analytical frequency (120 injections h⁻¹), precision (RSDs < 1.0%, n = 20) and low LD and LQ values (0.31 e 1.03 µmol L⁻¹ for CTF, 0.49 and 1.63 µmol L⁻¹ for CAF and 0.76 and 4.09 µmol L⁻¹ for DIF, respectively. The proposed method was applied for determination of CTF, CAF and, DIF in pharmaceutical sample and the obtained results were similar to those obtained by HPLC (confidence interval = 95%).

Keywords: Multiple pulse amperometry (MPA), Batch Injection Analysis (BIA), Simultaneous analysis, Boron doped diamond (BDD), dimenhydrinate, pyridoxine, caffeine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da CTF (A) e DIF (B).....	20
Figura 2. Fórmula estrutural da PIR ou Vitamina B6.....	21
Figura 3. Fórmula estrutural da CAF.....	22
Figura 4. Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica, adaptada para o uso com eletrodo de diamante dopado com boro.	23
Figura 5. Etapas de operação de um sistema BIA e resultado obtido	24
Figura 6. Esquema de arranjo de três eletrodos	27
Figura 7. (A) Perfil de varredura de potencial usado em VC. (B) Voltamograma cíclico obtido.	29
Figura 8. (A) Degrau de potencial aplicado; (B) resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial.....	30
Figura 9. Esquema de aplicação de 9 pulsos de potenciais e respectivos amperogramas obtidos (Fonte: software GPES 4.9 – empresa Metrohm Autolab).	32
Figura 10. Célula de polipropileno utilizada nos experimentos estacionários com eletrodo de BDD.	44
Figura 11. (A) Esquema da célula BIA utilizada no trabalho; (B) Imagem da célula BIA; ...	45
Figura 12. (A) Sistema de agitação para célula BIA; (B) Pipeta motorizada utilizada para as injeções no sistema BIA.	46
Figura 13. Separação entre os potenciais de oxidação estimados para CTF e DIF em eletrólitos de diferentes pHs..	50
Figura 14. Estrutura das moléculas de CTF e DIF e voltamogramas cíclicos.	51
Figura 15. Estrutura da molécula de TEO e voltamogramas cíclicos.....	52

Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura na oxidação de CTF sobre BDD.	52
Figura 17. Dependência das correntes de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura	53
Figura 18. Esquema representando as etapas de oxidação eletroquímica de uma xantina.	54
Figura 19. Estudo do efeito do pH sobre o potencial de oxidação da CTF por voltametria cíclica.	55
Figura 20. (A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de CTF (a) ou DIF (b). (B) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para o CTF e DIF	57
Figura 21. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo. (B) Amperogramas obtidos para injeções de soluções contendo CTF, DIF ou DIM (CTF + DIF).	58
Figura 22. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA sem agitação (a), e com aumento da velocidade de agitação usando um micro motor DC.	60
Figura 23. Variação da corrente de oxidação da CTF e do FC em função de: (A) volume injetado; (B) velocidade de injeção.	61
Figura 24. FC ($i_{CTF +1,80V} / i_{CTF +1,35V}$) calculados para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de CTF.	63
Figura 25. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de solução contendo CTF e DIF.	64
Figura 26. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo 10 + 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) e 30 + 30 mol L^{-1} (b) de CTF e DIF, respectivamente (n = 20).	65
Figura 27. Amperogramas obtidos para injeções de uma solução contendo somente CTF, cinco soluções (a-e; e'-a') contendo simultaneamente CTF e DIF e duas amostras adequadamente diluídas (1 e 2).	66
Figura 28. Curvas de calibração obtidas para CTF e DIF.	67

Figura 29. Separação entre os potenciais de oxidação estimados para CTF, PIR e DIF em eletrólitos de diferentes pHs.	73
Figura 30. Voltamogramas cíclicos obtidos para CTF, PIR e DIF.....	74
Figura 31. Esquema da reação de oxidação eletroquímica da PIR	75
Figura 32. (A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas para CTF (a), PIR (b) e DIF (c). (B) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para CTF, PIR e DIF.	75
Figura 33. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD posicionado no sistema BIA-MPA. (B) Amperogramas obtidos para injeções de soluções contendo DIF, PIR e CTF e solução contendo a mistura de DIF, PIR e CTF.....	76
Figura 34. (A) Curvas de calibração obtidas para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de CTF (B) Curvas de calibração obtidas para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de PIR.	79
Figura 35. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo CTF, DIF e PIR..	81
Figura 36. Amperogramas obtidos para injeções de uma solução contendo somente CTF (a), somente PIR (15 $\mu\text{mol L}^{-1}$), cinco soluções (b-g) contendo simultaneamente CTF, DIF e PIR e duas amostras adequadamente diluídas (1 e 2).....	82
Figura 37. Curvas de calibração obtidas para CTF, PIR e DIF	83
Figura 38. Voltamogramas cíclicos obtidos para CTF, CAF e DIF.	85
Figura 39. Esquema da reação global de oxidação eletroquímica da CAF.....	86
Figura 40. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para CTF, CAF e DIF.	87
Figura 41. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD posicionado no sistema BIA-MPA. (B) Amperogramas obtidos para injeções de soluções contendo: CTF, CAF; DIF e mistura dos três compostos (DIF + CAF + CTF).....	88

Figura 42. Amperogramas obtidos para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de CTF e de CAF..	90
Figura 43. Curvas de calibração para injeções de concentrações crescentes de CTF e, respectivos valores calculados para FC_1 e FC_2 (B) Curvas de calibração para injeções de concentrações crescentes de CAF e respectivo valor calculado para FC_3 .	90
Figura 44. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo 1 CTF, DIF e CAF	92
Figura 45. Amperogramas obtidos para injeções de solução contendo somente CTF (a), somente CAF, cinco soluções (c-g) contendo simultaneamente CTF, DIF e CAF e duas amostras adequadamente diluídas (1 e 2).	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de reagentes usados no presente estudo e respectivas procedências.....	47
Tabela 2. Características analíticas do método proposto.	68
Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos para a determinação de CTF e DIF em amostras farmacêuticas usando a metodologia proposta versus HPLC.....	68
Tabela 4. Razão ($i_{+1,80V}/i_{+1,35V}$) calculada a partir das correntes detectadas nos dois pulsos de potencial para determinação estequiométrica do sal de DIM.....	70
Tabela 5. Razão ($i_{+1,80V}/i_{+1,35V}$) calculada com correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais a partir das injeções contendo DIM sem e com a presença de outros compostos eletroquimicamente ativos.....	71
Tabela 6. Características analíticas do método proposto.	83
Tabela 7. Comparação dos resultados obtidos para a determinação de CTF, PIR e DIF em amostras farmacêuticas usando a método proposto <i>versus</i> HPLC.	84
Tabela 8. Características analíticas do método proposto.	94
Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de CTF, CAF e DIF em amostras farmacêuticas usando o método proposto <i>versus</i> HPLC.	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ø	Diâmetro
ΔE	Diferença de potencial
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BIA	Análise por injeção em batelada, do inglês “ <i>Batch Injection Analysis</i> ”
BDD	Diamante dopado com boro, do inglês “ <i>Boron-Doped Diamond</i> ”
CAF	Cafeína
CE	Contra eletrodo ou eletroforese capilar, do inglês “ <i>capillary electrophoresis</i> ”
CTF	8-cloroteofilina
CV	Voltametria cíclica, do inglês “ <i>Cyclic Voltammetry</i> ”
DC	Corrente contínua, do inglês “ <i>Direct current</i> ”
DIF	Difenidramina
DIM	Dimenidrinato
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DPV	Voltametria de pulso diferencial, do inglês “ <i>Differential pulse voltammetry</i> ”
EA	Eletrodo auxiliar
E _i	Potencial inicial
E _f	Potencial final
ER	Eletrodo de referencia
ET	Eletrodo de trabalho
FC	Fator de correção
FIA	Análise por injeção em fluxo, do inglês “ <i>Flow Injection Analysis</i> ”
GC	Cromatografia gasosa, do inglês “ <i>Gas chromatography</i> ” ou carbono vítreo, do inglês “ <i>Glassy carbon</i> ”
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês “ <i>High performance liquid chromatography</i> ”
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MPA	Amperometria de múltiplo pulso, do inglês “ <i>Multiple pulse Amperometry</i> ”
NaAc/HAc	Acetato de sódio/Ácido acético
PAD	Amperometria pulsada, do inglês “ <i>Pulsed Amperometric Detection</i> ”
PLS	Mínimos quadrados parciais, do inglês “ <i>Partial Least Squares</i> ”

PCR	Regressão em componentes principais, do inglês “ <i>Principal Component Regression</i> ”
PIR	Piridoxina
Sat.	Saturado
SWV	Voltametria de onda quadrada, do inglês “ <i>Square wave voltammetry</i> ”
TEO	Teofilina
UV/VIS	Ultravioleta/Visível

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	18
1.2.	ESPÉCIES QUÍMICAS ESTUDADAS	20
1.2.1.	8-Cloroteofilina (CTF) + Difenidramina (DIF)	20
1.2.2.	Piridoxina (PIR)	21
1.2.3.	Cafeína (CAF)	22
1.3.	ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA)	23
1.4.	TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS	26
1.4.1.	Voltametria Cíclica	28
1.4.2.	Amperometria	29
1.5.	DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA	34
1.6.	PARÂMETROS ANALÍTICOS UTILIZADOS NOS MÉTODOS PROPOSTOS.	35
1.6.1.	Sensibilidade	35
1.6.2.	Especificidade e Seletividade	36
1.6.3.	Linearidade	36
1.6.4.	Limite de Detecção	37
1.6.5.	Limite de Quantificação	38
1.6.6.	Repetibilidade	39
1.6.7.	Recuperação	39
2.	OBJETIVOS	41
3.	PARTE EXPERIMENTAL	42
3.1.	INSTRUMENTAÇÃO	42
3.1.1.	Detecção eletroquímica	42
3.1.2.	Eletrodos de trabalho	42
3.1.3.	Eletrodo de Referência	43
3.1.4.	Eletrodo Auxiliar	43
3.1.5.	Célula Eletroquímica para medidas estacionárias	43
3.1.6.	Sistema BIA	44
3.1.7.	Análises comparativas por cromatografia líquida	46
3.2.	SOLUÇÕES, REAGENTES E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.	47
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1.	ESTUDOS PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA E QUANTIFICAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA DE 8-CLOROTEOFILINA E DIFENIDRAMINA	49
4.1.1.	Comportamento eletroquímico de CTF e DIF em diferentes eletrodos e eletrólitos	49
4.1.2.	Estudos para a determinação simultânea de CTF e DIF por BIA-MPA	56

4.1.2.1. Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de CTF e DIF por BIA-MPA	57
4.1.2.2. Otimização de parâmetros hidrodinâmicos para o sistema BIA	59
4.1.2.2.1. Agitação	59
4.1.2.2.2. Volume e velocidade de injeção	60
4.1.2.3. Influência da concentração da CTF no FC	62
4.1.2.4. Estudo de repetibilidade do método	63
4.1.3. Aplicação do sistema BIA-MPA na análise simultânea de CTF e DIF em formulações farmacêuticas	66
4.1.4. Determinação rápida da estequiometria do sal de dimenidrinato	69
4.2. APLICAÇÃO DO SISTEMA BIA-MPA PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TRÊS PRINCÍPIOS ATIVOS	72
4.2.1. Estudos para determinação simultânea de CTF, PIR e DIF	72
4.2.1.1. Comportamento eletroquímico de CTF, PIR e DIF	72
4.2.1.2. Influência da concentração da CTF e PIR nos FCs	78
4.2.1.3. Estudo de repetibilidade do método	80
4.2.1.4. Análise simultânea de CTF, PIR e DIF em formulações farmacêuticas	81
4.2.2. Estudos para determinação simultânea de CTF, CAF e DIF	84
4.2.2.1. Comportamento eletroquímico de CTF, CAF e DIF	84
4.2.2.2. Influência da concentração da CTF, CAF nos FCs	89
4.2.2.3. Estudo de repetibilidade	91
4.2.2.4. Análise simultânea de CTF, CAF e DIF em formulações farmacêuticas comerciais	92
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

Análises químicas são fundamentais em diversos setores industriais e áreas do conhecimento. Para isto, muitas vezes são usados os métodos instrumentais, que são basicamente baseados em três grandes grupos de técnicas: a espectroscopia, a cromatografia e a eletroquímica. No entanto, alguns equipamentos e reagentes utilizados nestas técnicas (principalmente na cromatografia) podem ser dispendiosos, tornando análises de rotina inviáveis em muitos laboratórios de empresas de pequeno porte.

A presença de dois ou mais princípios ativos na mesma formulação inviabiliza o uso de diversos procedimentos de análise disponíveis na literatura ou em Farmacopeias. Quando dois ou mais princípios ativos estão presentes em uma formulação farmacêutica, é indicado que a quantificação (controle de qualidade) deve ser realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção no ultravioleta (método padrão). Porém, características como alto custo de aquisição e de manutenção, assim como a geração de um volume considerável de resíduos por análise dificultam o uso da técnica de HPLC em larga escala ou mesmo em microempresas com disponibilidade financeira limitada. Um exemplo disto são as farmácias de manipulação, as quais comercializam diversas formulações sem controle de qualidade.

Atualmente, a legislação brasileira (ANVISA) não prevê ou não exige que este controle de qualidade seja realizado. No entanto, caso a legislação brasileira passasse a exigir este tipo de controle de qualidade, microempresas como as farmácias de manipulação, por exemplo, passariam a ter dificuldades na produção de medicamentos com a presença de mais de um princípio ativo, pois atualmente não possuem as condições necessárias para realização do controle de qualidade deste tipo de formulação. Dentro deste contexto, estudos para o desenvolvimento de metodologias que possibilitem análises simultâneas a um custo menor com a manutenção da qualidade dos resultados é de alta relevância. Empresas com menor poder aquisitivo poderiam implantar estas metodologias de controle de qualidade, pois os custos de aquisição e de manutenção seriam consideravelmente inferiores. Algumas características devem estar presentes em metodologias analíticas para que sejam aplicáveis em laboratório com infraestrutura limitada, como: fácil automação, rapidez nas análises, mantendo adequada sensibilidade, seletividade, robustez, precisão e baixo custo. Neste sentido, o sistema de análise

por injeção em batelada (BIA – “Batch Injection Analysis”) [1] tem sido explorado por apresentar vários destes requisitos.

Dentre os diversos tipos de detectores possíveis de serem usados em sistemas BIA, podemos destacar os eletroquímicos devido ao baixo custo operacional, simplicidade no uso e possibilidade de minimização nas etapas de pré-tratamento das amostras [2]. Entre as técnicas eletroquímicas mais utilizadas em sistemas de fluxo, destaca-se a amperometria, a qual pode ser dividida em: amperometria a potencial constante, amperometria pulsada (PAD, do inglês “Pulsed Amperometric Detection”) e a amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês “Multiple Pulse Amperometry”). As PAD e MPA permitem a aplicação de um ou mais pulsos de potenciais adicionais que podem ser responsáveis pela constante limpeza e/ou condicionamento da superfície do eletrodo de trabalho empregado [2]. Além disso, a MPA permite a aplicação de até 10 pulsos de potenciais com o monitoramento da corrente em função do tempo em todos os pulsos de potenciais (aquisição de até 10 amperogramas distintos e simultâneos). A aplicação de vários pulsos de potenciais e aquisição simultânea de vários amperogramas permite a determinação simultânea de compostos presentes na mesma amostra, o que traz ao método grande economia e rapidez.

1.2. Espécies químicas estudadas

1.2.1. 8-Cloroteofilina (CTF) + Difenidramina (DIF)

Os princípios ativos, 8-cloroteofilina (CTF) ou 8-cloro-1,3-dimetil-2,3,6,7-tetraidro-1H-purina-2,6-diona e difenidramina (DIF) ou [2-(difenilmetoxi)etil]dimetilamina, (Fig. 1) combinados em razão equimolar (1:1), constituem o medicamento chamado dimenidrinato (DIM) [3]. DIM pode ser vendido sem prescrição médica e é utilizado principalmente em combate a náuseas e vômitos [4].

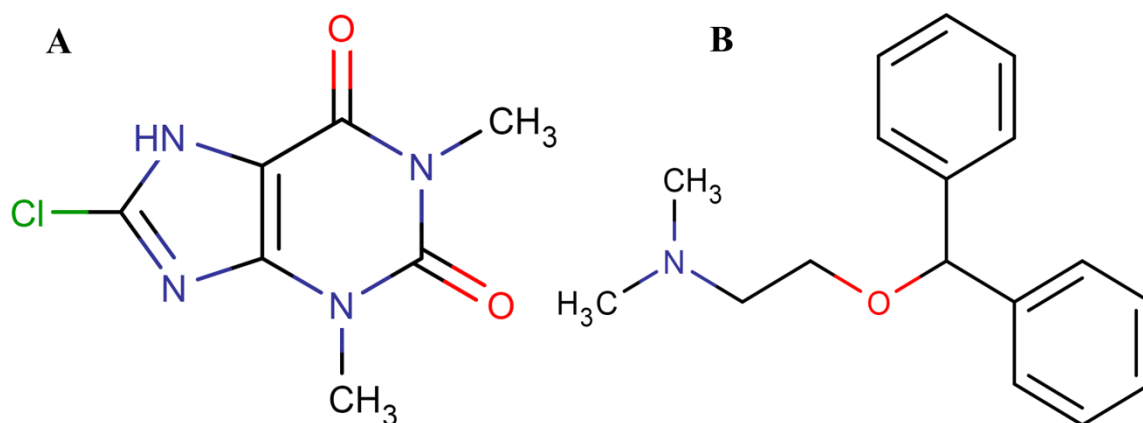


Figura 1. Fórmula estrutural da CTF (A) e DIF (B).

A patente em termos de síntese do DIM foi apresentada em 1950 nos Estados Unidos [5]. De acordo com o documento, DIM é produzido por uma mistura em proporção equimolar de CTF e DIF em etanol quente. O DIM é eficaz na prevenção e no tratamento de náuseas, vômitos e tontura associados à cinetose [6, 4] e como medicação sintomática nas náuseas e vômitos relacionados com a gravidez [8]. Seus efeitos centrais permitem que o medicamento seja usado eficazmente no tratamento da doença de Ménière e em outros tipos de vertigem. O DIM tem sido usado com sucesso nos distúrbios pós-tratamentos radioterápicos intensivos, pós-cirurgias do labirinto e nos estados vertiginosos de origem central [9].

A capacidade de reduzir sintomas de náusea é dada principalmente pela presença da DIF, entretanto, a presença de CTF, que é um estimulante do sistema nervoso central, diminui a sonolência causada pela DIF [10]. Estudos também mostram a existência de um efeito sinérgico entre DIF e CTF [11] e, assim o DIM apresenta propriedades que não estão presentes quando DIF ou CTF são usados individualmente.

Após pesquisa na literatura, para determinação simultânea de CTF e DIF, foi verificado que somente cromatografia líquida, em sua maioria com fase reversa (C8 e C18) e acetonitrila, tampão fosfato e trietilamina (adicionada como base competitiva) como solvente, com detecção UV, [12, 13] foi explorada para este fim até agora. Existem alguns trabalhos em HPLC que tratam de somente um pico para DIM [14, 15], que é referente somente à CTF, não levando em consideração o pico referente à DIF. Picos muito largos e com grande tempo de retenção são característicos da DIF em HPLC, o que faz com que esses picos sejam muitas vezes negligenciados [13]. Além disso, métodos cromatográficos possuem algumas limitações, como elevados custos e tempos de análise, necessidade de uso de solventes orgânicos (geração de resíduo mais tóxico) e maior necessidade de manipulação da amostra.

1.2.2. Piridoxina (PIR)

A piridoxina (PIR) ou vitamina B6 ou 4,5-bis(hidroximetil)-2-metilpiridin-3-ol (Fig. 2) é parte do grupo das vitaminas B e é importante, tanto para a saúde mental quanto física. PIR é uma vitamina essencial para a formação das células vermelhas do sangue e auxilia as principais funções vitais. Por exemplo, é necessária no metabolismo de proteínas, assim como para o bom funcionamento dos sistemas nervoso e imunológico [16].

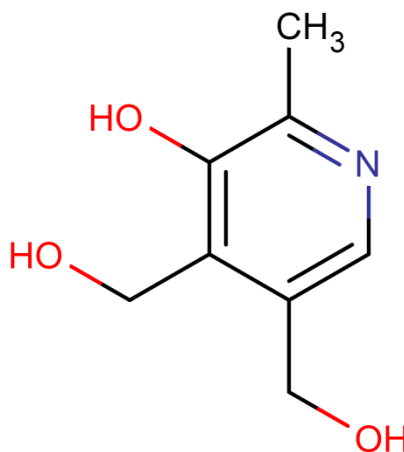


Figura 2. Fórmula estrutural da PIR ou Vitamina B6.

Estudos demonstraram que a piridoxina é eficaz no controle de náusea e vômitos em mulheres grávidas [10]. Quando DIM (CTF + DIF) é utilizado no controle de náusea e vômitos no início da gravidez, melhores resultados foram observados quando um terceiro princípio ativo

(PIR) foi adicionado à formulação farmacêutica [3]. É provável que haja efeitos sinérgicos em medicamentos em que os três princípios ativos (CTF, DIF e PIR) estejam presentes. Na literatura não são encontradas metodologias para a determinação simultânea de CTF, DIF e PIR.

1.2.3. Cafeína (CAF)

A cafeína (CAF) ou 1,3,7-trimetil-2,3,6,7-tetrahidro-1H-purina-2,6-diona ou 1-3-7-trimetilxantina (Fig. 3) é um alcalóide natural pertencente aos derivados N-metil da xantina. É encontrada em diferentes tipos de alimentos e bebidas, como café, refrigerantes, chá, grãos de cacau e chocolate [17], assim como em medicamentos, onde é mais comumente usada como substância psicoativa.

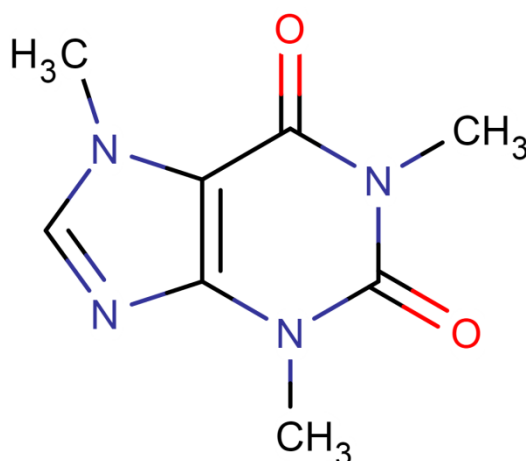


Figura 3. Fórmula estrutural da CAF.

CAF é um estimulante do sistema nervoso central e pode ser adicionada à CTF e DIF (DIM) em formulações farmacêuticas [12], possivelmente com a função de diminuir os efeitos sedativos da DIF, juntamente com a CTF. Para a determinação simultânea de CTF, DIF e CAF, somente um método foi encontrado na literatura onde a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) é usada empregando acetonitrila, tampão fostato e trietilamina como fase móvel e a detecção UV [12].

1.3. Análise por injeção em batelada (BIA)

Análise por injeção em batelada (BIA, do inglês “*batch injection analysis*”) é uma técnica analítica recente, apresentada na literatura no início da década de 90, por Wang e Taha [1]. O procedimento BIA representa uma metodologia alternativa em relação aos métodos baseados em Análise por Injeção em Fluxo (FIA, do inglês “*flow injection analysis*”) [18] na realização de análises rápidas. Nesta técnica, volumes pequenos da solução amostra ou padrão são injetados, com o auxílio de uma micropipeta (normalmente eletrônica), diretamente sobre um detector imerso em um grande volume de solução inerte.

A Figura 4 apresenta o esquema de uma célula BIA, adaptada para o uso com eletrodo de diamante dopado com boro (utilizada no presente trabalho). O sistema pode ser operado com ou sem agitação da solução no interior da célula [19]. A posição do eletrodo de trabalho é oposta à ponteira do sistema de injeção. A injeção da solução em análise (geralmente de 100 a 150 μL) é feita em configuração “wall-jet”, diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho (detecção eletroquímica).

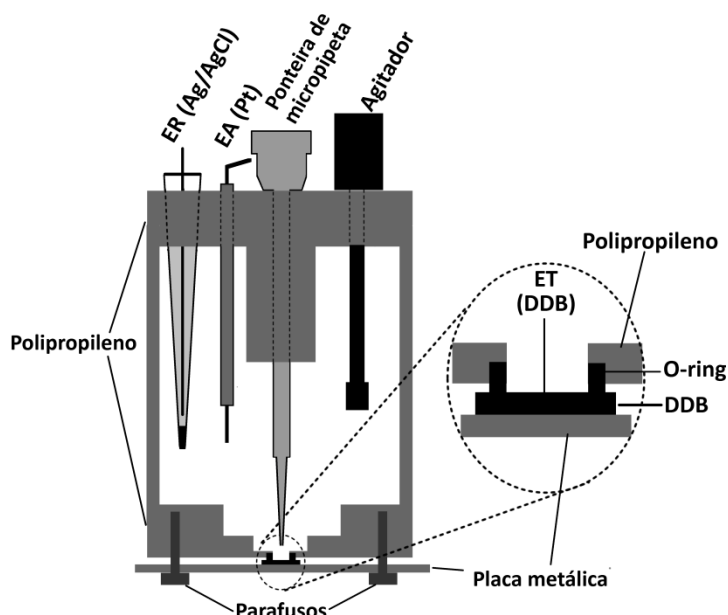


Figura 4. Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica, adaptada para o uso com eletrodo de diamante dopado com boro.

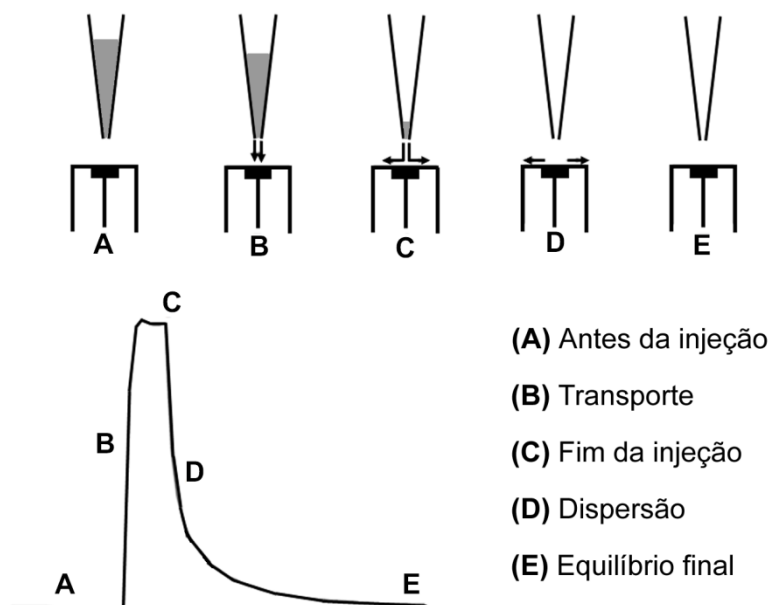


Figura 5. Etapas de operação de um sistema BIA e resultado obtido [20].

A passagem do analito sobre a superfície do sensor resulta em sinais transientes (picos), similar ao observado em sistemas FIA. Antes da injeção observa-se uma corrente constante, que se atribui a corrente gerada a partir do eletrólito inerte, indicando que não existe reação de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução (Fig. 5A). Quando a solução padrão ou amostra é injetada, há um rápido aumento da corrente (Fig. 5B), devido ao processo redox relacionado ao analito de interesse transportado até a superfície do eletrodo de trabalho por convecção. Após o fim do procedimento de injeção, a corrente atinge um valor máximo permanecendo constante durante um pequeno intervalo de tempo (Fig. 5C). Após este patamar constante há uma queda acentuada do sinal analítico referente à mudança do transporte convectivo para o transporte difusional (Fig. 5D), atingindo, portanto, o equilíbrio existente antes da injeção (Fig. 5E). Este fenômeno pode ser acelerado através de uso de agitação mecânica da solução presente no interior da célula [21]. Esse procedimento possui diversas características análogas às aquelas apresentadas por sistemas FIA, como: rapidez, simplicidade, boa repetibilidade e sensibilidade e possibilidade de trabalhar com baixos volumes de amostras e reagentes. Além disso, como em sistemas FIA, o fenômeno da passivação ou contaminação da superfície do eletrodo de trabalho também é menor em relação aos sistemas estacionários devido ao menor tempo de contato entre o analito e o eletrodo de trabalho durante a análise [20]. Apesar disso, os sistemas BIA têm sido pouco explorados até hoje, se comparados aos sistemas FIA [22].

Além das características atraentes, os sistemas BIA também apresentam algumas limitações quando comparados aos sistemas FIA. Devido à pequena distância existente entre a ponteira da micropipeta e o eletrodo de trabalho (percurso analítico reduzido), os sistemas BIA apresentam limitações em procedimentos de derivatização e pré-tratamentos ou diluições on-line de amostras. Além disto, as possibilidades de automação são limitadas [1, 23].

Dentre as vantagens adicionais em relação a FIA, o sistema BIA destaca-se pela menor lixiviação do material usado em eletrodos modificados (ausência de soluções carregadoras em tempo integral) [22], melhor sensibilidade (menor efeito de dispersão ou diluição da amostra) [24, 25], possibilidade de injeção da amostra sem prévia diluição no eletrólito suporte, devido à força iônica se manter praticamente inalterada, pois um pequeno volume de amostra é injetado em um volume muito grande de eletrólito [25], menor geração de resíduos; descarta a necessidade do uso de válvulas, bombas e tubos de conexão eliminando problemas relacionados a vazamento e presença de bolhas de ar [24]. A maior simplicidade e robustez na aparelhagem e maior facilidade de desenvolvimento de métodos analíticos portáteis [26], permite a criação de procedimentos analíticos portáteis, que podem ser utilizados em análises em campo ou “*in-situ*” [27].

As potencialidades, bem como os conceitos e princípios do procedimento têm sido explorados e ilustrados, considerando a associação de BIA com diferentes técnicas de detecção (calorimetria, fluorescência, amperometria, potenciometria e voltametria) [28-34]. Alguns parâmetros que influenciam a resposta do sistema foram discutidos e descritos na literatura [2,35,36].

Apesar destas características, um pequeno número de estudos sobre o assunto foi relatado na literatura até hoje [22], provavelmente, devido à necessidade do uso de pipetas eletrônicas para obtenção de reprodutibilidade no processo de injeção. Estas pipetas geralmente não estão disponíveis nos laboratórios comuns de pesquisa e no uso de pipetas manuais, a repetibilidade do sistema é diretamente dependente da habilidade do operador [37]. Recentemente, porém, estudos mostraram que através do uso de um padrão interno, a utilização de pipetas manuais na injeção no sistema BIA é possível [38]. Além disto, problemas relacionados com os fenômenos de adsorção irreversíveis (contaminação) quando eletrodos sólidos são usados também podem ser contornados mediante uso de padrão interno [23].

O problema de contaminação/adsorção do analito ou demais componentes da amostra no eletrodo de trabalho também pode ser evitado em sistemas em fluxo pela aplicação repetitiva e alternada de pulsos de potenciais de limpeza (detecção amperométrica pulsada) [39-44]. No entanto, até hoje, a amperometria pulsada foi pouco utilizada como modo de detecção em sistemas BIA [19, 45], provavelmente porque a maioria dos estudos empregando BIA com detecção amperométrica foram realizados com a solução no interior da célula no estado estacionário, sendo que a limpeza eletroquímica é mais eficaz com o meio (solução) sob convecção forçada.

Recentemente, o acoplamento de sistemas BIA com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (BIA-MPA) vem sendo realizado com sucesso. Nos primeiros trabalhos foi demonstrada a possibilidade da determinação direta do antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) em biodiesel [46] e etanol em álcool combustível [19]. Posteriormente também foi demonstrado que a associação da amperometria de múltiplos pulsos também pode ser explorada para efetuar determinações simultâneas em sistemas BIA usando somente um eletrodo de trabalho [36]. A detecção e quantificação seletiva de cada composto ocorre com a aplicação de pelo menos dois pulsos de potenciais. Neste estudo, uma espécie foi oxidada e seletivamente quantificada em um pulso de potencial (E_1 ; menor energia) e em um segundo pulso de potencial (E_2 ; maior energia), ambas as espécies de interesse foram oxidadas. A quantificação da segunda espécie foi possível mediante subtração das correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais ($i_{E2} - i_{E1}$). Esta aplicação foi possível mediante o uso de um fator de correção (FC). A técnica permite ainda a aplicação de um terceiro pulso de potencial para evitar a contaminação ou promover a constante limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho empregado.

1.4. Técnicas Voltamétricas

Técnicas voltamétricas são amplamente utilizadas em diversas áreas da química, tais como, inorgânica, bioquímica e físico-química para propósitos analíticos, e ainda estudos de processos de oxidação e redução, processos de adsorção e mecanismos de transferência de elétrons em superfícies eletródicas.

As técnicas voltamétricas abrangem um conjunto de técnicas eletroquímicas onde o controle do potencial é feito entre um eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho. Um sinal

de excitação variável (potencial) é aplicado ao eletrodo de trabalho (ET) em relação ao eletrodo de referência (ER), presente em uma célula eletroquímica, geralmente de três eletrodos (Fig. 6). Este sinal de excitação produz uma resposta característica na forma de corrente (a qual é o sinal de interesse), que flui entre os eletrodos de trabalho e contra eletrodo (CE) [47].

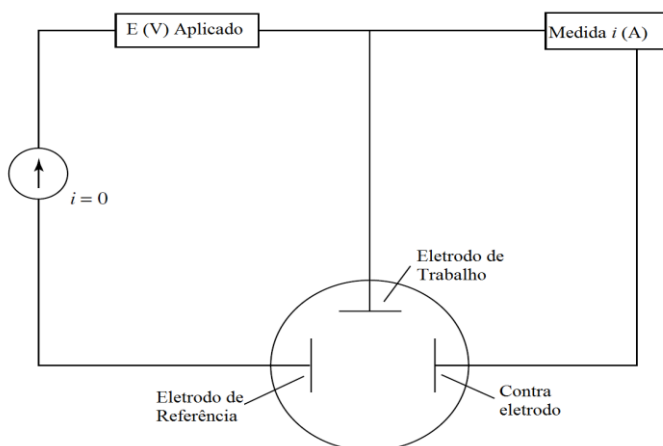


Figura 6. Esquema de arranjo de três eletrodos (adaptado de [48])

As formas dos sinais de excitação (potencial aplicado entre o ET e o ER), é feita em forma de varredura, variando-se o potencial em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente em forma de curva de corrente *vs* potencial, denominada voltamograma. As diferentes formas de variação do potencial em função do tempo definem as diferentes técnicas voltamétricas, entre as quais podemos destacar as lineares (voltametria linear e cíclica) e as de pulsos (pulso normal, diferencial e de onda quadrada) [47].

Estas técnicas baseiam-se nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do ET e a camada fina da solução adjacente a essa superfície, denominada camada de Nernst. Esta camada surge de um gradiente de concentração próximo à superfície do eletrodo devido ao consumo ou origem de espécies eletroativas nesta área. Portanto, após o início do experimento, a concentração nesta camada difere da concentração existente no seio da solução. Para que a relação entre o sinal eletroquímico medido e a concentração da espécie analítica de interesse seja linear é indispensável que a velocidade do transporte de massa nesta camada seja constante. Para isso, um eletrólito inerte cuja concentração seja pelo menos 50 vezes superior ao das espécies analíticas de interesse é utilizado como eletrólito suporte. Este eletrólito deve estar presente em concentração semelhante nas amostras e nas soluções padrão ou amostra para que força iônica seja mantida constante, minimizando variações na região da dupla camada elétrica

e garantindo que o sinal transiente registrado possa ser atribuído ao processo faradaico preferencialmente controlado por difusão e minimizando o efeito de migração [47, 49].

O transporte de massa ocorre por três diferentes mecanismos [49]:

- Difusão: movimento espontâneo sob a influência de um gradiente de concentração, de regiões de altas concentrações para regiões de baixas concentrações de forma a minimizar essa diferença.
- Convecção: transporte para a superfície do eletrodo por movimento físico, associada com agitação ou fluxo da solução, ou rotação ou vibração do eletrodo (convecção forçada). A convecção também pode ocorrer como resultado de gradientes de densidade.
- Migração: movimento de partículas carregadas através do campo elétrico (onde a carga é transportada pela solução por íons de acordo com sua carga).

Dois tipos de processos podem gerar corrente na interface eletrodo/solução, a corrente faradaica (i_F) e a corrente não faradaica ou capacitiva (i_C) [50]. A corrente faradaica tem origem na transferência de elétrons entre o ET e as espécies eletroativas da solução obedecendo à lei de Faraday, a qual determina que a corrente é proporcional quantidade de reagentes formados ou consumidos junto do eletrodo. A corrente capacitiva é gerada pela dupla camada elétrica formada na interface eletrodo/solução devido a uma variação de potencial (cada eletrodo se comporta como uma placa de um capacitor) ou até mesmo a potencial constante, caso a capacitância do eletrodo estiver mudando por alguma razão (cinética ou termodinâmica). A corrente capacitiva não depende de nenhuma reação química [49].

1.4.1. Voltametria Cíclica

Devido a facilidade de utilização e versatilidade, a voltametria cíclica é utilizada em diversas áreas de aplicação. Frequentemente, a voltametria cíclica é o primeiro experimento a ser realizado quando se deseja estudar o comportamento eletroquímico de um composto ou a superfície de um eletrodo [50], além de fornecer uma excelente ferramenta para investigação e elucidação de mecanismos de muitos sistemas químicos [51, 52]. São encontrados na literatura, artigos de revisões [53-55] e livros texto, [50-52, 56-58] dedicados a aspectos fundamentais e aplicações de voltametria cíclica.

Na técnica de voltametria cíclica, basicamente, o potencial é linearmente variado com o tempo, partindo de um valor inicial, até atingir um potencial final. Neste ponto, a varredura é invertida até atingir novamente o potencial de partida. O resultado é uma relação potencial aplicado *versus* corrente, denominado voltamograma cíclico (Fig. 7).

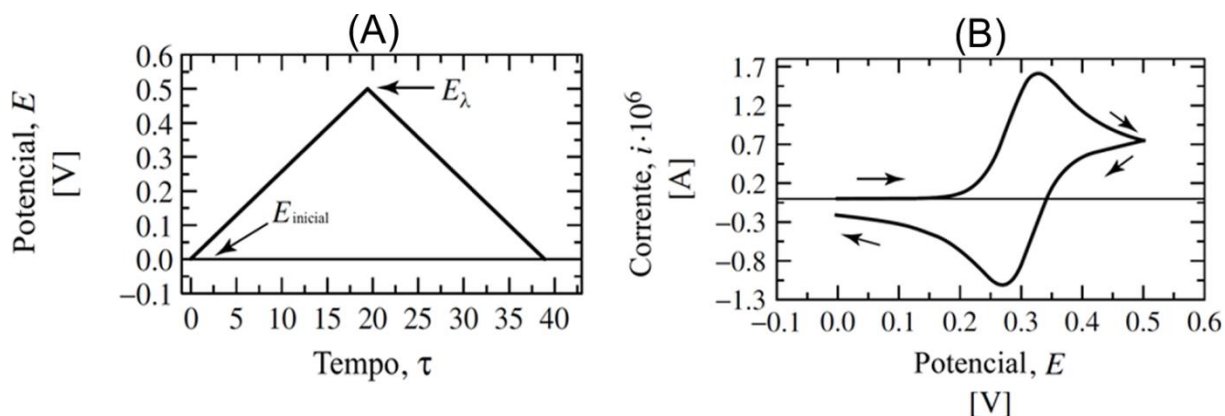


Figura 7. (A) Perfil de varredura de potencial usado em CV. (B) Voltamograma cíclico obtido (adaptado de [48]).

A análise dos voltamogramas cíclicos indica em que região de potencial ocorre determinada reação de oxidação e/ou redução de compostos eletroativos, além de indicar informações a respeito de mecanismos de reações, tais como, reversibilidade destes compostos, da quantidade de elétrons envolvidos, da possível formação de espécies intermediárias e se o sistema é controlado por processos difusionais ou adsortivos. Deve-se enfatizar, porém, que a técnica gera em muitas situações somente resultados qualitativos de diagnósticos das reações eletroquímicas. Medidas quantitativas mais precisas são comumente obtidas com o emprego de técnicas de pulso [59].

1.4.2. Amperometria

Um sensor voltamétrico registra vários pontos em uma região selecionada do perfil corrente-potencial. Um sensor amperométrico, por sua vez, mede uma corrente a um potencial aplicado fixo, isto é, para um determinado ponto na curva de corrente-potencial (voltamograma). Portanto, um sensor amperométrico é um sensor voltamétrico para um potencial fixo [60] sendo aplicado um único degrau de potencial (Figura 8A), produzindo-se uma corrente que decai rapidamente com o tempo (Figura 8B).

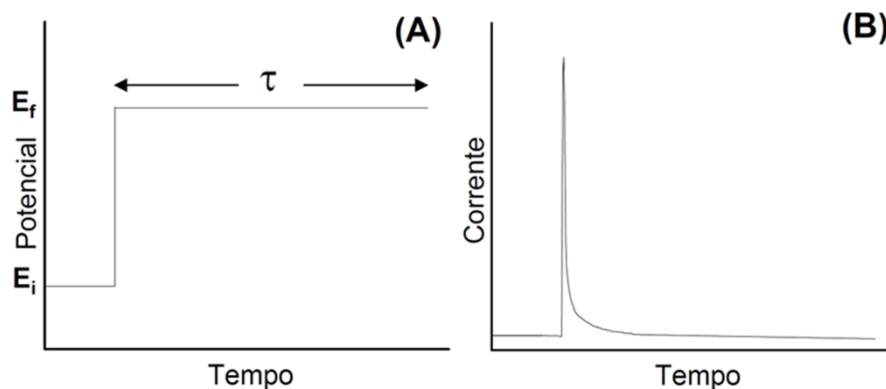


Figura 8. (A) Degrau de potencial aplicado; (B) resposta de corrente para um experimento de degraú único de potencial [22].

Quando um potencial é aplicado no eletrodo de trabalho e, uma reação de oxidação ou de redução de uma espécie analítica em solução ocorre, podemos chamar o monitoramento desse sinal de detecção amperométrica a potencial constante. Este tipo de detecção é amplamente utilizada, conforme relatado na literatura [61-67]. Porém, devido à adsorção de alguns subprodutos e/ou impurezas na superfície do eletrodo, pode haver contaminação ou passivação do eletrodo (variação na área do eletrodo), e consequentemente, falta de repetibilidade em análises sucessivas. Como por exemplo, na determinação eletroquímica de fenóis e de derivados fenólicos [68], onde ocorre a contaminação ou a passivação do eletrodo, comprometendo, assim, a taxa de transferência de carga entre o eletrodo e a espécie analítica de interesse. Além disto, subprodutos de reações que ocorrem no eletrodo podem gerar interferências nas análises. Para a obtenção de resultados reprodutíveis durante a análise, deve-se realizar a limpeza frequente da superfície do eletrodo, quer pelo polimento mecânico ou por um procedimento de limpeza eletroquímica [69].

Existem diversas estratégias para promover a limpeza da superfície do eletrodo de trabalho ou impedir sua contaminação ou passivação, tais como, adição de EDTA ao eletrólito suporte [68], o uso de eletrodos modificados [70, 71] ou regeneração da superfície do eletrodo realizada constantemente (“on line”) [72]. O sistema BIA ou FIA acoplado à detecção amperométrica, em muitos casos, minimiza o problema da contaminação da superfície do eletrodo, uma vez que pequenos volumes da amostra são injetados (alguns microlitros). Assim, a contaminação pode levar mais tempo para ocorrer. Além disto, a amostra não permanece em

contato com o eletrodo em tempo integral (sinais transientes), o que contribui para que o eletrodo permaneça limpo por um período de tempo maior [73].

Uma grande vantagem da amperometria a potencial constante é que, uma vez que o potencial do eletrodo é mantido constante, a corrente capacitiva torna-se constante, virtualmente igual a zero. Isso confere à técnica maior sensibilidade, em relação à voltametria baseada na varredura de potenciais. Normalmente, aconselha-se utilizar uma concentração relativamente alta de eletrólito inerte, que deverá ter concentração similar na solução carregadora (FIA) ou na solução contida no interior da célula BIA, e na solução amostra ou padrão a serem analisadas. Desta forma, a força iônica será mantida constante, minimizando variações na região da dupla camada elétrica e garantindo que o sinal transiente registrado possa ser atribuído somente ao processo faradaico [57]. Vale ressaltar que nas técnicas voltamétricas, o eletrólito também é necessário.

Determinações simultâneas de compostos eletroativos em potenciais redox distintos ($\Delta E > 0,1 \text{ V}$) [70] somente são possíveis empregando a técnica de amperometria a potencial constante quando mais de um eletrodo de trabalho são usados na detecção [75-77]. Quando somente um eletrodo de trabalho é usado, determinações simultâneas somente são possíveis se a técnica de amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês “*multiple pulse amperometry*”) [78] é empregada.

Esta técnica é disponibilizada no software GPES, que controla os potenciostatos comercializados pela empresa Metrohm - Autolab. Este software permite aplicar de 2 até 10 pulsos de potencial de forma sequencial e repetitiva no mesmo eletrodo de trabalho, sendo possível a aquisição da corrente em cada pulso de potencial (o que corresponde à aquisição de até 10 amperogramas distintos “simultaneamente”). O programa permite o controle da quantidade, sequência e do tempo (mínimo de 30 ms) dos pulsos de potencial aplicados ao ET. Na Figura 9 é apresentado um exemplo de aplicação da técnica de MPA. O esquema de aplicação dos 9 pulsos de potenciais e os respectivos amperogramas obtidos foram extraídos do software GPES 4.9 da empresa Metrohm - Autolab.

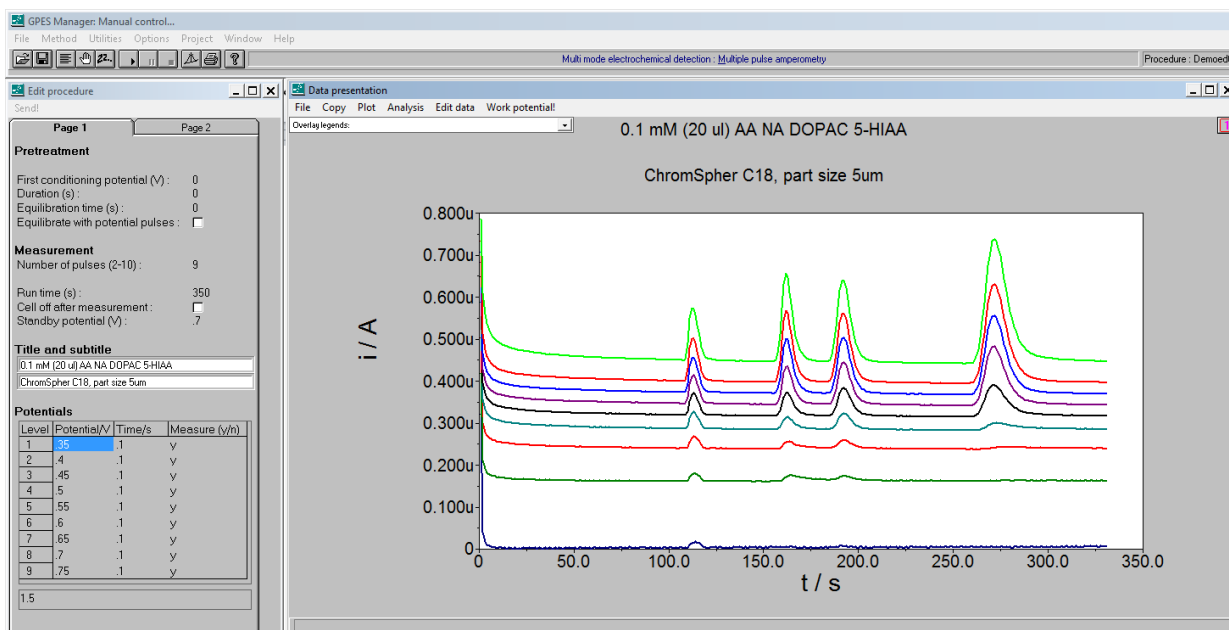


Figura 9. Esquema de aplicação de 9 pulsos de potenciais e respectivos amperogramas obtidos (Fonte: software GPES 4.9 – empresa Metrohm Autolab).

Diferentes estratégias (esquemas) podem ser adotadas dependendo da natureza das espécies oxidadas e/ou reduzidas no ET [23] para determinação simultânea de duas espécies empregando a técnica de MPA acoplada a sistemas FIA ou BIA. A estratégia mais comum é a aplicação de dois pulsos de potenciais (E_1 e E_2) e aquisição de dois amperogramas distintos simultaneamente:

- em E_1 , somente uma das espécies é reduzida ou oxidada, sendo o sinal de corrente proporcional à concentração desta espécie (não há interferência da outra espécie).

- em E_2 , ambas as espécies são oxidadas ou reduzidas.

A corrente proveniente da espécie que somente é oxidada no potencial E_2 pode ser obtida mediante subtração da corrente detectada em E_1 sem [79, 80] e com [81, 82] o uso de um fator de correção (FC). O uso do FC é mais comum, pois a corrente da espécie detectada nos dois pulsos de potenciais, muitas vezes, não é igual. Este procedimento pode ser usado em sistemas FIA [81] ou BIA [83]. Outra estratégia possível é a aplicação de três pulsos de potenciais (E_1 , E_2 e E_3). Os potenciais E_1 e E_2 têm a mesma função anterior, no entanto, somente o produto de oxidação de uma das espécies oxidadas em E_2 é eletroquimicamente redutível e é seletivamente detectada em E_3 [40, 84].

A técnica de MPA acoplada a sistemas FIA ou BIA também permite a aplicação de um pulso de potencial adicional para prevenir a contaminação do eletrodo de ET (possibilidade de constante limpeza eletroquímica). Neste caso, a forma de funcionamento da MPA é similar a detecção amperométrica pulsada (PAD, do inglês “*pulsed amperometric detection*”). A técnica PAD também permite a aplicação de pulsos de potenciais, no entanto, a aquisição de corrente se restringe a um potencial (limitação de software).

Informações a respeito dos aspectos teóricos da detecção empregando a MPA são pouco divulgadas na literatura, o que obviamente contribui para a baixa quantidade de trabalhos publicados empregando esta técnica. Dos Santos *et al*, em um artigo de revisão [78], abordam alguns aspectos teóricos, potencialidades (determinação simultânea, análises indiretas, limpeza eletroquímica, inserção de padrão interno para correção de variáveis do sistema em fluxo, etc.) e revisão bibliográfica sobre o tema FIA-MPA. A seguir, alguns pontos sobre a teoria a técnica MPA serão discutidos.

Quando pulsos de potenciais são aplicados alternadamente, a corrente amperométrica monitorada é governada por dois componentes de corrente, a corrente capacitiva, i_C (referente ao carregamento da dupla camada elétrica quando um potencial é aplicado e não envolve a ocorrência de reação química) e a corrente faradaica, i_F (referente a transferências de elétrons que ocorrem na interface eletrodo-solução) [57]. Quando há na solução espécies que podem ser oxidadas ou reduzidas no eletrodo há a geração da i_F . Assim, na detecção amperométrica pulsada acoplada a um sistema em fluxo ou batelada (BIA), quando apenas a solução carregadora inerte estiver passando sobre o eletrodo de trabalho, a magnitude de i_F dependerá da concentração de impurezas eletroativas presentes na solução, que em geral são baixas. A magnitude da i_C depende da amplitude do pulso de potencial e do tempo de aplicação. A i_C será diretamente proporcional a amplitude do pulso e inversamente proporcional ao tempo de aplicação do pulso de potencial. Quando a zona da amostra contendo uma espécie eletroativa passar através da célula eletroquímica, a magnitude de i_F será governada pela concentração da espécie analítica que chega a superfície do eletrodo de trabalho.

A dependência da i_F e de i_C com o tempo de aplicação do pulso de potencial são diferentes. A i_C é alta no início da aplicação do pulso de potencial, mas diminui exponencialmente com o tempo de aplicação do pulso. Em uma solução que contém uma espécie analítica eletroativa, a dependência da corrente faradaica com o tempo de aplicação do pulso depende das condições do transporte de massa da espécie analítica em direção ao eletrodo.

Em condições estacionárias, a corrente faradaica diminui mais lentamente com o tempo de aplicação do pulso quando comparada com a corrente capacitiva. Já em fluxo constante, a corrente faradaica mantém-se constante. Portanto, se a vazão da solução carregadora contendo a alíquota da amostra é mantida constante, a taxa do transporte de massa será constante, e por consequência, a magnitude da corrente faradaica dependerá somente da concentração da espécie analítica na zona de amostra que alcança o eletrodo. Considerando-se a dependência da corrente faradaica e da corrente capacitiva com o tempo de aplicação do pulso, tem-se que, quanto maior o tempo de aplicação do pulso de potencial, menor será a contribuição de i_c na corrente amperométrica total monitorada.

Entretanto, deve-se ressaltar que, apesar da contribuição de i_c ser maior quando pulsos de potenciais são aplicados por curtos períodos de tempo, esta contribuição não afetará o sinal amperométrico de interesse, pois, a corrente amperométrica está sendo medida continuamente, antes, durante e após a passagem da zona da amostra. Dessa forma, a contribuição de i_c será a mesma antes, durante e após a passagem da zona da amostra, que contém a espécie analítica de interesse (considerando que a força iônica constante). Por consequência, durante a passagem da zona da amostra, monitora-se somente a contribuição da i_f (proporcional à concentração da espécie analítica) para o sinal amperométrico. Como a corrente faradaica depende somente da concentração da espécie analítica no fluido de solução que passa através do eletrodo, o tempo de aplicação do pulso de E governará a quantidade da espécie analítica que reagirá no eletrodo.

Levando em consideração o potencial na MPA acoplada a sistemas FIA ou BIA, o desenvolvimento de novas metodologias de análise se torna vantajosa, uma vez que apresenta custo reduzido, boa reprodutibilidade, seletividade e sensibilidade, tempo reduzido de análise e simplicidade de execução.

1.5. Determinações simultâneas com detecção eletroquímica

Uma das perspectivas presentes no desenvolvimento de novos métodos de análise se refere à possibilidade de determinações simultâneas, ou seja, a determinação de mais de um componente na amostra na mesma operação experimental. Neste sentido, as metodologias nas quais os constituintes são previamente separados são amplamente utilizadas, tal como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou a cromatografia gasosa (GC). No entanto,

são técnicas relativamente caras, seja em relação à aquisição dos equipamentos ou em relação aos custos de manutenção. Separações por eletroforese capilar (CE) apresentam vantagens em relação às separações cromatográficas em relação aos custos de manutenção, no entanto, o custo de aquisição do equipamento é similar. Além disso, determinações simultâneas sem etapa prévia de separação em coluna também podem ser encontradas, por exemplo, trabalhos baseados em detecção espectrofotométrica com tratamento dos dados por técnicas quimiométricas (PCR, PLS ou calibração multivariada) [85-88] ou técnicas eletroquímicas, que geralmente apresentam maior simplicidade, possibilidade de automação, baixo custo e fácil tratamento dos resultados.

Na literatura podem ser encontrados trabalhos de determinação simultânea empregando diferentes técnicas eletroquímicas. Dentre estes podemos citar a potenciometria [89, 90], as voltametrias de pulso (SWV e DPV) [91-97], voltametria de redissolução [98-100] amperometria de múltiplos pulsos acoplada a sistemas FIA (FIA-MPA) [40, 79-81, 84, 101] e acoplada a sistemas BIA (BIA-MPA) [21, 82, 102-104].

1.6. Parâmetros analíticos utilizados nos métodos propostos.

Métodos analíticos são caracterizados e validados por inúmeros parâmetros de mérito, tais como sensibilidade, seletividade, limites de detecção e quantificação, fator de recuperação, robustez, precisão, reprodutibilidade, dentre outros. A seguir uma breve descrição dos parâmetros utilizados no presente trabalho [105-108].

1.6.1. Sensibilidade

A sensibilidade ou sensibilidade da calibração é a variação no sinal de resposta pela variação da unidade de concentração da espécie analítica. A sensibilidade da calibração é, portanto a inclinação da curva analítica. Se a curva analítica for linear, a sensibilidade será constante e independente da concentração. Se a curva analítica não for linear, a sensibilidade variará com a concentração e não tem um valor único.

A sensibilidade da calibração não indica as diferenças de concentração que podem ser detectadas. O ruído presente nos sinais de resposta precisa ser considerado a fim de que se possam expressar quantitativamente as diferenças passíveis de serem detectadas. Por essa razão, algumas vezes o termo sensibilidade analítica é utilizado. A sensibilidade depende da natureza da espécie analítica e da técnica de detecção utilizada.

1.6.2. Especificidade e Seletividade

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações.

Na prática, a seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade garante que a resposta seja exclusivamente do composto de interesse. A seletividade mede o grau de interferência de outras espécies, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes na amostra.

1.6.3. Linearidade

Linearidade corresponde à capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração da espécie analítica em uma dada faixa de concentração. A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva de calibração.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = intersecção com o eixo y, quando x = 0.

O coeficiente de correlação linear (r) permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A relação linear descrita pela equação da reta só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida, no qual se pode construir uma curva analítica linear e é a chamada faixa linear dinâmica. Para definição da faixa linear de resposta necessita-se de pelo menos cinco níveis crescentes de concentração, no mínimo três análises de cada concentração, com estimativa do desvio padrão relativo inferior a 5%.

1.6.4. Limite de Detecção

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis da espécie analítica ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração da espécie analítica ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. Portanto, o limite de detecção (LD) é a menor concentração da espécie analítica que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Toda técnica analítica tem um limite de detecção. Para os métodos que empregam uma curva analítica, o limite de detecção pode ser expresso como:

$$LD = \frac{3 \times DP_b}{a}$$

onde,

DP_b = desvio padrão relativo do branco;

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

1.6.5. Limite de Quantificação

O Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração da espécie analítica que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão (concordância entre os vários resultados obtidos da mesma forma) e exatidão (é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro).

A determinação do LQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LQ, a medição torna-se menos precisa. Se houver necessidade de maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LQ. O LQ pode ser calculado como:

$$LQ = \frac{10 \times DP_b}{a}$$

1.6.6. Repetibilidade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade a seguir: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local, e repetições em curto espaço de tempo.

A repetibilidade do método é verificada contemplando uma faixa de concentração dentro do intervalo linear do método e pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas. O desvio padrão relativo é calculado da seguinte forma:

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{DP}_x}{\bar{x}} \times 100$$

onde:

DP_x = Desvio padrão da concentração encontrada;

\bar{x} = concentração média encontrada.

1.6.7. Recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação) é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada (“*spike*”) na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. E é calculada como:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Onde:

C_1 = concentração do analito na amostra fortificada,

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada,

C_3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

A limitação do procedimento de recuperação é a de que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra. Isso pode implicar, por exemplo, a presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione melhor detecção, ocasionando avaliações excessivamente otimistas da recuperação. Pelo fato de outros componentes da matriz em interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados.

É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma metodologia simples, rápida e de baixo custo, empregando análise por injeção em batelada com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (BIA-MPA). O foco do trabalho foi direcionado para determinação simultânea de espécies em amostras farmacêuticas sem a necessidade de etapas morosas para a preparação da amostra ou modificação química/eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho. Os seguintes compostos foram objeto de estudo no presente trabalho:

- Determinação simultânea e estequiométrica de 8-cloroteofilina e difenidramina (dimenidrinato);
- Determinação rápida e simultânea de 8-cloroteofilina, difenidramina e piridoxina;
- Determinação rápida e simultânea de 8-cloroteofilina, difenidramina e cafeína;
- Aplicação dos métodos desenvolvidos para análises em formulações farmacêuticas.

Dentre os parâmetros estudados para que os objetivos fossem alcançados estão:

- ✓ Comportamento eletroquímico das espécies analíticas de interesse.
- ✓ Parâmetros do sistema BIA: velocidade de injeção e volume de amostra a ser injetado.
- ✓ Detecção amperométrica de múltiplos pulsos: pulsos de potenciais a serem aplicados e tempos de aplicação de cada pulso.
- ✓ Necessidade de uso de pulso de potencial de limpeza;
- ✓ Aplicação em amostras reais de formulações farmacêuticas;
- ✓ Validação dos métodos propostos.

3. Parte Experimental

3.1. Instrumentação

3.1.1. Detecção eletroquímica

Nas medidas amperométricas e voltamétricas foram utilizados um potenciostato/galvanostato μ AUTOLAB tipo III (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands - Metrohm;) interfaceado a um computador e controlado através do software GPES 4.9.007.

3.1.2. Eletrodos de trabalho

Neste trabalho foram utilizados três diferentes eletrodos de trabalho: carbono vítreo (GC; área geométrica = $7,07 \text{ mm}^2$), ouro (Au; área geométrica = $7,07 \text{ mm}^2$) e diamante dopado com boro (BDD; área geométrica = $22,9 \text{ mm}^2$). A seguir, detalhes adicionais sobre cada eletrodo são apresentados.

Os eletrodos GC e Au foram adquiridos da empresa Metrohm Autolab B. V. (Utrecht – Netherlands) e utilizados nas medidas voltamétricas e amperométricas. Na limpeza destes eletrodos usou-se o polimento manual com alumina (granulometria $0,3 \mu\text{m}$) com posterior lavagem com água deionizada. Antes do uso nos estudos propostos, a superfície de resposta dos eletrodos foi testada (ativação) através de voltamogramas cíclicos sucessivos em meio do eletrólito em estudo (até obtenção de estabilidade). Os voltamogramas eram registrados na faixa de potencial de $-0,8 \text{ V}$ a $+1,5 \text{ V}$ para o eletrodo de GC e de $-0,2 \text{ V}$ a $+1,2 \text{ V}$ para o eletrodo de Au com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} para ambos.

O material usado como eletrodo de BDD foi adquirido da empresa Adamant Technologies SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça (atualmente chamada NeoCoat SA - La Chaux-de-Fonds, Suíça). Trata-se de placas a base de silício ($0,7 \times 0,7 \text{ cm}$) com espessura de aproximadamente $1,2 \text{ mm}$ e cobertas com um fino filme de diamante com nível de dopagem de boro de 7000 a 8000 ppm. Antes do início das medidas eletroquímicas, o eletrodo de BDD foi submetido a um processo de limpeza/ativação, uma vez que não seria possível a limpeza manual com polimento, pois se trata de um filme de BDD muito fino ($\sim 1,2 \mu\text{m}$). Neste trabalho dois modos de limpeza eletroquímica foram empregados, uma anódica (aplicando um potencial de $+2,0 \text{ V}$ ou uma corrente de $+0,01 \text{ A}$) em meio de tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0)

e uma catódica (aplicando-se um potencial de - 2,0 V ou uma corrente de - 0,01 A) em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} . Estes tratamentos são similares aos descritos na literatura [36, 109]. Os tempos de ativação (limpeza) variavam de 15 a 30 minutos. A limpeza catódica foi feita diariamente previamente ao uso. Já a limpeza anódica somente foi realizada quando o sinal voltamétrico registrado em voltametria cíclica em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} superava uma corrente de 10 μA . Após a ativação anódica, sempre foi necessário fazer também a ativação catódica. O tempo de aplicação de cada limpeza foi definido mediante registro voltamétrico posterior. A limpeza era considerada adequada quando a corrente de fundo usando voltametria cíclica na faixa de potencial entre 0,0 e 1,4 V ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} ficava próxima a 1 μA .

3.1.3. Eletrodo de Referência

Em todos os experimentos utilizou-se um mini eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl sat.) [110] preparado no próprio laboratório pela eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag através da aplicação de +0,3 V em meio de uma solução de HCl 0,10 mol L^{-1} durante 1 h.

3.1.4. Eletrodo Auxiliar

Utilizou-se como eletrodo auxiliar, um fio de platina.

3.1.5. Célula Eletroquímica para medidas estacionárias

Nas medidas voltamétricas estacionárias com os eletrodos de GC e AU utilizou-se uma célula convencional de vidro (béquer de 10 mL). Os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência foram posicionados na célula através de uma garra de fixação. Nas medidas voltamétricas estacionárias com o eletrodo de BDD, uma célula de polipropileno (~10 mL) (fig. 10) foi utilizada. Nesta célula, o eletrodo de BDD foi posicionado no fundo da mesma com auxílio de um anel (“o-ring”) de borracha. O anel de borracha foi posicionado no fundo da célula e um pedaço de BDD (0,7 x 0,7 cm) foi fixado (pressionado) sobre o anel com auxílio de parafusos,

similar ao apresentado na Figura 10. Todos os experimentos foram realizados sem a remoção do O_2 dissolvido e a temperatura ambiente.

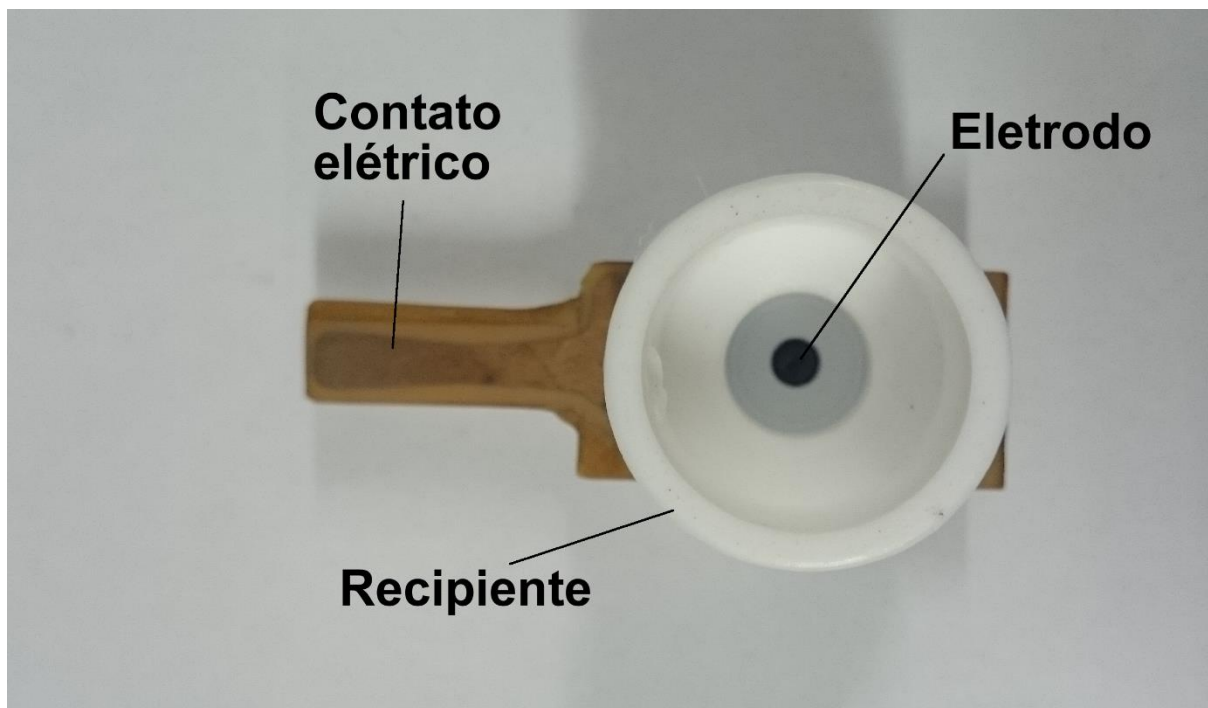


Figura 10. Célula de polipropileno utilizada nos experimentos estacionários com eletrodo de BDD.

3.1.6. Sistema BIA

Nos estudos com o sistema BIA, utilizou-se uma célula construída no próprio laboratório [46]. A célula foi constituída a partir de um tarugo de polipropileno com as seguintes dimensões: $\varnothing = 7,5$ cm; comprimento: 6 cm. Com auxílio de um torno (oficina da Faculdade de Mecânica – UFU), um orifício com as seguintes dimensões foi efetuado no tarugo: $\varnothing_{\text{interno}} = 6$ cm; profundidade = 5 cm; volume total = ≈ 150 mL. A Figura 11A ilustra um diagrama esquemático da célula BIA utilizada no trabalho com o posicionamento do micro-motor DC para agitação [19], sendo este de uso opcional.

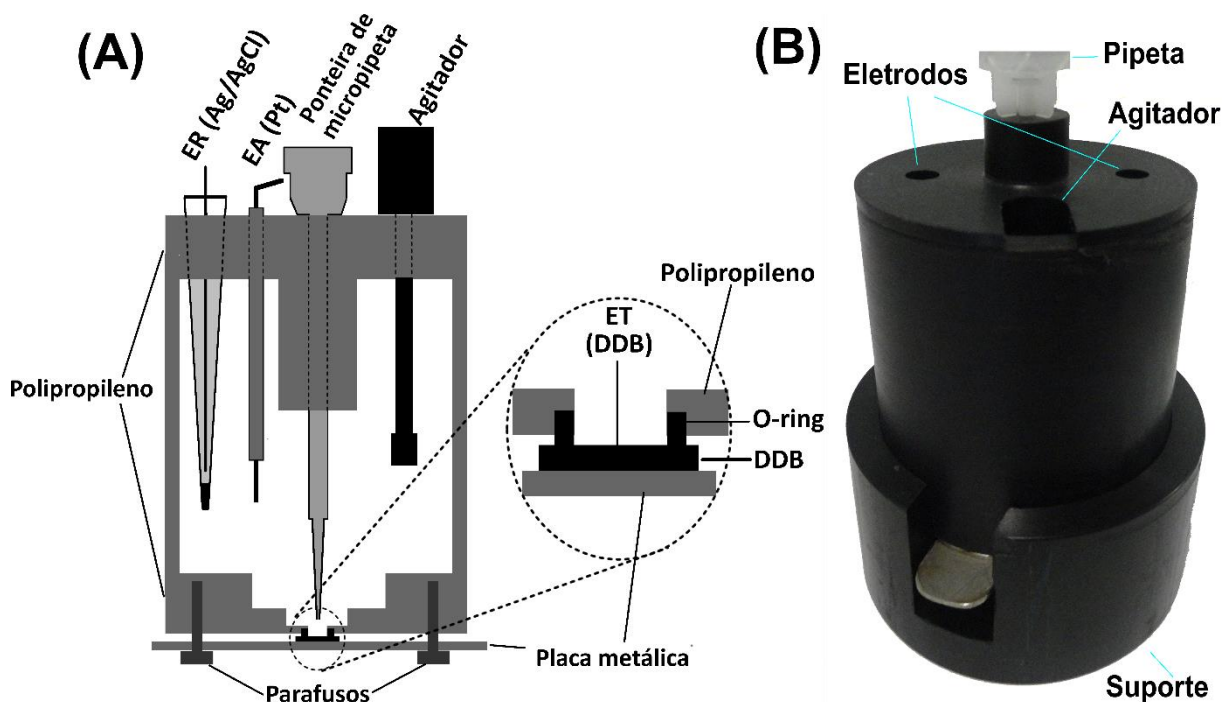


Figura 11. (A) Esquema da célula BIA utilizada no trabalho; (B) Imagem da célula BIA;

Uma tampa de polipropileno foi fixada no lado aberto do tarugo. Um orifício central foi feito tanto na tampa e na base do tubo. Além do orifício central (para o posicionamento da ponteira do sistema de injeção), a tampa superior contém mais três orifícios: dois para fixação dos eletrodos auxiliar e referência e um para a inserção do agitador mecânico. O sistema de agitação é composto por um micro-motor DC de 12 V usado originalmente em secadores de cabelo ou brinquedos elétricos. Ao eixo deste micro motor foi adaptado com uma haste de teflon [19] e a velocidade de agitação é controlada com uma fonte universal de tensão variável (3 a 12 V - 700 a 4000 rpm) figura 12A. Quanto maior a voltagem selecionada, maior é a rotação do motor.

No orifício efetuado no centro da base (5,0 mm de diâmetro) foi posicionado um anel de borracha (O-ring) e sobre este anel, a peça de BDD (0,7 x 0,7 cm) [111]. A área útil do eletrodo de BDD é definida pelo diâmetro interno deste anel (5 mm; área = 22,9 mm²). Para fixação da peça de BDD e manter o contato elétrico, uma placa metálica foi presa através de dois parafusos colados nas extremidades da parte inferior da célula. A célula foi construída de forma que durante a injeção, a ponteira fique posicionada a aproximadamente 2 mm [20] do eletrodo de BDD com o objetivo de obter resultados reprodutíveis durante as análises. Para a

injeção neste sistema utilizou-se uma pipeta motorizada (Eppendorf® Multipette stream) que permite injeções de 10 a 1000 μL (usando um combitip® de 1 mL) com velocidades de injeção de 28 a 250 $\mu\text{L s}^{-1}$ (fig.12B).

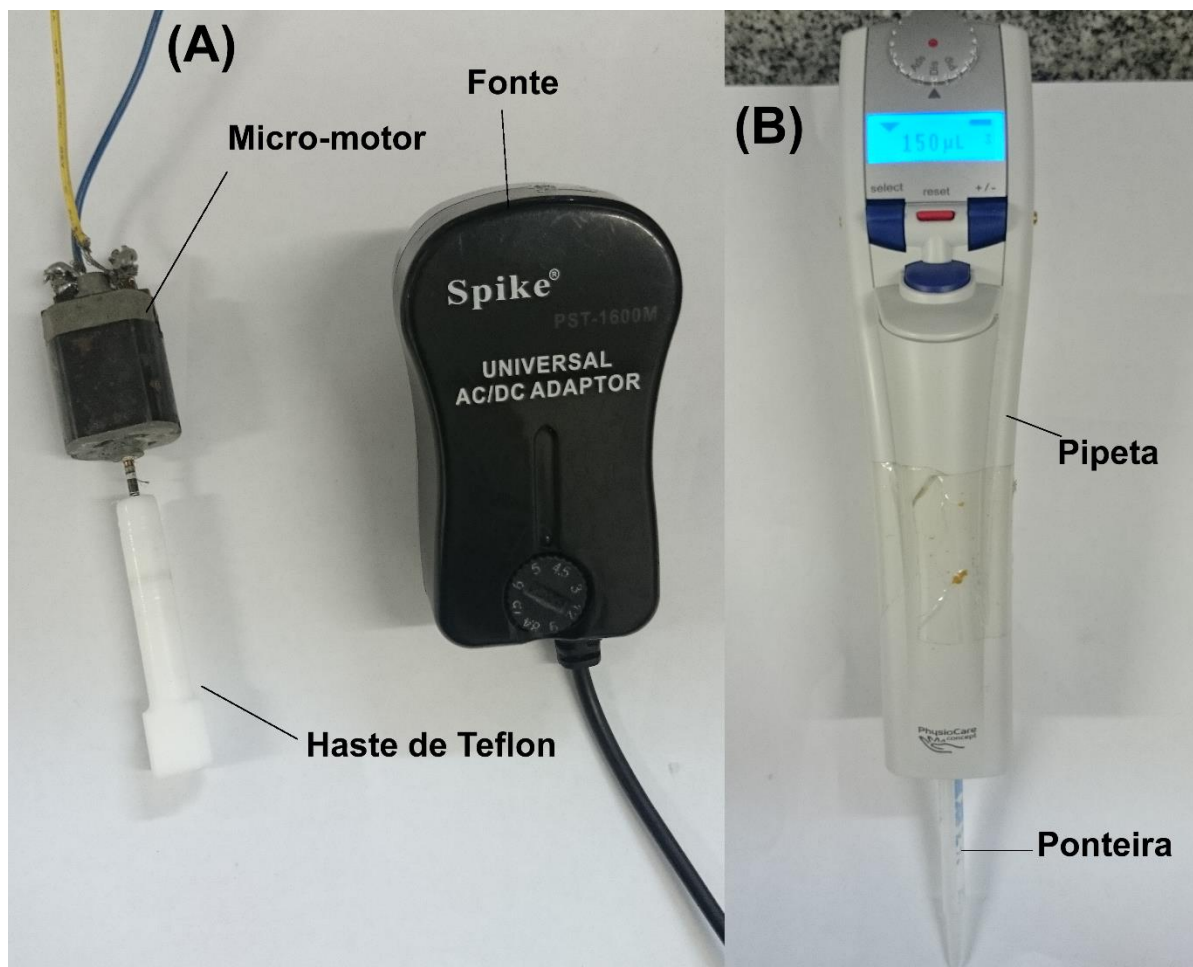


Figura 12. (A) Sistema de agitação para célula BIA; (B) Pipeta motorizada utilizada para as injeções no sistema BIA.

3.1.7. Análises comparativas por cromatografia líquida

Nestas análises, foi utilizado o equipamento Shimadzu LC-10 VP equipado com um detector UV-VIS (SPD-10AV), colunas cromatográficas com fase estacionária C18 (Lychrispher 100A° RP18-C18, 250 mm x 4.6 mm, 5 μm) para os testes de comparação para a metodologia desenvolvida para CTF e DIF e C12 (Phenomenex 80A° MAX-RP-C12, 250 mm x 4.6 mm, 4 μm) para os demais testes comparativos, um injetor manual com alça de amostragem de 20 μL e uma bomba LC-10AD-VP.

3.2. Soluções, reagentes e preparação das amostras.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade superior a $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida de sistema de purificação Direct-Q (Millipore). Todos os reagentes utilizados apresentavam pureza analítica e foram usados sem purificação prévia. Na Tabela 1 constam os reagentes usados neste estudo com sua respectiva procedência.

Tabela 1. Lista de reagentes usados no presente estudo e respectivas procedências.

Reagente	Origem	Reagente	Origem
8-cloroteofilina (CTF)	Alfa Aesar	Cafeína (CAF)	Synth
Acetonitrila	Vetec	Difenidramina (DIF)	Sigma-Aldrich
Ácido Acético	Synth	Dimenidrinato (DIM)	Sigma-Aldrich
Ácido Bórico	Sigma	Etanol	Synth
Ácido Fosfórico	Synth	Furosemida	Henrifarma
Ácido Sulfúrico	Vetec	Hidróxido de Sódio	Dinâmica
Amido	Synth	Piridoxina (PIR)	Sigma-Aldrich
Amilorida	DEG	Trietilamina	Sigma-Aldrich

As soluções estoque de CAF e PIR foram obtidas a partir da dissolução do sal em água deionizada, formando uma solução estoque com concentração de 10 mmol L^{-1} . Como o DIM, DIF e CTF são pouco solúveis em água deionizada, as soluções estoque de DIM e DIF foram preparadas em uma mistura de água e etanol (80/20; v/v) e de CTF em tampão acetato 0,05 M pH 4,7 e etanol (80/20; v/v). Todas estas soluções padrões foram previamente diluídas em eletrólitos de suporte apropriados usados nos estudos (tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7), ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pHs 2,0 e 7,2)) para posterior injeção no sistema BIA-MPA.

No preparo das amostras de formulações farmacêuticas contendo DIM, os comprimidos presentes em uma cartela (6 comprimidos) foram pesados em uma balança analítica (precisão de quatro casas decimais) e macerados utilizando um almofariz e pistilo de porcelana. Em seguida, uma massa adequada de cada amostra (obtenção de solução com concentração similar a solução estoque padrão) foi diluída no mesmo solvente usado na preparação das soluções padrão. A etapa final de preparo de amostra consistiu em uma diluição desta solução em eletrólito suporte para concentração que consta na faixa linear do método.

Para as amostras contendo DIM associado com PIR, além de amostras de comprimidos (preparada com descrito acima), também foi utilizada uma amostra líquida, a qual foi somente diluída para concentração final adequada em eletrólito suporte usado na análise. Para amostras contendo a associação DIM + CAF, devido à ausência do medicamento que contém a formulação no mercado brasileiro, uma amostra manipulada em farmácia local foi adquirida, com proporção e concentração igual ao medicamento encontrado à venda no exterior. Com a amostra manipulada foi feito o mesmo pré-tratamento descrito acima para amostra sólida.

Nas análises por cromatografia líquida de amostras contendo DIM (CTF + DIF), a fase móvel utilizada foi constituída de 22 % acetonitrila (grau cromatográfico e espectroscópico) e 78% de 0,01 M H_3PO_4 pH = 2,8 ajustado com trietilamina. A vazão e o comprimento de onda foram fixados em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e 229 nm, respectivamente [12]. Na análise de amostras que continham somente CTF e DIF foi utilizada a coluna com fase estacionária C18. Para análise de amostras que continham PIR ou CAF, foi utilizada a coluna cromatográfica C12, pois com a coluna C18 não havia separação entre CTF e CAF, desse modo o uso da C12 possibilitou uma diferença dos tempos de retenção para CTF (5,28 min) e CAF (4,59 min) e PIR (3,51 min).

4. Resultados e Discussões

4.1. Estudos para determinação simultânea e quantificação estequiométrica de 8-cloroteofilina e difenidramina

4.1.1. Comportamento eletroquímico de CTF e DIF em diferentes eletrodos e eletrólitos

Inicialmente, o comportamento eletroquímico da CTF e da DIF foi estudado utilizando diferentes tipos de eletrodos de trabalho (CV, ouro e BDD) por voltametria cíclica. Na janela de potencial de trabalho útil dos eletrodos de CV (-0,5 V a +1,5 V) e ouro (-0,2 V a +1,3 V) em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , somente a CTF apresentou pico de oxidação. Nenhum sinal de oxidação ou redução foi observado para a DIF. No entanto, na janela de potencial de trabalho útil do eletrodo de BDD (por volta de -0,5 V a 1,9 V), a oxidação de ambos os compostos foi observada. A oxidação da DIF somente ocorreu em potenciais acima de +1,6 V, região de potencial onde os eletrodos de CV e ouro não podem ser utilizados, pois a oxidação do eletrodo e/ou evolução de O_2 . Em função disto, somente o eletrodo de BDD foi usado nos estudos seguintes.

A partir da escolha do eletrodo de BDD como eletrodo de trabalho, estudos foram realizados por voltametria cíclica em eletrólitos com diferentes pHs, como H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} (pH = 1,0), tampão acetato/ácido acético 0,05 mol L^{-1} (pH 4,7) e tampões fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,1 e 7,2). A Figura 13 mostra a região de potencial onde ocorre a oxidação dos compostos de interesse (CTP e DIF) em cada eletrólito (pH) estudado.

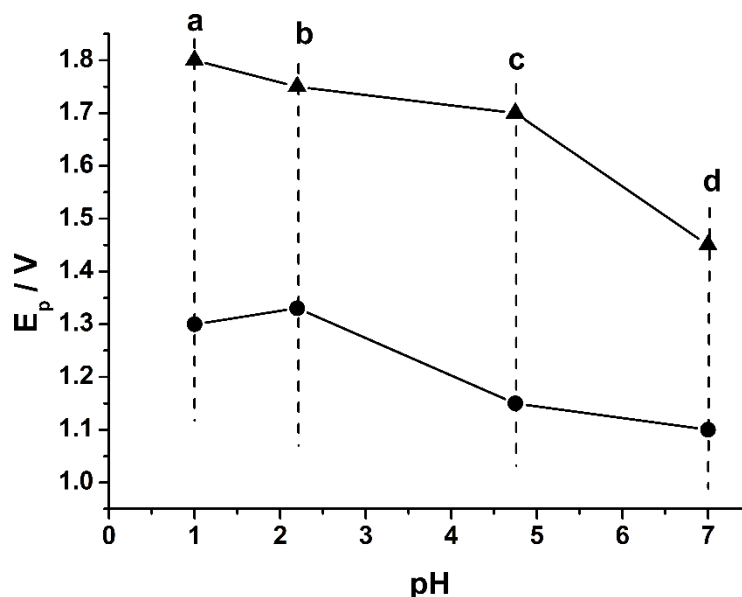


Figura 13. Separação entre os potenciais de oxidação estimados para CTF (●) e DIF (▲) em eletrólitos de diferentes pHs: (a) H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 1,0), (c) tampão NaAc/HAc $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7) e tampões fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,1 (b) e 7,2 (d).

A partir da Figura 13 pode ser observado que existe uma separação nos potenciais de oxidação da CTF e DIF nos eletrólitos estudados ($\Delta E > 0,3 \text{ V}$). Uma separação ligeiramente maior foi observada em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão acetato/ácido acético $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7). Em função de evitar a geração de resíduos de maior acidez para a determinação simultânea de CTF e DIF, o tampão acetato/ácido acético $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7) foi adotado nos estudos seguintes.

A Figura 14 mostra os voltamogramas cíclicos para CTF e DIF nas condições definidas de eletrodo e eletrólito. A varredura foi registrada na faixa de trabalho entre +0,4 V e +1,9 V vs Ag/AgCl em meio de tampão acetato/ácido acético $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7), utilizando BDD como eletrodo de trabalho.

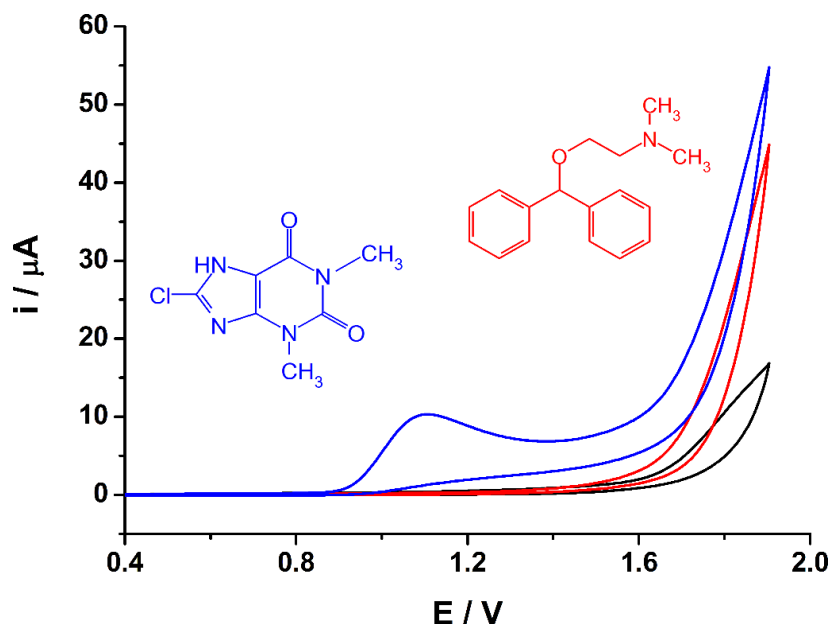


Figura 14. Estrutura das moléculas de **CTF** e **DIF** e voltamogramas cíclicos obtidos em meio de NaAc/HAc 0,05 mol L⁻¹ sem (—) e com a presença de (—) 1 mmol L⁻¹ de CTF e (—) 1 mmol L⁻¹ de DIF. ET: BDD. Velocidade de varredura = 50 mV s⁻¹.

Conforme apresentado na Figura 14, a oxidação eletroquímica da CTF apresenta um comportamento irreversível com um pico bem definido em +1,1V e um processo de oxidação sem pico definido em potenciais superiores a +1,5V. O pico de oxidação observado em +1,1V está de acordo com estudos realizados anteriormente usando BDD como eletrodo de trabalho na eletro-oxidação de uma xantina (teofilina) que apresenta estrutura muito similar a CTF [112]. Para fins de comparação, estudos também foram realizados com solução contendo teofilina (TEO) (Fig. 15) nas mesmas condições usadas para a CTF na Fig. 14.

Como pode ser observado, nestas condições, a TEO apresenta um pico de oxidação bem definido (+1,5V) em potencial mais positivo do que a CTF (0,4 V mais positivo). A redução no potencial de oxidação da CTF em relação a teofilina (de +1,5 a + 1,1 V) pode ser atribuída a presença do átomo de cloro na posição 8 na molécula de CTF, permitindo assim, a formação de um intermediário mais estável após a transferência de elétrons.

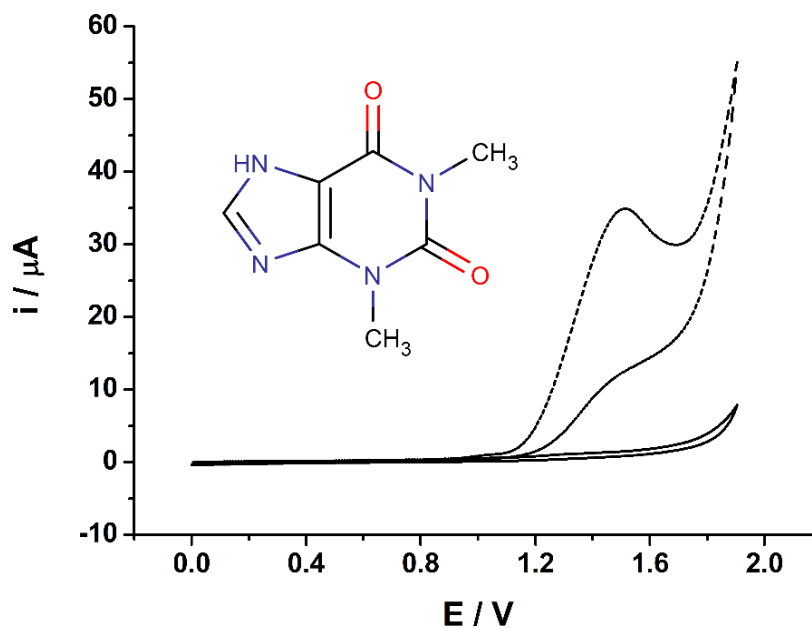


Figura 15. Estrutura da molécula de TEO e voltamogramas cíclicos obtidos antes (linha contínua) e após a adição de 1 mmol L^{-1} de TEO (linha tracejada). Demais condições: idem Fig. 14.

Um estudo para verificar o efeito da variação na velocidade de varredura em voltametria cíclica na oxidação da CTF foi realizado no intervalo de velocidade entre 10 a 400 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos deste estudo são apresentados na Figura 16.

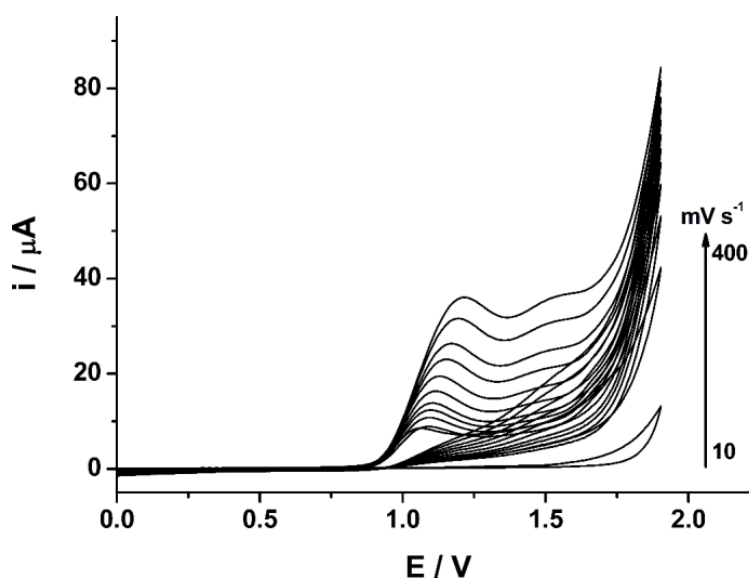


Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (10 a 400 mV s^{-1}) na oxidação de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ CTF sobre BDD em meio de NaAc/HAc $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

Conforme pode ser observado, a intensidade de corrente aumenta com o aumento na velocidade de varredura. De acordo com a equação de Randles-Sevcik (1) [113], quando a relação entre as correntes de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura é linear, o processo eletroquímico envolvido é preferencialmente controlado por difusão. Os outros termos da equação são constantes.

$$i_p = \pm 2,686 \times 10^5 n^{3/2} C_0 D^{1/2} v^{1/2} A \quad (1)$$

Onde:

i_p – corrente de pico em ampere (positiva: corrente anódica e negativa: corrente catódica);

n – número de elétrons envolvidos na reação redox;

A – área do eletrodo (cm^2);

D – coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$);

C_0 – concentração das espécies eletroativas;

v – velocidade de varredura (V s^{-1}).

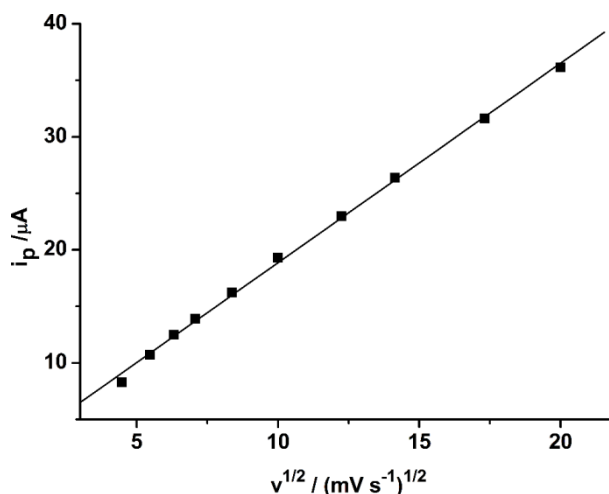


Figura 17. Dependência das correntes de pico (μA) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($\text{mV s}^{-1})^{1/2}$. Dados obtidos a partir da Fig. 16.

Analisando o gráfico da Figura 17 (dados obtidos a partir dos voltamogramas da Fig. 16), podemos observar que existe linearidade ($r > 0,99$) entre as duas variáveis descritas no gráfico. Isto indica que a transferência de massa no processo de oxidação da CTF (em 1,1V) em meio de NaAc/HAc 0,05 mol L⁻¹ é preferencialmente controlado por difusão.

Como já reportado na literatura, similar à oxidação da xantina e teofilina, em altas velocidades de varredura, um processo anódico adicional aparece nos voltamogramas [112, 114], que, no caso da xantina, foi atribuído à oxidação do ácido úrico, subproduto do processo de oxidação da xantina. Na Figura 18 é apresentado um esquema das etapas envolvidas na oxidação eletroquímica da xantina [112].

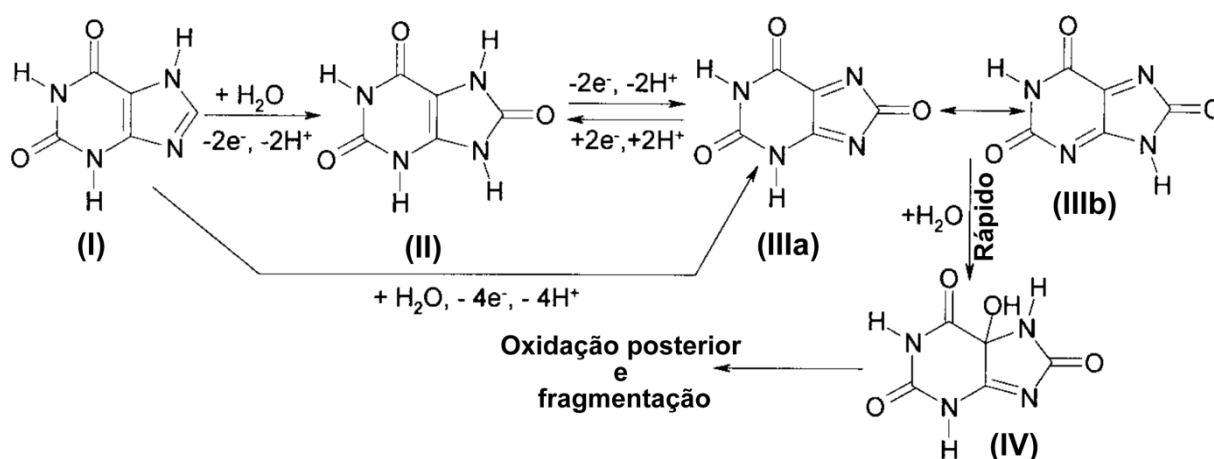


Figura 18. Esquema representando as etapas de oxidação eletroquímica de uma xantina [112].

O esquema acima representa as etapas de oxidação da xantina que, devido à similaridade das estruturas moleculares, podemos estender para seus derivados como a TEO, e, conseqüentemente a CTF, (com a substituição por dois grupos metilas nas posições 1 e 3). Esse esquema mostra que a oxidação eletroquímica da xantina (I) é dada por uma oxidação inicial envolvendo 2e^- e 2H^+ a ácido úrico (II), que é rapidamente oxidado a bis-imida (IIIa, IIIb), numa segunda reação de 2e^- e 2H^+ . Assim, o pico único de oxidação para a xantina envolve uma oxidação global envolvendo 4e^- e 4H^+ . Em velocidades de varredura altas, é assumido que uma pequena quantidade de bis-imida (IIIa, IIIb), é reduzida novamente a ácido úrico resultando assim no segundo pico de oxidação mal definido [112].

O efeito do pH na eletro-oxidação da CTF também foi estudado. Esse estudo foi na faixa de pH de 2,0 a 8,0 utilizando o tampão Britton-Robinson. Em valores de pH maiores que 8,0 foi observada a precipitação da CTF. De acordo com a Figura 19, pode-se observar que existe

uma relação linear entre os potenciais de oxidação da CTF na faixa de pH entre 2,0 e 5,0 (inclinação = -0,061V/pH). No entanto, a inclinação (-0,061V/pH) dessa relação muda a partir do valor de pH em torno de 5,3 (Fig. 19). Segundo a literatura [115], esse valor de pH pode ser considerado como sendo o pKa da molécula em estudo. Para a CTF, o pKa segundo a literatura é 5,14 [116], o que está de acordo com o valor encontrado experimentalmente.

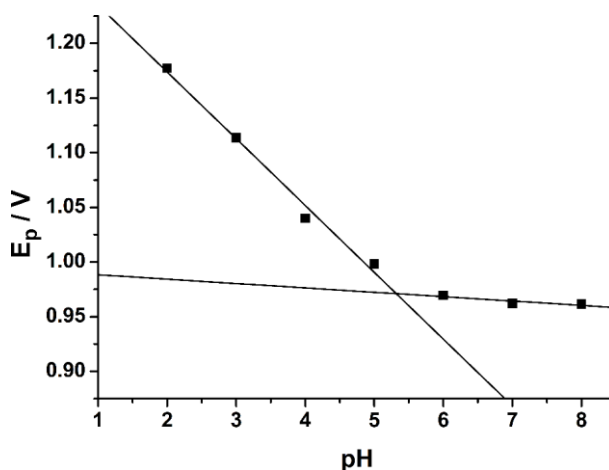


Figura 19. Estudo do efeito do pH sobre o potencial de oxidação da CTF por voltametria cíclica em meio tampão Britton Robinson (0,4 mol L⁻¹). Velocidade de varredura: 50mV s⁻¹.

A relação E_p vs. pH encontrada pode ser usada para o cálculo do número de prótons que participam no processo de oxidação da CTF. Essa relação pode ser expressa como:

$$E_p = A + B \times \text{pH} \quad (2)$$

Para a equação encontrada na Figura 19, foram calculados para o intercepto A = 1,296 V (±0,016) e para a inclinação B = -0,061 (±0,0045). Considerando a equação eletroquímica:



Quando CTF_{ox} é a forma oxidada de CTF, a equação de Nernst pode ser escrita:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{(a_{\text{CTF}_{\text{ox}}})(a_{\text{H}^+})^n}{(a_{\text{CTF}})} \quad (4)$$

A partir dessa equação, pode-se derivar para o intercepto A e a inclinação B [117]:

$$A = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{(a_{CTF_{ox}})}{(a_{CTF})} \quad (5)$$

$$B = -\frac{2,3026nRT}{zF} \text{pH} \quad (6)$$

Da equação (6), o número de prótons n se $z = 4$, é calculado como:

$$n = B \left(-\frac{4F}{2,3026RT} \right) = -0,061 \left(-\frac{4 \times 96485}{2,3026 \times 8,314 \times 298} \right) = 4,13 \quad (7)$$

O que confirma os dados discutidos anteriormente de que o processo de oxidação global da CTF envolve $4e^-$ e $4H^+$.

Não existem estudos na literatura para o segundo processo de oxidação da CTF (em potenciais acima de +1,6 V). Como o processo possui um sinal próximo à evolução de O_2 , os testes para investigação do mecanismo não apresentaram resultados reprodutíveis. O mesmo ocorreu para a DIF, que também possui o potencial de oxidação acima de +1,65V. De acordo com a literatura, o mecanismo para a oxidação eletroquímica de aminas terciárias alifáticas (DIF) envolve a geração de um N-radical com clivagem rápida a aminas secundárias alifáticas e aldeídos [118, 119].

4.1.2. Estudos para a determinação simultânea de CTF e DIF por BIA-MPA

Os estudos até aqui apresentados foram feitos no modo estacionário, porém, o intuito deste trabalho é realizar as análises sob condições hidrodinâmicas. Assim, estudos também foram realizados para avaliar o comportamento eletroquímico do CTF e DIF em condições hidrodinâmicas (BIA-MPA), as quais são similares àquelas que serão usadas na análise. Neste estudo, dez pulsos de potenciais (+0,90; +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5; +1,6; +1,7 e +1,8 V; 70 ms cada) foram aplicados continuamente ao eletrodo de trabalho de BDD (Figura 20A). A corrente em cada pulso de potencial (aquisição simultânea dos 10 amperogramas) foi continuamente monitorada durante injeções em triplicata de solução contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF ou $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF. A corrente de oxidação detectada em forma de pico transiente em cada pulso de potencial foi usada na construção do voltamograma hidrodinâmico de oxidação de CTF e DIF (Figura 20B).

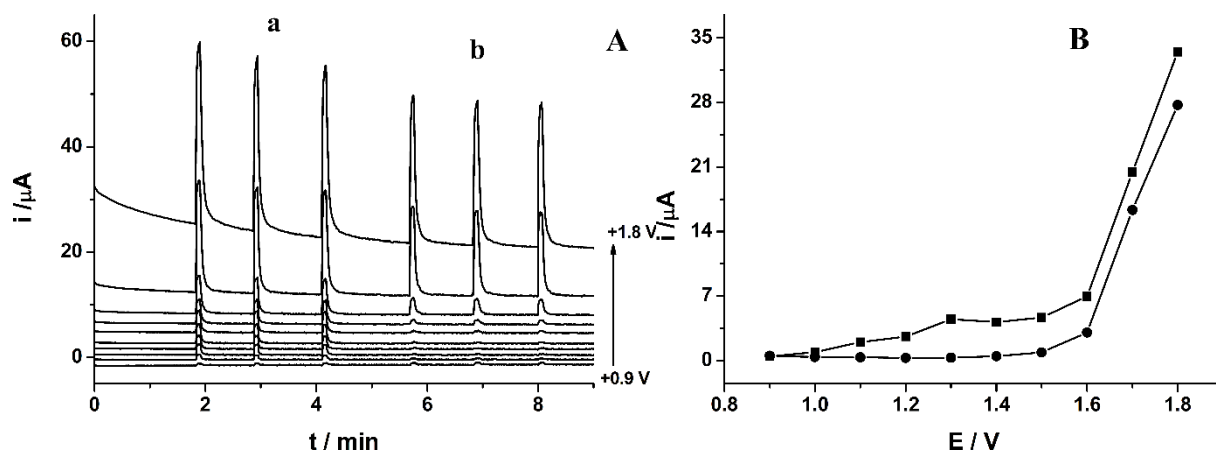


Figura 20. (A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas ($n = 3$) de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF (a) ou de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF (b). (B) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para o CTF (■) e DIF (●). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 70 ms; Eletrólito suporte: NaAc/HAc $0,05 \text{ mol L}^{-1}$; Vazão: $75 \mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado: $150 \mu\text{L}$.

Como pode ser observado, em condições hidrodinâmicas no sistema BIA-MPA, a oxidação da CTF se inicia em torno de +1,1 V e atinge um valor de pico próximo de +1,3 V (primeiro processo de oxidação) e aumenta novamente a partir de +1,6 V (segundo processo de oxidação). Por outro lado, a oxidação da DIF se inicia +1,6 V e vai aumentando sem alcançar um valor máximo de corrente no intervalo de pulsos de potenciais estudados (+0,9 V a +1,8 V).

4.1.2.1. Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de CTF e DIF por BIA-MPA

Com base nos resultados apresentados na Figura 20, os seguintes pulsos de potenciais foram selecionados para verificar a possibilidade de determinação simultânea de CTF e DIF:

- +1,35 V/50 ms: oxidação de CTF sem a interferência da DIF;
- +1,80 V/50 ms: oxidação de ambos os analitos (CTF e DIF);
- +0,70 V/200 ms: limpeza eletroquímica do eletrodo.

A Figura 21B apresenta os amperogramas obtidos nos pulsos de potenciais +1,35 V e +1,80 V após injeções ($n = 3$) no sistema BIA-MPA de alíquotas de 150 μL de soluções contendo somente CTF, somente DIF e simultaneamente CTF + DIF (DIM).

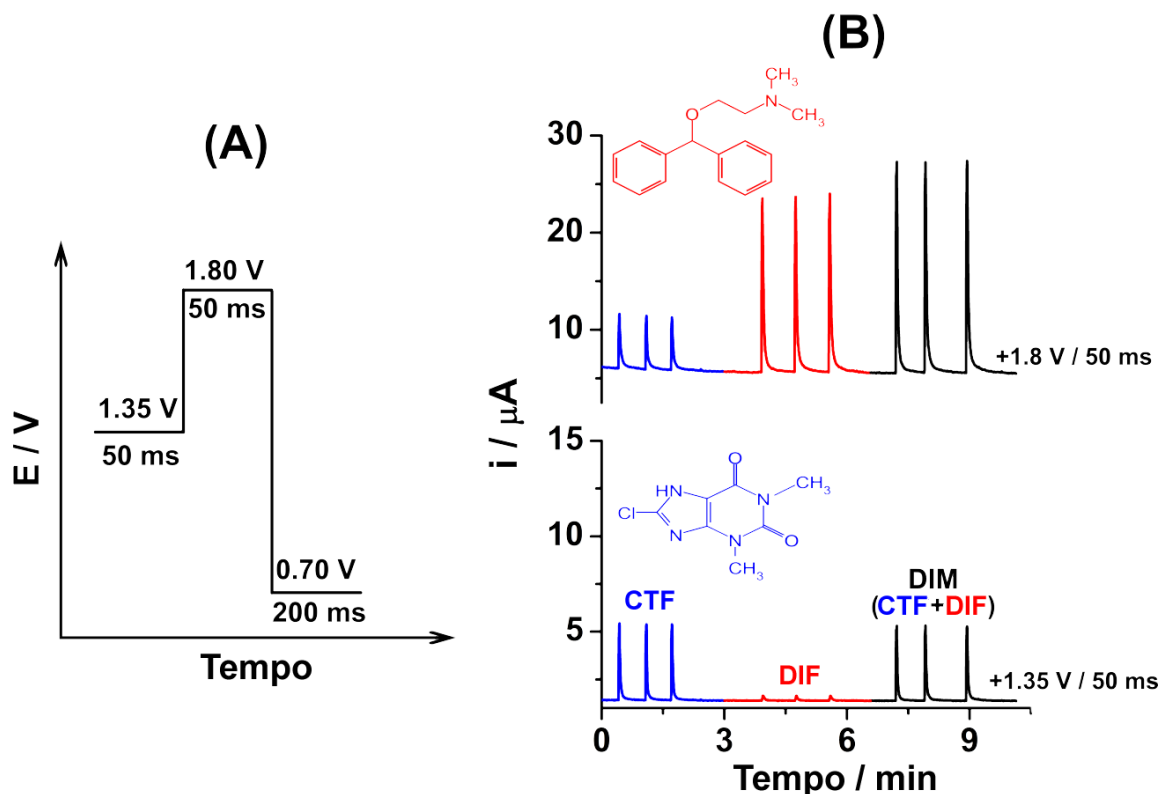


Figura 21. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD posicionado no sistema BIA-MPA. (B) Amperogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF, de DIF ou de DIM (CTF + DIF). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms. Demais condições experimentais: idem a Fig. 20.

Como se pode observar pelos amperogramas da Figura 21B, apenas a CTF é oxidada em +1,35 V, sendo que corrente detectada é a mesma na presença ou ausência de DIF, indicando que não há interação química entre CTF e DIF ou com os produtos de oxidação. Em +1,80 V, tanto a CTF como a DIF são oxidadas. Na injeção de uma solução contendo ambos os analitos (DIM), a corrente de oxidação em +1,80 V corresponde à soma das correntes individuais da CTF e da DIF neste pulso de potencial. Um fenômeno que também pode ser observado é que a oxidação do CTF não gera a mesma magnitude de corrente em ambos os pulsos de potenciais (+1,35 e +1,80 V), o que impede o uso de uma subtração simples entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais ($i_{+1,80\text{V}} - i_{+1,35\text{V}}$) para ter acesso à corrente de oxidação relacionado

somente com a oxidação da DIF. No entanto, este problema pode ser contornado através do uso de um fator de correção (FC), que é obtido pela razão (divisão) entre a corrente de oxidação da CTF obtida em +1,80 V pela corrente de CTF em +1,35 V mediante a injeção de solução contendo apenas CTF [38, 81]. Assim, quando uma solução contendo os dois compostos é injetada no sistema BIA, a corrente de oxidação da DIF pode ser obtida pela subtração entre a corrente detectada em +1,80 V e a corrente detectada em +1,35 V multiplicada pelo FC. As equações 8 e 9 serão usadas nos cálculos para obtenção das correntes relacionadas com a oxidação de DIF e do FC, respectivamente.

$$I_{DIF} = i_{+1,80\text{ V}} - (FC \times i_{+1,35\text{ V}}) \quad (8)$$

$$FC = i_{CTF +1,80\text{ V}} / i_{CTF +1,35\text{ V}} \quad (9)$$

Assim, com os dois amperogramas adquiridos simultaneamente (em +1,35 e +1,80 V) e as equações acima é possível detectar seletivamente as correntes de oxidação da CTF e da DIF quando presentes na mesma solução.

4.1.2.2. Otimização de parâmetros hidrodinâmicos para o sistema BIA

Os parâmetros hidrodinâmicos analisados foram: agitação da solução no interior da célula BIA, volume injetado e velocidade de injeção. Em todos os parâmetros, analisou-se a intensidade das correntes de oxidação detectadas nos pulsos de potenciais otimizados anteriormente através da injeção de uma solução contendo 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF e DIF em meio de tampão NaAc/HAc 0,05 mol L^{-1} .

4.1.2.2.1. Agitação

Os testes foram realizados utilizando uma micropipeta motorizada mediante injeção de soluções contendo CTF e DIF sem e com diferentes velocidades de agitação da solução no interior da célula. Os resultados obtidos neste estudo são apresentados na Figura 22.

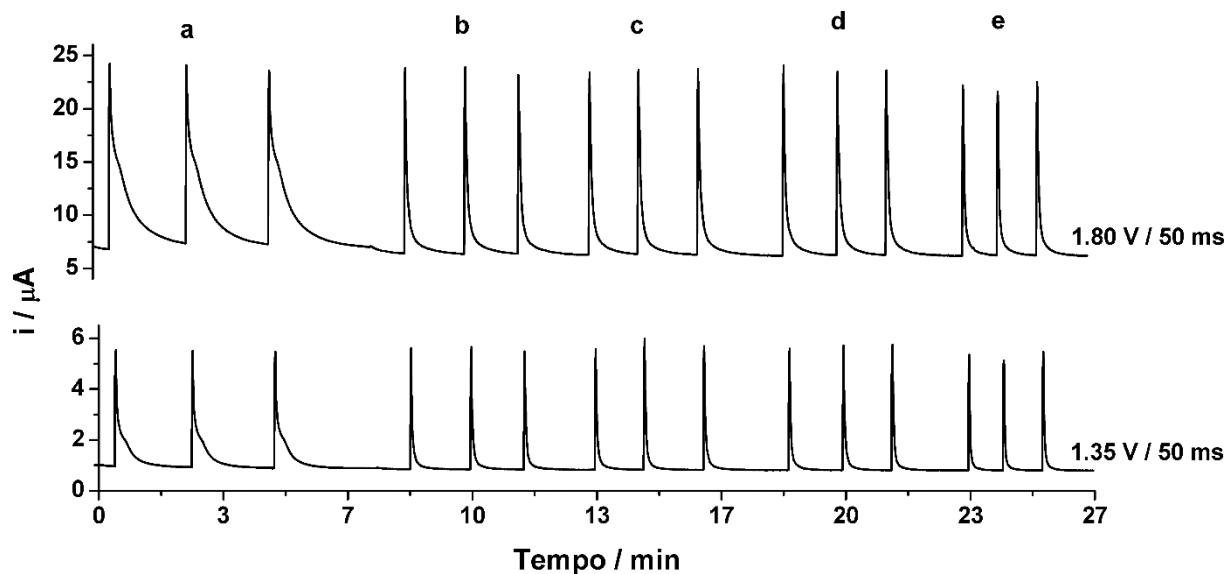


Figura 22. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA sem agitação (a), e com aumento da velocidade de agitação usando um micro motor DC (ajustada através da fonte de tensão variável): 1200 rpm (b), 1400 rpm (c), 1800 rpm (d) e 2200 rpm (e) da solução contida na célula BIA. Solução injetada: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF + $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF. Demais parâmetros experimentais iguais a Fig. 20.

Com a solução do interior da célula sob agitação, o pico transiente decresce rapidamente retornando à linha base e uma maior frequência analítica pode ser obtida. Sem agitação mecânica, o pico transiente decresce (retorna) lentamente a linha base e há uma diminuição da frequência analítica. Isto ocorre porque, sob agitação, ambos os compostos são rapidamente removidos da superfície do eletrodo. Além disso, o procedimento de limpeza eletroquímica é mais eficaz se a solução estiver sob convecção mecânica. A velocidade de agitação de 1200 rpm foi adotada nos demais estudos. Nesta condição, uma melhor repetibilidade foi obtida.

4.1.2.2.2. Volume e velocidade de injeção

Para o cálculo da corrente de oxidação da DIF no pulso de potencial de +1,80 V é necessário o uso do FC (equação 8), conforme descrito anteriormente. Adicionalmente, a análise somente é possível se o valor do FC for relativamente constante. Neste sentido, um estudo detalhado foi realizado para verificar a influência de parâmetros como volume injetado

e velocidade de injeção no valor do FC. Na Figura 23A e B são apresentadas as variações do FC em função da variação do volume e da velocidade de injeção, respectivamente.

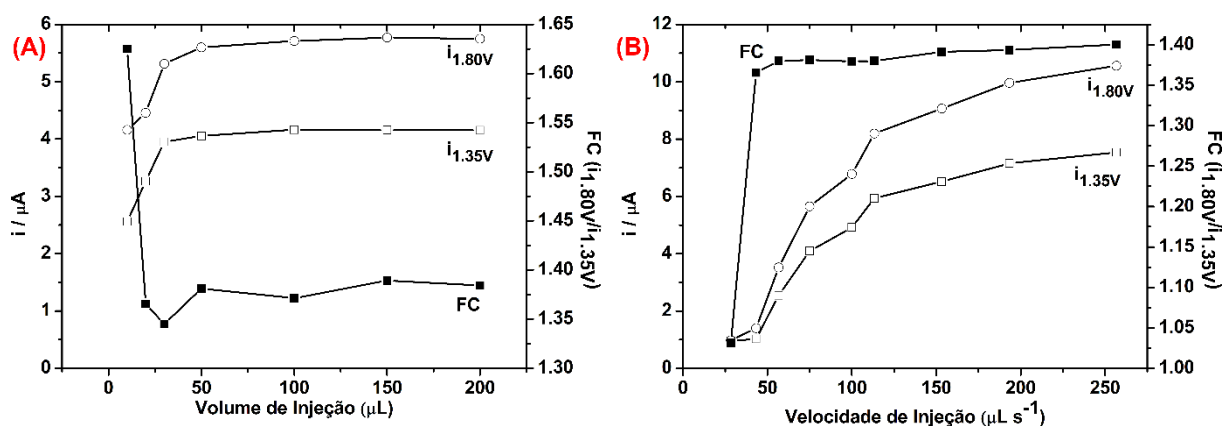


Figura 23. Variação da corrente de oxidação da CTF e do FC em função de: (A) volume injetado; (B) velocidade de injeção. Condições: Velocidade de injeção: $75 \mu\text{L s}^{-1}$ em (A); Volume injetado: $100 \mu\text{L}$ em (B); Concentração de CTF: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Demais parâmetros idem a Fig. 20.

Na Figura 23A podemos perceber que a corrente de oxidação da CTF aumenta nos dois pulsos de potenciais aplicados (+1,35 V e +1,80 V) até um volume injetado de $30 \mu\text{L}$. A partir 50 até $200 \mu\text{L}$, as correntes de oxidação da CTF nos dois pulsos de potenciais são praticamente constantes e, consequentemente, o FC também apresenta um valor constante ($1,381 \pm 0,003$). O volume de injeção de $150 \mu\text{L}$ foi adotado nos estudos seguintes.

Na Figura 23B é possível verificar que há um aumento nas correntes de oxidação da CTF nos pulsos de potenciais de +1,35 V e +1,80 V conforme aumenta a velocidade de injeção da solução contendo o analito. Isto ocorre devido ao aumento na taxa de transporte de massa por unidade de tempo para a superfície do eletrodo de trabalho. O sinal amperométrico não chegou a um valor máximo e constante, provavelmente, devido à elevada área do eletrodo de trabalho ($22,9 \text{ mm}^2$). As correntes de oxidação da CTF em +1,35 V e em +1,80 V aumentaram proporcionalmente na faixa de velocidade estudada e, portanto, o FC se manteve praticamente constante ($\text{FC} = 1,381 \pm 0,003$). A velocidade de injeção de $75 \mu\text{L s}^{-1}$ foi selecionada para a determinação simultânea de CTF e DIF.

A opção óbvia em relação ao volume e velocidade de injeção seria o uso de menor volume possível sem perda de sensibilidade (menor geração de resíduos) e de maior velocidade (análise mais rápida e maior sensibilidade). No entanto, na técnica de MPA, a taxa de aquisição de corrente também é um parâmetro a ser considerado. No método proposto, três pulsos de potenciais (+1,35 V/50 ms; +1,80 V/50 ms e 0,70 V/200 ms) são constantemente aplicados ao eletrodo de trabalho. Portanto, a aquisição de corrente ocorre a cada 300 ms em cada amperograma. Se o volume injetado for mínimo e a velocidade de injeção máxima, o número de vezes que a corrente será adquirida pode não ser o suficiente. Ou seja, na injeção sucessiva da mesma solução, a altura dos picos pode não ser reprodutível em função da aquisição de corrente. Desta forma, na opção pelo volume e velocidade de injeção, o número de vezes que a corrente é adquirida deve ser considerado. No presente trabalho, o volume de injeção foi aumentado ou a velocidade de injeção foi diminuída até que o número de aquisições de corrente fosse pelo de 3 vezes no ápice de cada pico transiente em cada amperograma.

4.1.2.3. Influência da concentração da CTF no FC

No desenvolvimento de um novo método analítico, estudos para identificação da faixa de concentração onde há uma relação linear entre concentração e o sinal do detector devem ser realizados. No entanto, o presente trabalho, além da identificação da faixa linear de resposta, também há a necessidade de identificar a faixa de concentração de CTF onde o FC é constante. O FC será usado para identificar a corrente de oxidação proveniente da DIF no pulso de potencial de +1,80 V ($i_{DIF} = i_{1,80V} - (FC \times i_{1,35V})$). A Figura 24 apresenta os valores de FC em função da variação na concentração de CTF.

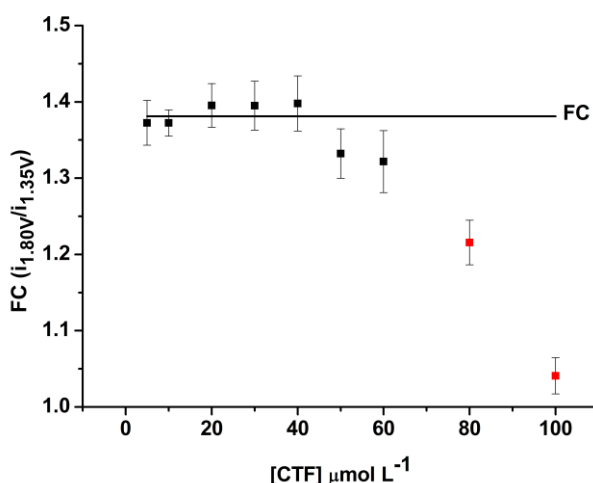


Figura 24. FC ($i_{\text{CTF } +1,80\text{V}} / i_{\text{CTF } +1,35\text{V}}$) calculados para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de CTF (5,0 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms; Eletrólito suporte: NaAc/HAc 0,05 mol L^{-1} ; Vazão: 75 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado: 150 μL .

Como pode ser observado na Figura 24, o FC apresenta um valor médio de $1,383 \pm 0,040$ (DPR = 3,6%) na faixa de concentração de 5 a 40,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF, o que pode ser considerado um valor relativamente constante. A partir de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF, esse valor começou a decrescer. Desta forma, na construção de uma curva de calibração, esta faixa de concentração deve ser respeitada para evitar erros na análise. Além disto, conforme também já foi constatado em trabalhos anteriores [38, 81], em toda curva de calibração sempre é aconselhável que uma solução contendo apenas CTF seja injetada no sistema BIA (obtenção do FC). Pequenas variações na superfície do eletrodo BDD decorrentes de pequenas diferenças nos procedimentos de pré-tratamento pode afetar o valor a ser usado como FC.

4.1.2.4. Estudo de repetibilidade do método

A estabilidade de resposta do eletrodo de BDD acoplado ao sistema BIA-MPA foi avaliada através de injeções sucessivas ($n=10$) de duas soluções contendo CTF+DIF em concentrações distintas: 10 + 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) e 30 + 30 (b) de CTF e DIF, respectivamente. Os

amperogramas obtidos neste estudo com a aplicação de somente dois pulsos de potenciais (1,35 V/50 ms e 1,80 V/50 ms) são apresentados na Figura 25.

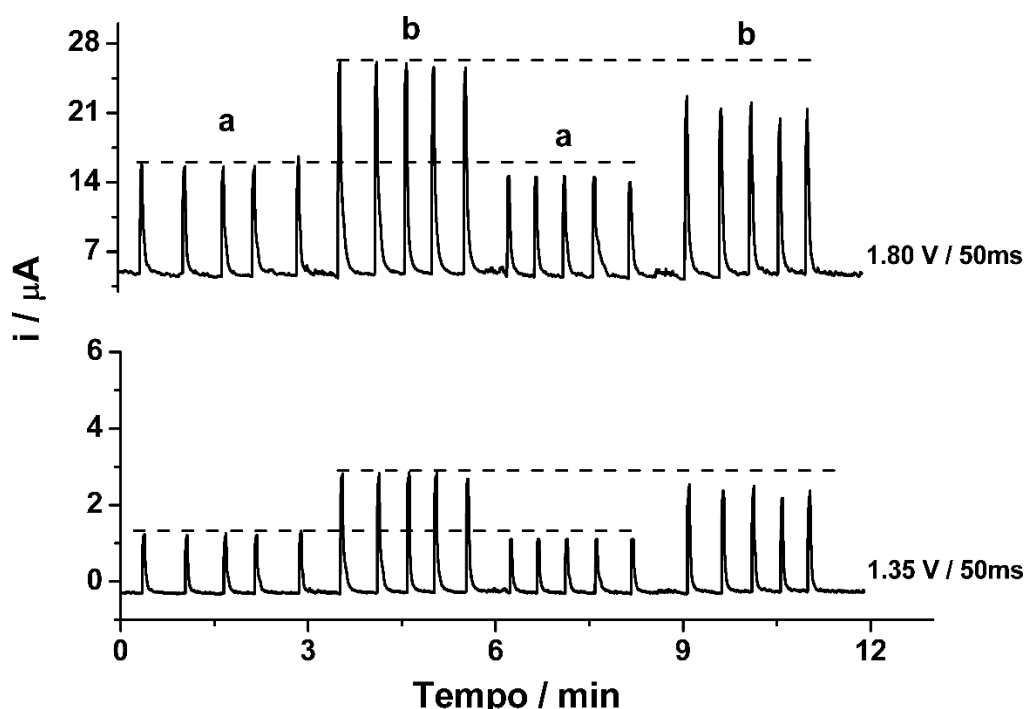


Figura 25. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de solução contendo 10 + 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) e 30 + 30 (b) de CTF e DIF, respectivamente ($n=10$). Para outras condições experimentais ver Fig. 24.

É notável que após 5 injeções da solução contendo concentrações mais altas no sistema, há uma diminuição na corrente de oxidação detectada, tanto no potencial de +1,35 V (oxidação de CTF), quanto no potencial de +1,80 V (oxidação de CTF e DIF). Em função disto, altos desvios padrões relativos foram calculados, tanto para a CTF ($a = 5,3\%$; $b = 5,5\%$; $n = 10$), quanto para a DIF usando o FC ($a = 5,8\%$; $b = 5,9\%$; $n=10$). Isto provavelmente se deve à contaminação e/ou passivação da superfície do eletrodo. Para contornar este problema foi selecionado um terceiro pulso de potencial para a constante limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho. A sequência dos pulsos de potenciais aplicados, portanto, ficou da seguinte maneira:

- (1) +1,35 V / 50 ms: oxidação e quantificação de CTF;
- (2) +1,80 V / 50 ms: para oxidação simultânea de CTF e DIF;

(3) 0,70 V / 200 ms: para constante limpeza da superfície do BDD.

Selecionado o pulso de potencial para a limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de BDD, o teste de repetibilidade foi repetido com o dobro de injeções e nas mesmas condições usadas na Figura 25. Os amperogramas obtidos neste estudo são apresentados na Figura 26.

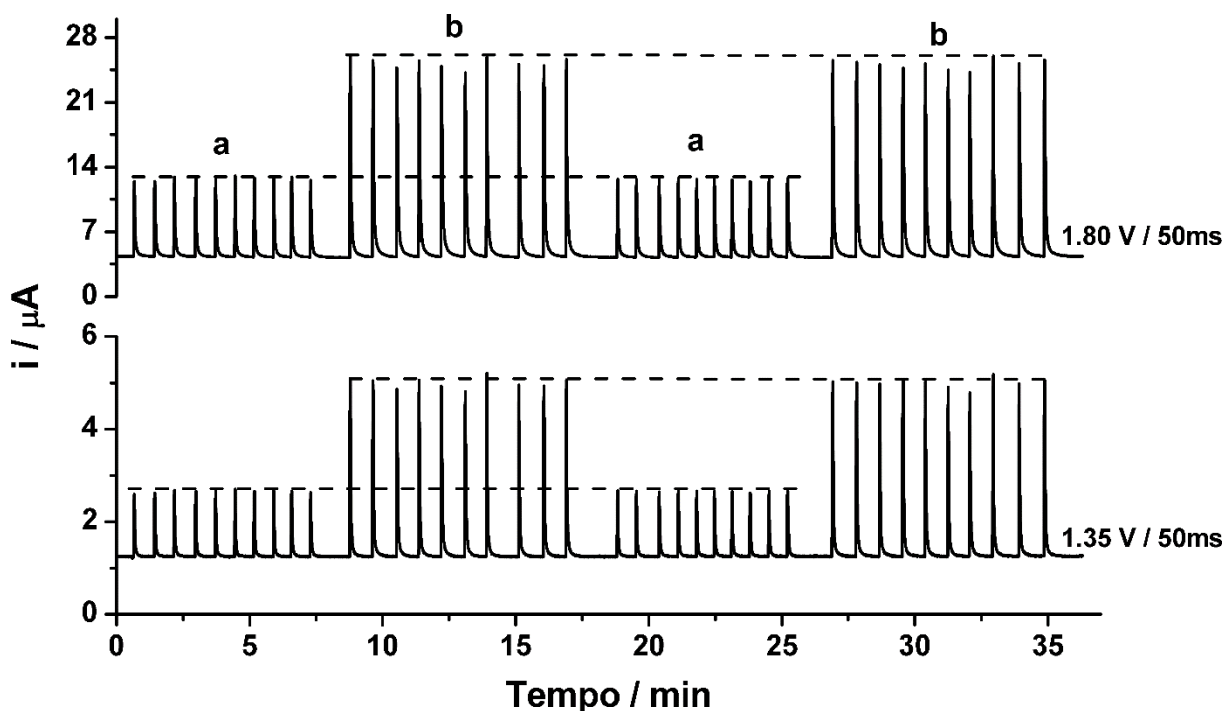


Figura 26. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo 10 + 10 μmol L⁻¹ (a) e 30 + 30 mol L⁻¹(b) de CTF e DIF, respectivamente (n = 20). O amperograma para o pulso de potencial 0,7 V / 200ms não foi registrado. Para outras condições experimentais ver Fig. 24.

Como podemos observar, a inclusão de um pulso de potencial de limpeza eletroquímica possibilitou a obtenção resultados satisfatórios, uma vez que a corrente de oxidação em ambos os pulsos de potenciais (+1,35 e +1,80 V) se mantiveram constantes e menores desvios padrões relativos foram alcançados 2,0% (a) e 2,8% (b) para CTF e 2,2% (a) e 2,7% (b) para DIF; n = 20, demonstrando um melhor desempenho do método após a inclusão do pulso de potencial de limpeza eletroquímico.

4.1.3. Aplicação do sistema BIA-MPA na análise simultânea de CTF e DIF em formulações farmacêuticas

O desempenho do método proposto foi avaliado na quantificação de CTF e DIF em formulações farmacêuticas comerciais contendo dimenidrinato. As curvas de calibração para ambos os compostos foram obtidas levando-se em consideração a faixa de concentração onde o fator de correção (FC) é constante (10 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$), e a proporção molar de concentração para DIM (1:1). A Figura 27 apresenta os amperogramas obtidos em +1,35 V e +1,80 V para injeções em triplicata de soluções em ordem crescente (a-e) e decrescente (e'-a') de concentração. Duas amostras de formulações farmacêuticas previamente diluídas no eletrólito suporte (1 e 2) e uma solução contendo somente CTF (cálculo do FC) também foram injetadas.

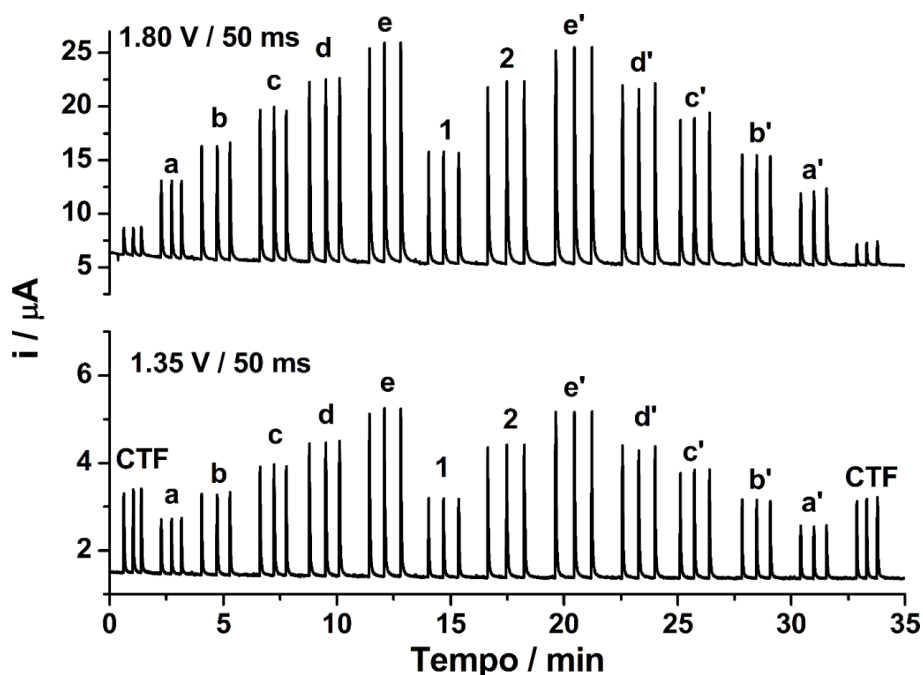


Figura 27. Amperogramas obtidos para injeções de uma solução contendo somente CTF (15 $\mu\text{mol L}^{-1}$), cinco soluções (a-e; e'-a') contendo simultaneamente CTF e DIF (10 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras adequadamente diluídas (1 e 2). Demais condições ver Fig. 24.

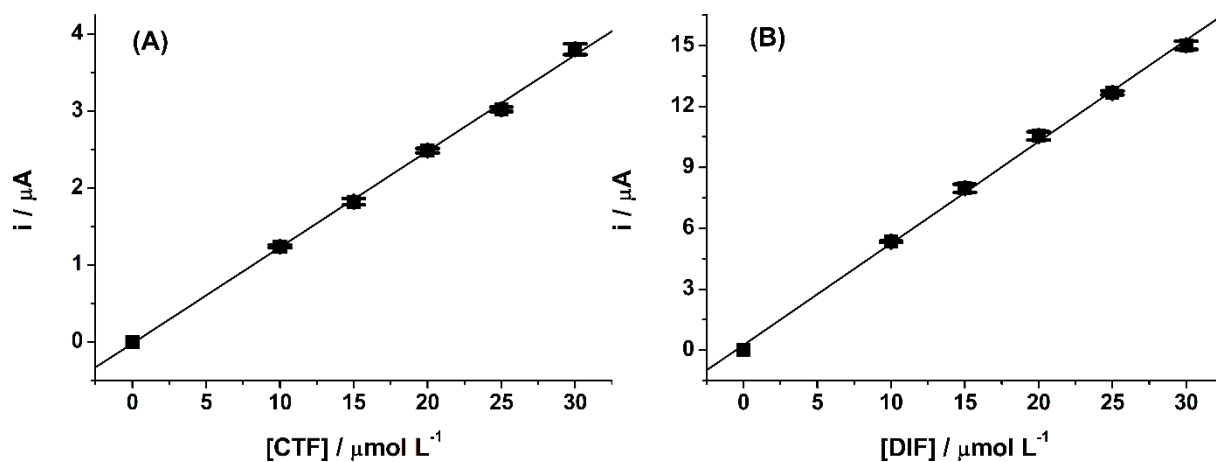


Figura 28. Curvas de calibração obtidas para CTF (A; $r = 0,999$) e DIF (B; $r = 0,999$) a partir dos dados analíticos da Fig. 27.

Pode ser observado que as soluções padrões injetadas em ordem crescente ou decrescente de concentração apresentaram respostas semelhantes, o que confirma que o fenômeno da contaminação do eletrodo ou efeito de memória está ausente, mesmo usando um eletrodo de trabalho sem modificação.

A precisão e a exatidão do método BIA-MPA proposto também foram avaliadas por testes de adição e recuperação utilizando amostras contendo CTF e DIF. A recuperação média foi de $99 \pm 2\%$ ($n = 3$) e de $100 \pm 3\%$ ($n = 3$) para a CTF e DIF, respectivamente. Com base nestes resultados, podemos afirmar que o método proposto não possui efeitos significativos de matriz para a determinação simultânea de CTF e DIF em formulações farmacêuticas. A Tabela 2 reúne as características analíticas do método proposto.

Tabela 2. Características analíticas do método proposto.

Características	CTF	DIF
r	0,999	0,999
Inclinação	0,124 ± 0,003	0,500 ± 0,008
Intercepto	-0,019 ± 0,05	0,248 ± 0,158
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,2	0,5
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	7,3	1,7
FA (injeções h^{-1})	70	70
Repetibilidade intra-dia (n=20)	2,4%	2,5%
Repetibilidade inter-dias (n=6)	2,6%	6,1%
Recuperação	99 ± 2%	100 ± 3%

Onde: r: coeficiente de correlação; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; FA: frequência analítica; Para: Intra-dia: comparações obtidas de sinais em injeções sucessivas e Inter-dias: comparações realizadas entre sinais de dias diferentes, resultados em desvio padrão relativo (DPR); Intervalo de confiança = 95%;

O método BIA proposto foi usado para determinar CTF e DIF em duas amostras de produtos farmacêuticos. Para comparação, as amostras de formulações farmacêuticas também foram analisadas por HPLC. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para a análise destas amostras com os respectivos desvios padrão (n = 3).

Tabela 3. Comparação dos resultados (média ± DP; n = 3) obtidos para a determinação de CTF e DIF em amostras farmacêuticas usando a metodologia proposta versus HPLC.

Amostras	Valor da bula		Valores encontrados			
	(mg / comp.)		(mg / comp.)			
	CTF	DIF	BIA-MPA		HPLC	
			CTF	DIF	CTF	DIF
1	45,7	54,3	45,3 ± 1,1	56,5 ± 0,5	49,8 ± 3,2	59,5 ± 1,9
2	45,7	54,3	45,1 ± 0,4	54,1 ± 0,5	45,3 ± 0,6	54,1 ± 0,6

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, não há diferenças significativas entre o método proposto (BIA-MPA) e o método de referência (HPLC), o que comprova a exatidão do método proposto. No nível de confiança de 95%, os valores do teste t calculados

foram menores do que o valor crítico teórico (2,78, $n = 3$), o que indica que não houve diferenças significativas entre os resultados.

4.1.4. Determinação rápida da estequiometria do sal de dimenidrinato

A partir dos resultados mostrados na Tabela 3, pode-se verificar a estequiometria do sal de DIM usado como matéria prima na produção do medicamento em questão. A estequiometria teórica definida entre CTF e DIF no sal de DIM é de 1:1 (proporção molar). Dessa forma, se a concentração molar encontrada é a mesma para os dois princípios ativos (DIF e CTF), pode-se concluir que o sal usado está estequiometricamente correto.

No entanto, o método proposto também permite obter informações precisas sobre a estequiometria do sal de DIM (como matéria prima ou em formulação comercial), sem a necessidade de quantificação de ambos, cátion (DIF) e ânion (CTF) e sem a necessidade de construção de curva de calibração. A estratégia proposta é usar a razão entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais utilizados no método proposto ($i_{+1,80 \text{ V}/50 \text{ ms}}$ e $i_{+1,35 \text{ V}/50 \text{ ms}}$). A Tabela 4 mostra os valores da razão calculados entre as correntes detectadas durante a aplicação dos dois pulsos de potenciais ($i_{+1,80 \text{ V}}/i_{+1,35 \text{ V}}$) a partir de injeções de soluções contendo diferentes proporções entre CTF e DIF (em concentração molar). Nesse estudo, as concentrações de todas as soluções injetadas estão dentro da faixa linear do método proposto.

Tabela 4. Razão ($i_{+1,80V}/i_{+1,35V}$) calculada a partir das correntes detectadas nos dois pulsos de potencial para determinação estequiométrica do sal de DIM.

Proporção (DIF:CTF)	$i_{+1,80V}$	$i_{+1,35V}$	$i_{+1,80V}/i_{+1,35V}$	Variação (%)
1,00:1,00 (DIM)	21,9	4,3	$5,1 \pm 0,05$	-
0,71:1,29	17,6	4,9	$3,6 \pm 0,03$	-28,3
0,83:1,17	18,3	4,7	$3,9 \pm 0,03$	-25,2
0,92:1,08	18,5	4,5	$4,1 \pm 0,04$	-18,6
1,02:0,98	22,0	4,2	$5,2 \pm 0,05$	+2,0
1,11:0,89	22,9	4,0	$5,7 \pm 0,06$	+11,8

Os resultados mostrados na Tabela 4 mostram que a estequiometria do sal de DIM pode ser facilmente verificada pela injeção de 150 μ L de uma solução de amostra no sistema BIA-MPA. Pequenas variações na estequiometria do sal podem ser detectadas rapidamente sem a necessidade de uma curva de calibração para a quantificação do ânion (CTF) e do cátion (DIF) que compõe o sal.

Adicionalmente, a razão obtida entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais ($i_{+1,80V}/i_{+1,35V}$) também permite obter informações sobre a presença ou ausência de outros compostos eletroativos com o sal DIM. A Tabela 5 mostra as razões das correntes calculadas quando injeções contendo somente DIM e DIM com presença de outras espécies que também são eletroativas nas condições experimentais do método proposto (piridoxina, cafeína, furosemida e amilorida).

Tabela 5. Razão ($i_{+1,80V}/i_{+1,35V}$) calculada com correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais a partir das injeções contendo DIM sem e com a presença de outros compostos eletroquimicamente ativos.

Interferente	Quant. Adicionada (%; m/m)	Razão ($i_{1,80V} / i_{1,35V}$)	Variação (%)
(sem interferente)	0	$5,10 \pm 0,05$	-
Piridoxina	2,5	$4,96 \pm 0,05$	-2,9
	5,0	$4,72 \pm 0,05$	-7,4
	10,0	$4,34 \pm 0,05$	-15,0
	2,5	$4,92 \pm 0,05$	-3,7
Cafeína	5,0	$4,83 \pm 0,05$	-5,4
	10,0	$4,54 \pm 0,06$	-10,9
	2,5	$5,02 \pm 0,06$	-1,4
Furosemida	5,0	$4,96 \pm 0,05$	-2,8
	10,0	$4,88 \pm 0,05$	-4,1
	2,5	$5,10 \pm 0,05$	0,0
Amilorida	5,0	$5,04 \pm 0,05$	-1,1
	10,0	$4,84 \pm 0,06$	-5,0
Amido	10,0	$5,09 \pm 0,04$	-0,2

Como pode ser observado, a presença de uma pequena quantidade (2,5%; m/m) de certos compostos eletroativos no sal de DIM pode ser facilmente detectada pela variação na razão entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais ($i_{+1,80V}/i_{+1,35V}$). A sensibilidade não é a mesma para todos os compostos, pois é possível detectar a presença de 2,5% de piridoxina, cafeína e furosemina, porém, a presença de amilorida foi detectada somente em concentrações superiores a 5%.

É importante salientar que a razão aqui proposta é diferente do FC usado na curva de calibração. A razão aqui obtida é referente a injeções contendo DIM (CTF + DIF), enquanto que para o cálculo do FC, injeções contendo somente CTF são necessárias. Além disto, essa estratégia somente funciona na presença de compostos eletroativos, na presença de compostos

eletroquimicamente inativos nas condições experimentais do método proposto, como o amido, por exemplo, o valor da razão não é alterado (Tabela 5).

4.2. Aplicação do sistema BIA-MPA para a determinação simultânea de três princípios ativos.

4.2.1. Estudos para determinação simultânea de CTF, PIR e DIF.

4.2.1.1. Comportamento eletroquímico de CTF, PIR e DIF

Quando um medicamento contendo o DIM é indicado para o controle de náuseas e vômitos em mulheres grávidas ou crianças, um terceiro princípio ativo é normalmente adicionado concomitante a formulação farmacêutica, a PIR (vitamina B6). Devido a isto, estudos foram realizados com o objetivo de verificar se o método desenvolvido para determinação simultânea de CTF e DIF poderia ser adaptado para determinação simultânea de DIM e PIR ou de CTF, DIF e PIR.

Inicialmente, o comportamento eletroquímico da PIR foi estudado em meio de tampão NaAc/HAc 0,05 mol L⁻¹ (pH 4,7). Neste meio, a PIR apresentou pico de oxidação muito próximo ao pico de oxidação da CTF e, portanto, a determinação simultânea de CTF e PIR não foi possível nesta condição. Em função disto, o comportamento eletroquímico dos três compostos objetos de estudo (CTF, DIF e PIR) também foram estudados em outros pHs e eletrólitos: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ (pH = 1,0) e tampões fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,1 e 7,2). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 29.

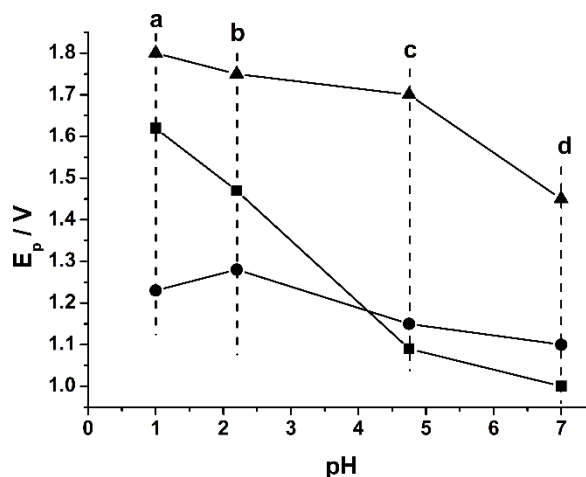


Figura 29. Separação entre os potenciais de oxidação estimados para CTF (●), PIR (■) e DIF (▲) em eletrólitos de diferentes pHs (H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 1,0), tampão NaAc/HAc $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7) e tampões fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,1 e 7,2).

Pode-se observar que somente existe boa separação entre os três potenciais de oxidação dos três compostos em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Nos demais meios estudados verifica-se um deslocamento do potencial de oxidação da PIR para potenciais mais próximos ao da oxidação da CTF. Desse modo, ficou definido que o melhor meio para a determinação simultânea de CTF, PIR e DIF é H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 30 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo 1 mmol L^{-1} de CTF ou de PIR ou de DIF em meio H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

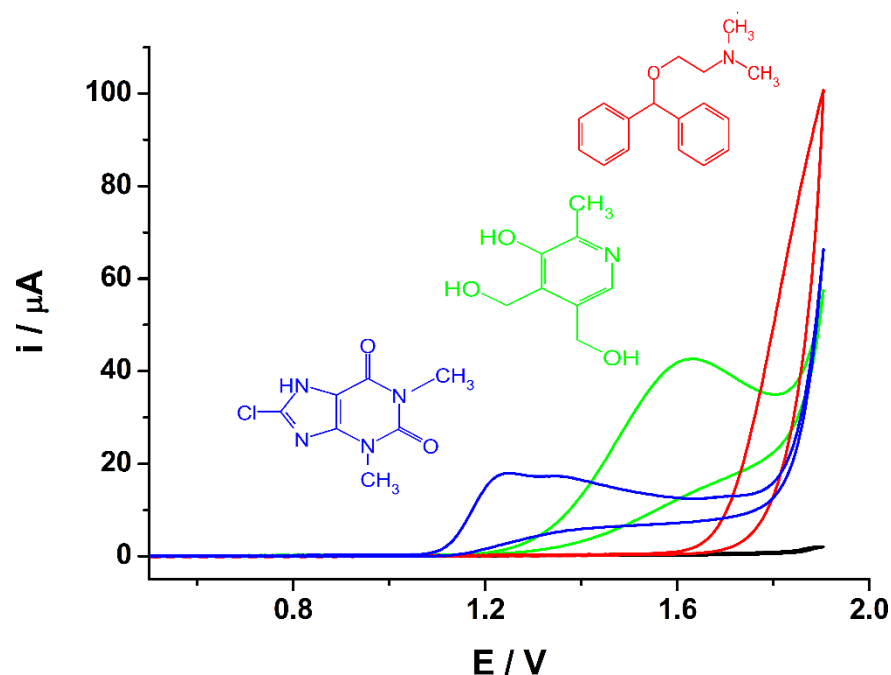


Figura 30. Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ sem (—) e com a presença de 1 mmol L⁻¹ de CTF (—), 1 mmol L⁻¹ de PIR (—) e 1 mmol L⁻¹ de DIF (—). ET: BDD. Velocidade de varredura = 50 mV s⁻¹.

Como pode ser observado, há uma boa separação entre os picos de oxidação da CTF (+1,2 V), PIR (+1,6 V) e DIF (+1,8 V). Neste meio, o pico de oxidação da DIF também é mal definido devido à proximidade com a região de oxidação da água. O comportamento eletroquímico da CTF e DIF já foi discutido anteriormente neste trabalho. A oxidação da PIR apresenta características irreversíveis com um pico bem definido em +1,6V. O mecanismo de oxidação da PIR foi descrito anteriormente [120] e sugere que o composto piridoxal (3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridina-4-carbaldeído) é o único produto de oxidação (Figura 31).

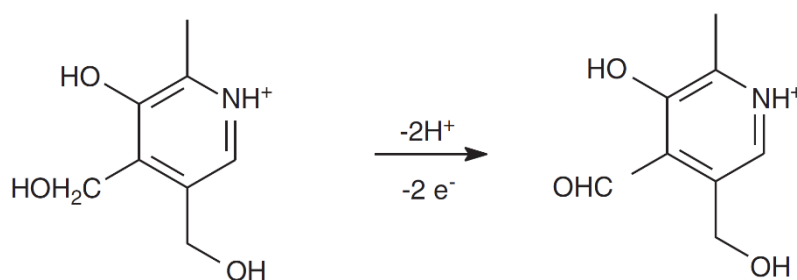


Figura 31. Esquema da reação de oxidação eletroquímica da PIR [120].

Estudos em condições hidrodinâmicas para avaliar o comportamento eletroquímico da CTF, PIR e DIF no sistema BIA em meio H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ também foram realizados. Neste estudo, dez pulsos de potenciais (+0,9; +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5; +1,6; +1,7 e +1,8 V; 70 ms cada) foram aplicados continuamente ao eletrodo de trabalho de BDD posicionado na célula BIA. A corrente de cada pulso de potencial foi continuamente monitorada durante três injeções sequenciais de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF, $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR e $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF. A corrente de pico detectada em cada pulso de potencial foi usada na construção do voltamograma hidrodinâmico para oxidação dos três princípios ativos. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 32.

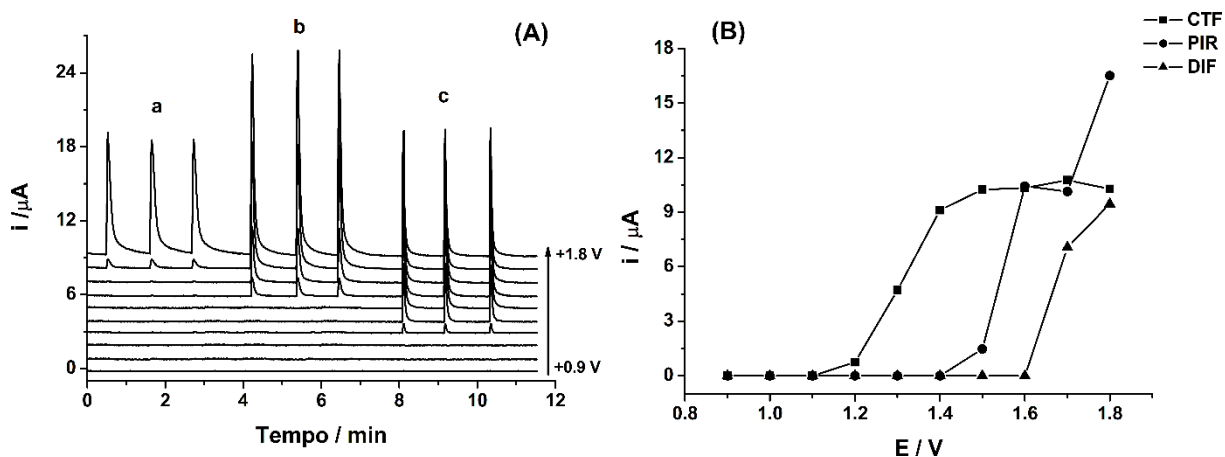


Figura 32. (A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF (a), PIR (b) e DIF (c). (B) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para CTF (■), PIR (●) e DIF (▲). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 70 ms; Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; Velocidade de injeção: $75 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado: $150 \text{ } \mu\text{L}$.

Nas condições hidrodinâmicas (BIA-MPA), a oxidação da CTF no meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ se inicia em torno de $+1,2 \text{ V}$ e atinge um valor máximo de corrente próximo de $+1,5 \text{ V}$. As oxidações da PIR e DIF se iniciam por volta de $+1,5$ e $1,7 \text{ V}$, respectivamente. Nestas condições, a região de potencial onde a corrente é máxima não ficou bem definido para ambas os compostos (PIR e DIF).

Com base nos resultados apresentados nas Figuras 32A e 32B, os seguintes pulsos de potenciais foram selecionados para determinação simultânea de CTF, PIR e DIF:

$+1,25 \text{ V}/50 \text{ ms}$: oxidação de CTF sem a interferência da PIR e da DIF;

$+1,60 \text{ V}/50 \text{ ms}$: oxidação de CTF e PIR, sem a interferência da DIF;

$+1,80 \text{ V}/50 \text{ ms}$: oxidação de todos os compostos (CTF, PIR e DIF);

$+1,0 \text{ V}/150 \text{ ms}$: limpeza eletroquímica do eletrodo de BDD.

A Figura 33A apresenta o esquema de aplicação dos pulsos de potenciais e a Figura 33B os amperogramas adquiridos em $+1,25 \text{ V}$, $+1,60 \text{ V}$ e $+1,80 \text{ V}$ para injeções ($n = 3$) no sistema BIA-MPA de soluções contendo somente DIF, PIR e CTF e uma solução contendo a mistura DIF + PIR + CTF na mesma proporção encontrada no medicamento.

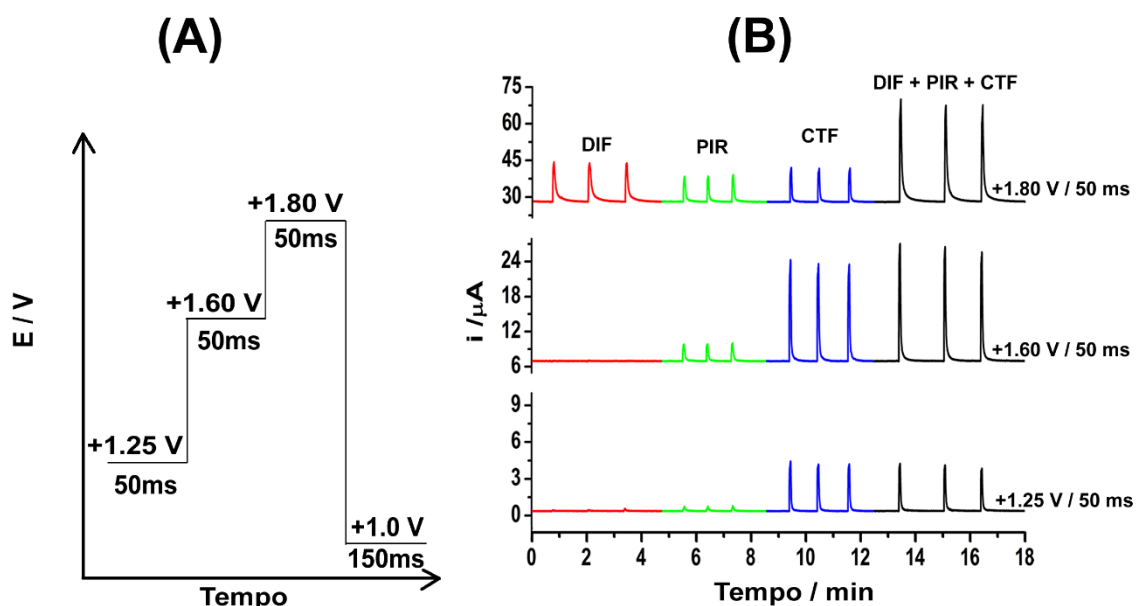


Figura 33. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD posicionado no sistema BIA-MPA. (B) Amperogramas obtidos para injeções de soluções

contendo: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF; $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR; $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF e solução contendo a mistura de DIF, PIR e CTF nas mesmas concentrações anteriores. Demais condições: conforme Fig. 32.

A partir dos amperogramas da Figura 33B, pode ser visto que apenas a CTF é oxidada em +1,25 V. Além disto, a corrente detectada para CTF é a mesma, na presença ou ausência dos outros princípios, indicando que não há interação química da CTF com PIR ou DIF ou com os produtos de oxidação gerados.

Em +1,60 V, tanto a CTF como a PIR são oxidadas e na injeção da solução contendo todos os analitos (CTF + PIR + DIF), a corrente de oxidação em +1,60 V ($19,5 \mu\text{A}$) corresponde à soma das correntes individuais detectadas para soluções contendo somente CTF ($16,3 \mu\text{A}$) ou somente PIR ($3,2 \mu\text{A}$) em +1,60 V.

Em +1,80 V, os três compostos são oxidados. Na injeção da solução contendo todos os analitos (CTF + PIR + DIF), a corrente de oxidação em +1,80 V ($39,1 \mu\text{A}$) corresponde à soma das correntes individuais detectadas para soluções contendo somente CTF ($13,1 \mu\text{A}$) ou somente PIR ($10,6 \mu\text{A}$) ou somente DIF ($15,4 \mu\text{A}$), em +1,80 V.

Adicionalmente, dois fenômenos podem ser observados:

(1) a oxidação da CTF não apresenta a mesma magnitude de corrente nos três pulsos de potenciais (+1,25; 1,60 e +1,80 V);

(2) a oxidação da PIR não apresenta a mesma magnitude de corrente em 1,60 e +1,80 V.

Assim, quando uma solução contendo os três compostos é injetada, o uso de uma subtração simples da corrente detectada em 1,25 V (oxidação da CTF) não dá acesso à corrente de oxidação relacionada somente com a PIR em 1,60 V. De forma similar, quando uma solução contendo os três compostos é injetada, o uso de uma subtração simples da corrente detectada em 1,25 V (oxidação da CTF) e em 1,60 V (oxidação da PIR) não dá acesso à corrente de oxidação relacionada somente com a DIF em 1,80 V.

Nesse caso, este problema novamente foi contornado através do uso de fatores de correção (FCs). O cálculo de três fatores de correção (FC_1 , FC_2 e FC_3) foi necessário [23]. Os dois primeiros FCs (FC_1 , FC_2) foram obtidos mediante a injeção no sistema BIA-MPA de solução contendo apenas CTF (equação 10 e 11):

$$FC_1 = i_{CTF+1,60V} / i_{CTF+1,25V} \quad (10)$$

$$FC_2 = i_{CTF+1,80V} / i_{CTF+1,25V} \quad (11)$$

O terceiro FC (FC_3) foi obtido mediante a injeção no sistema BIA-MPA de solução contendo apenas PIR (equação 12):

$$FC_3 = i_{PIR+1,80V} / i_{PIR+1,60V} \quad (12)$$

Quando uma solução contendo uma mistura dos três compostos é injetada, as correntes relacionadas com CTF, PIR e DIF são obtidas da seguinte forma:

$$I_{CTF} = i_{+1,25V} \quad (13)$$

$$I_{PIR} = i_{+1,60V} - (FC_1 \times i_{+1,25V}) \quad (14)$$

$$I_{DIF} = i_{+1,80V} - (FC_3 \times I_{PIR em +1,60V}) - (FC_2 \times i_{+1,25V}) \quad (15)$$

4.2.1.2. Influência da concentração da CTF e PIR nos FCs

Com a mudança do meio (eletrólito) e da escada de pulsos de potenciais utilizada, um novo estudo da variação do FC em função da variação na concentração foi realizado. Nestes estudos, parâmetros com volume (150 μL) e velocidade de injeção (75 $\mu\text{L s}^{-1}$), assim como velocidade de agitação (1200 rpm) foram mantidas conforme otimizações realizadas na determinação simultânea de CTF e DIF (estudo anterior). É importante frisar aqui que o método proposto é robusto em relação a estes parâmetros. Variações na ordem de até $\pm 30\%$ em cada um destes parâmetros não devem mudar significativamente os resultados a serem obtidos. De fato, o importante é que estes parâmetros permaneçam constantes durante todo o experimento. A influência da concentração foi estudada nos fatores de correção FC_1 e FC_2 com a variação da

concentração de CTF e no fator de correção FC_3 com a variação da concentração de PIR. A Figura 34 apresenta os resultados obtidos.

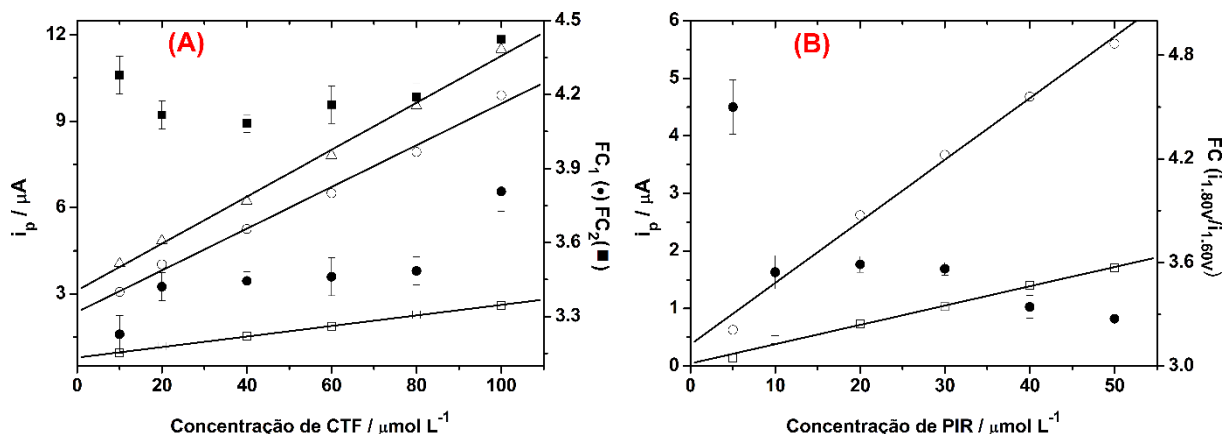


Figura 34. (A) Curvas de calibração obtidas para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de CTF (10,0 a 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) nos potenciais de + 1,25 V (□), 1,60 V (○) e +1,80 V (Δ). $FC_1 = i_{\text{CTF}+1,60\text{V}} / i_{\text{CTF}+1,25\text{V}}$ (●); $FC_2 = i_{\text{CTF}+1,80\text{V}} / i_{\text{CTF}+1,25\text{V}}$ (■). (B) Curvas de calibração obtidas para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de PIR (5,0 a 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) nos potenciais + 1,60 V (□), 1,80 V (○). $FC_3 = i_{\text{PIR}+1,80\text{V}} / i_{\text{PIR}+1,60\text{V}}$ (●). Demais condições: conforme Fig. 32.

Segundo os dados apresentados na Figura 34A, a CTF apresenta um comportamento linear na faixa de concentração entre 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nos pulsos de potenciais de +1,25 V (□; $R = 0,999$), +1,60 V (○; $R = 0,996$) e +1,80 V (Δ; $R = 0,998$). Os FC s apresentaram um valor médio de $3,45 \pm 0,01$ (FC_1) e $4,13 \pm 0,02$ (FC_2) na faixa de concentração entre 20,0 e 60,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os DPR foram calculados em 0,4 e 0,6 % para o FC_1 e FC_2 , respectivamente. Estes valores são relativamente constantes e podem ser considerados satisfatórios. DPR maiores seriam obtidos se a faixa de concentração integral fosse usada.

Segundo os dados apresentados na Figura 34B, a PIR apresenta um comportamento linear na faixa de concentração entre 5,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tanto no pulso de potencial de +1,60 V (○; $R = 0,996$) como no pulso de potencial de +1,80 V (Δ; $R = 0,996$). O FC_3 é relativamente constante no intervalo de concentração entre 10,0 a 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($FC_3 = 3,56 \pm 0,01$, DPR = 0,4%). Se a faixa de concentração integral for utilizada (5,0 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$), DPRs maiores

seriam obtidos. Devido a isto, em ambos os casos optamos em trabalhar com faixa linear de concentração menor.

Portanto, considerando estes resultados, foram definidas as seguintes faixas de concentração para construção das curvas de calibração: 20,0 a 60,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para CTF e DIF e, de 10,0 a 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para PIR. A faixa de trabalho onde os *FCs* apresentam valores relativamente constantes coincide com a proporção encontrada entre os princípios ativos em formulações farmacêuticas comerciais. Nos medicamentos, a proporção entre DIM e PIR é de aproximadamente 2:1 (proporção molar). Da mesma forma que para a análise de CTF e DIF, deve-se sempre injetar uma solução contendo apenas CTF e outra contendo PIR para a obtenção do FC durante a construção da curva analítica.

4.2.1.3. Estudo de repetibilidade do método

Estudos preliminares também demonstraram que o uso de um pulso de potencial para constante limpeza eletroquímica do eletrodo de BDD também melhorava o desempenho do método proposto. Nessas condições, o teste de repetibilidade foi realizado com a injeção sucessiva ($n = 20$) de soluções contendo simultaneamente os três compostos em duas concentrações diferentes (teste de efeito de memória). Os amperogramas obtidos são apresentados na Figura 35.

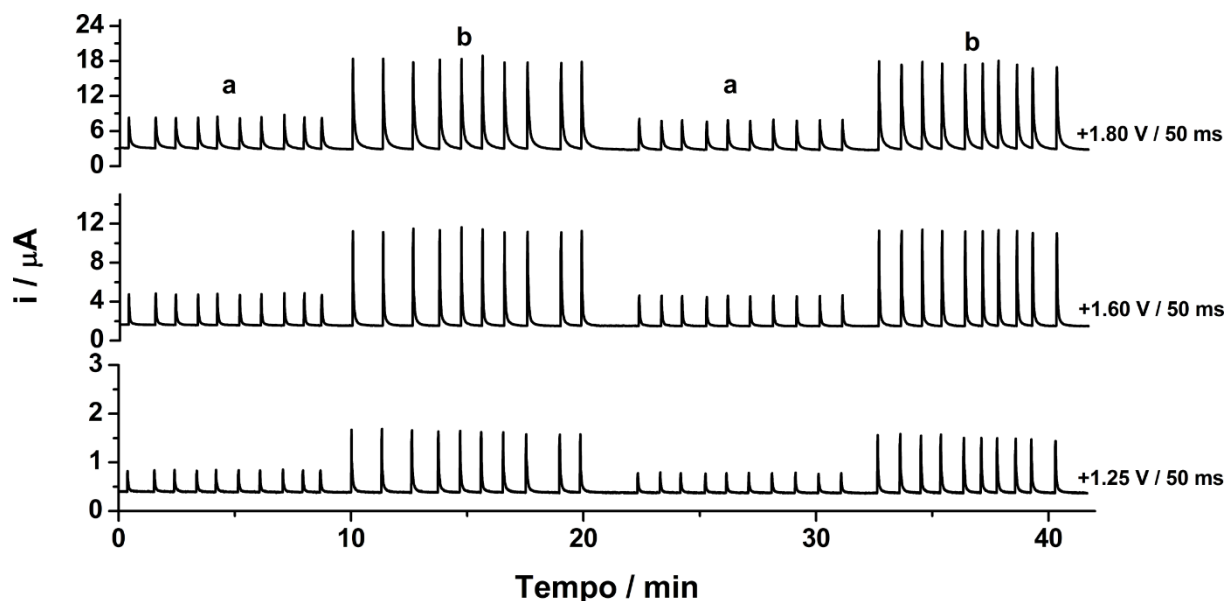


Figura 35. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas ($n=20$) de soluções contendo $20 + 20 + 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) ou $60 + 60 + 30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b) de CTF, DIF e PIR, respectivamente. O amperograma para o pulso de potencial $1,0 \text{ V} / 150\text{ms}$ não foi registrado. Demais condições experimentais ver Fig. 32.

O método demonstrou um bom desempenho, uma vez que as correntes de oxidação detectadas nos três pulsos potenciais ($+1,25$, $+1,60$ e $+1,80 \text{ V}$) se mantiveram constantes e baixos desvios padrões relativos foram alcançados ($n=20$):

- CTF: $1,3 \%$ (a) e $0,5 \%$ (b) (em $1,25 \text{ V}$);
- PIR: $2,0 \%$ (a) e $1,1 \%$ (b) (em $1,60\text{V}$, utilizando FC_1);
- DIF: $1,9 \%$ (a) e $1,2 \%$ (b) (em $+1,80 \text{ V}$, usando FC_2 e FC_3).

4.2.1.4. Análise simultânea de CTF, PIR e DIF em formulações farmacêuticas.

O método proposto foi avaliado com análise de formulações farmacêuticas comerciais contendo simultaneamente CTF, PIR e DIF. Medicamentos contendo dimenidrinato associado à piridoxina (Dramin B6 e Dramavit B6) são indicados no tratamento de náuseas e enjoos, principalmente em mulheres grávidas e crianças. As curvas de calibração para ambos os compostos foram obtidas levando-se em consideração a faixa de concentração onde os fatores

de correção (*FCs*) são constantes (10 a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ para PIR e de 20 a $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ para CTF e DIF) e a proporção molar de concentração existente entre DIM e PIR (2:1). A Figura 36 mostra os amperogramas obtidos em $+1,25 \text{ V}$, $+1,60 \text{ V}$ e $+1,80 \text{ V}$ para injeções em triplicata de soluções em ordem crescente (c-g) e decrescente (g-c) de concentração. Foram injetadas também duas amostras de formulações farmacêuticas comerciais previamente diluídas em eletrólito suporte (1 e 2), uma solução padrão contendo somente PIR (a) e outra contendo somente CTF (b). As soluções padrão contendo somente PIR ou CTF foram usadas para cálculo dos *FCs*.

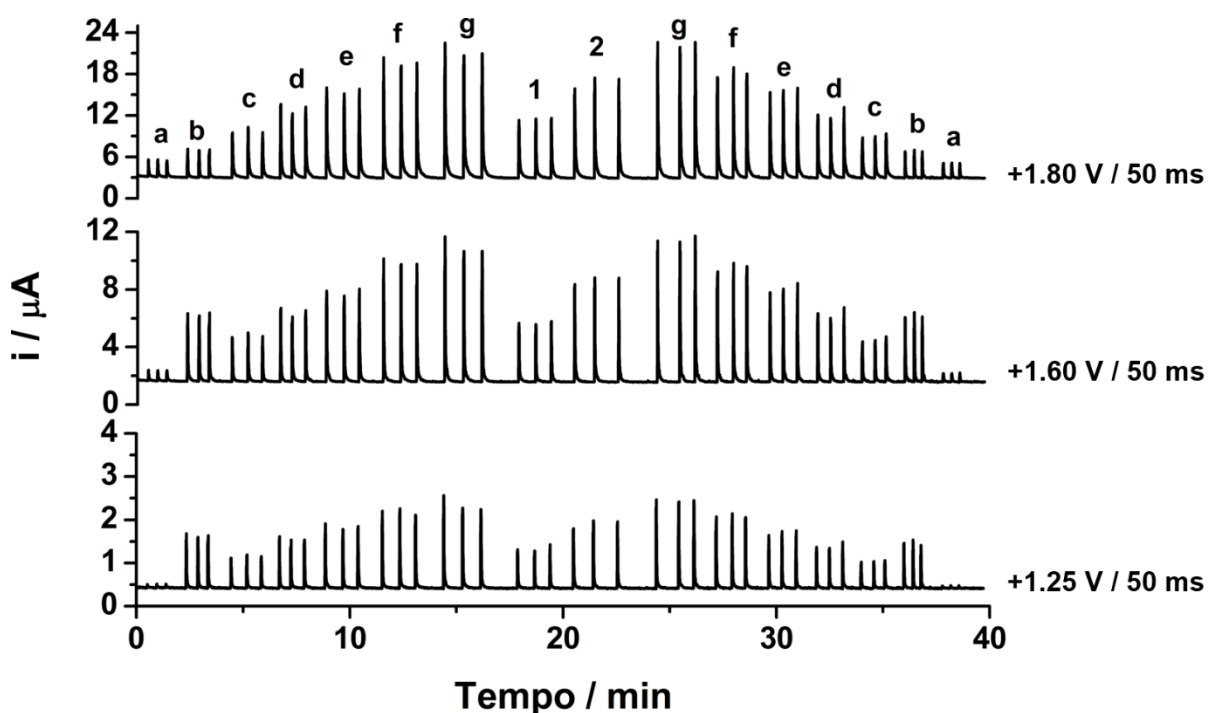


Figura 36. Amperogramas obtidos para injeções de uma solução contendo somente CTF ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$) (a), somente PIR ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$), cinco soluções (b-g) contendo simultaneamente CTF, DIF ($20 - 60 \mu\text{mol L}^{-1}$) e PIR ($10 - 30 \mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras adequadamente diluídas (1 e 2) em eletrólito suporte. Demais condições experimentais ver Fig. 32.

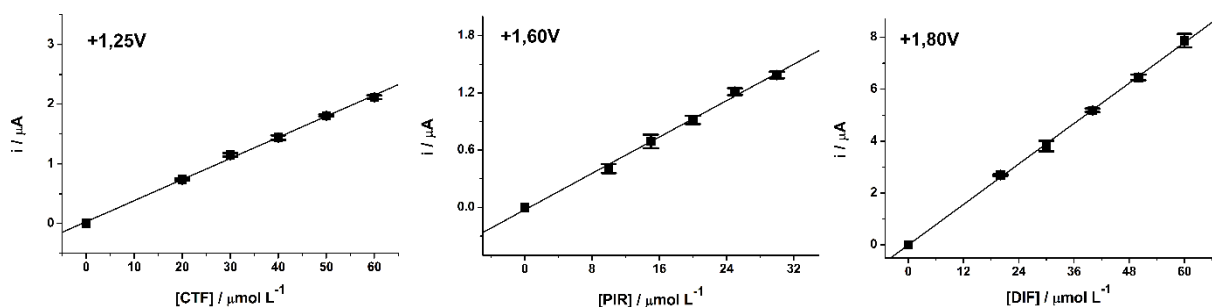


Figura 37. Curvas de calibração obtidas para CTF, PIR e DIF a partir de dados da Fig. 36.

As soluções padrões injetadas em ordem crescente ou decrescente apresentaram respostas semelhantes, o que confirma que o fenômeno da contaminação do eletrodo ou efeito de memória está ausente. O excelente desempenho obtido pode ser atribuído a três fatores: (1) possibilidade de uso de pulso de potencial de limpeza, (2) constante agitação da solução da solução no interior da célula e, (3) resistência à contaminação do eletrodo de trabalho utilizado (BDD). A Tabela 6 reúne características analíticas do método proposto.

Tabela 6. Características analíticas do método proposto.

Características	CTF	PIR	DIF
r	0,999	0,999	0,999
Inclinação	$0,034 \pm 0,0006$	$0,045 \pm 0,001$	$0,125 \pm 0,002$
Intercepto	$-0,001 \pm 0,02$	$-0,003 \pm 0,02$	$0,057 \pm 0,06$
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,19	0,54	0,18
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,63	1,81	0,60
FA (h^{-1})	60	60	60
Repetibilidade intra-dia (n= 20)	0,9%	1,5%	1,5%
Repetibilidade inter-dias (n=6)	5,7%	4,2%	5,1%

Onde: r: coeficiente de correlação; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; FA: frequência analítica; Para: Intra-dia: comparações obtidas de sinais em injeções sucessivas e Inter-dias: comparações realizadas entre sinais de dias diferentes, resultados em desvio padrão relativo (DPR); Intervalo de confiança = 95%;

Para comparação com o método de BIA-MPA, as amostras farmacêuticas também foram analisadas por HPLC. A Tabela 7 mostra os resultados obtidos na análise destas amostras com os respectivos desvios padrões ($n = 3$).

Tabela 7. Comparação dos resultados (média \pm DP; $n = 3$) obtidos para a determinação de CTF, PIR e DIF em amostras farmacêuticas usando a método proposto *versus* HPLC.

Amostras		Valor Bula (mg / comp.)	BIA-MPA	HPLC
1	CTF	11,4	$10,4 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,2$
	PIR	5,0	$4,3 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$
	DIF	13,6	$13,1 \pm 0,2$	$12,8 \pm 0,2$
2	CTF	11,4	$10,6 \pm 0,1$	$10,6 \pm 0,2$
	PIR	5,0	$4,3 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,1$
	DIF	13,6	$12,8 \pm 0,2$	$12,7 \pm 0,2$

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, podemos afirmar que os resultados obtidos com o método proposto (BIA-MPA) e o método de referência (HPLC) são similares, o que comprova a exatidão do método proposto. A um nível de confiança de 95%, os valores do teste t calculados foram menores do que o valor crítico teórico (2,78, $n = 3$), o que indica que estatisticamente não houve diferenças significativas entre os resultados encontrados.

4.2.2. Estudos para determinação simultânea de CTF, CAF e DIF.

4.2.2.1. Comportamento eletroquímico de CTF, CAF e DIF

No mercado internacional, DIM também é comercializado em alguns medicamentos na presença de CAF. Em função disto, estudos também foram realizados com o intuito de adaptar o método desenvolvido para determinação simultânea de CTF e DIF para a determinação simultânea destes três compostos (CTF, CAF e DIF).

Inicialmente, testes usando voltametria cíclica foram realizados utilizando o eletrodo de BDD em meio de tampão NaAc/HAc 0,05 mol L⁻¹ pH 4,7, o mesmo utilizado na determinação simultânea de CTF e DIF. A Figura 38 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo 1 mmol L⁻¹ de CTF, CAF e DIF.

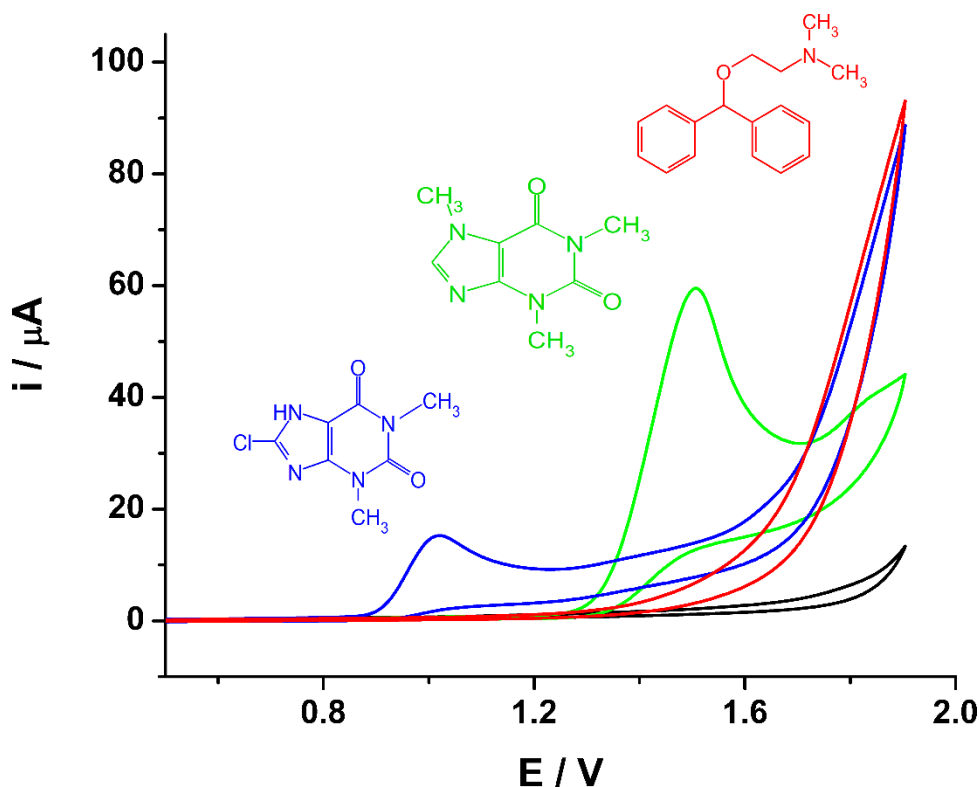


Figura 38. Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de NaAc/HAc 0,05 mol L⁻¹ sem (—) e com a presença de (—) 1 mmol L⁻¹ de CTF, (—) 1 mmol L⁻¹ de CAF e (—) 1 mmol L⁻¹ de DIF. ET: BDD. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

A partir da Figura 38 pode-se concluir que o método desenvolvido pode ser adaptado para a inclusão da CAF na determinação simultânea juntamente com CTF e DIF. Existe uma boa separação (> 200 mV) entre os picos de oxidação da CTF (+1,1 V) e CAF (+1,4 V) e com a região de potencial onde ocorre o início da oxidação da DIF (acima de +1,6 V). O mecanismo de oxidação eletroquímica da CAF, que também é um derivado da xantina já foi estudado anteriormente empregando o eletrodo de BDD como eletrodo de trabalho [17, 81, 94]. Como descrito nestes trabalhos, o mecanismo de oxidação eletroquímica da CAF também é similar à xantina. Inicialmente, a CAF é oxidada a 8-oxi-cafeína envolvendo 2H⁺ e 2e⁻ e, posteriormente, a 8-oxi-cafeína também é oxidada a um 4,5-diol com estrutura análoga a do ácido úrico (4,5-

diidrox-1,3,7-trimetiltetraidro-1H-purina-2,6,8-triona e 4,5-diidrox-1,7,9-trimetiltetraidro-1H-purina-2,6,8-triona) envolvendo novamente 2H^+ e 2e^- . A Figura 39 apresenta o mecanismo de reação global da CAF.

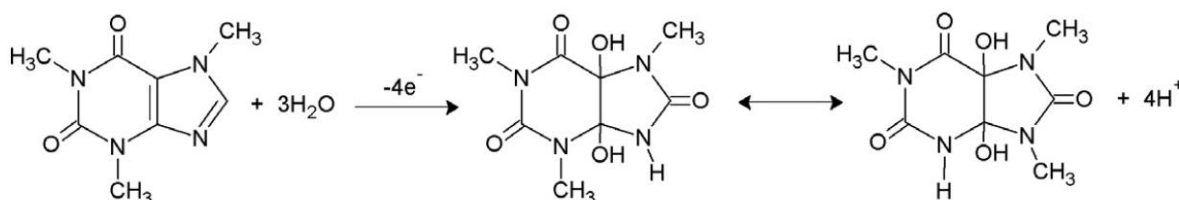


Figura 39. Esquema da reação global de oxidação eletroquímica da CAF [17].

Em seguida, os voltamogramas hidrodinâmicos para as três espécies também foram obtidos utilizando o sistema BIA-MPA. Este estudo foi similar ao realizado anteriormente para avaliar o comportamento eletroquímico da CTF, CAF e DIF. Dez pulsos de potenciais, (+0,8; +0,9; +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5; +1,6; +1,7 V; 70 ms cada) foram aplicados continuamente ao eletrodo de trabalho de BDD posicionado no sistema BIA. A corrente em cada pulso de potencial foi continuamente monitorada durante três injeções de soluções contendo somente $100\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF (\blacktriangle), somente $100\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF (\bullet) e somente $100\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF (\blacksquare). A corrente de pico detectada em cada pulso de potencial foi usada na construção do voltamograma hidrodinâmico para oxidação dos três princípios ativos (Fig. 40).

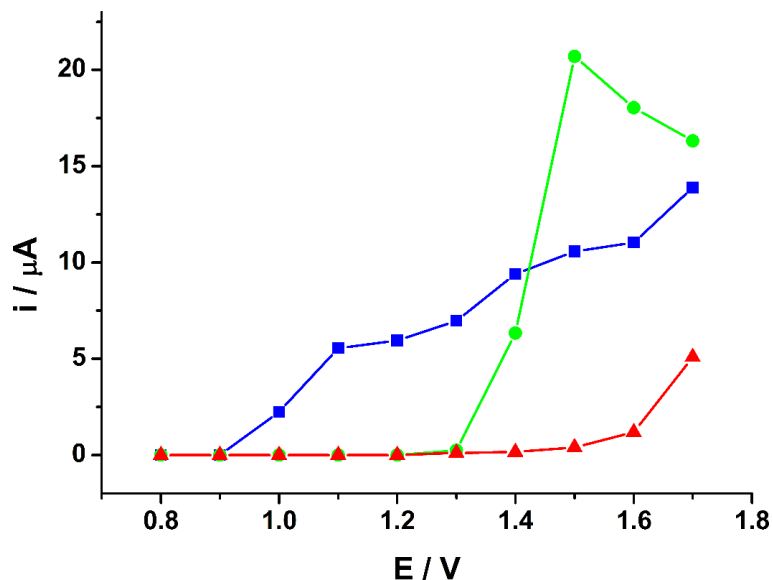


Figura 40. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para CTF (■), CAF (●) e DIF (▲). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 70 ms; Eletrólito suporte: NaAc/HAc 0,05 mol L⁻¹; Vazão: 75 μL s⁻¹; Volume injetado: 150μL.

Nos voltamogramas hidrodinâmicos, pode ser notado um comportamento similar aos obtidos por voltamograma cíclico. Nas condições hidrodinâmicas (BIA-MPA) e em meio de NaAc/HAc 0,05 mol L⁻¹, a oxidação da CTF se inicia em torno de +1,0 V, da CAF por volta de +1,4 V e da DIF próximo a +1,6 V.

Com base nestes resultados, os seguintes pulsos de potenciais foram selecionados para determinação simultânea de CTF, CAF e DIF:

- +1,1 V/50 ms: oxidação de CTF sem a interferência da CAF e DIF;
- +1,4 V/50 ms: oxidação de ambos os analitos (CTF e CAF), sem interferência da DIF;
- +1,7 V/50 ms: oxidação dos três analitos (CTF, CAF e DIF);
- +0,70 V/150 ms: limpeza eletroquímica do eletrodo de BDD.

A partir desse esquema de aplicação dos pulsos de potenciais, os seguintes amperogramas foram obtidos em +1,1 V, +1,4 V e +1,7 V para injeções no sistema BIA-MPA de soluções contendo somente CTF, somente CAF, somente DIF e simultaneamente CTF + CAF + DIF.

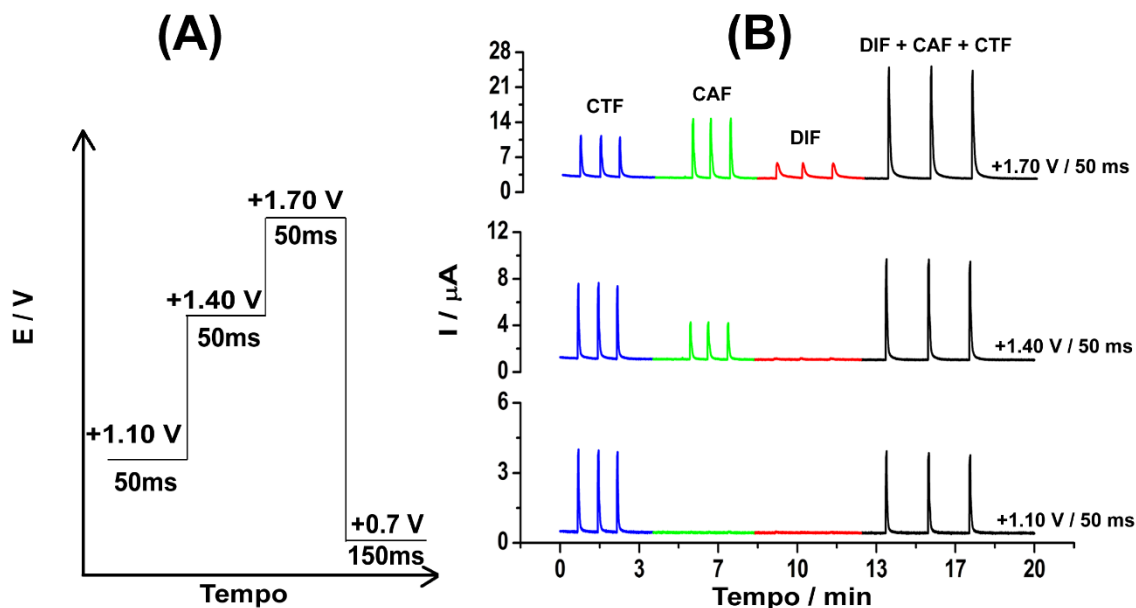


Figura 41. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD posicionado no sistema BIA-MPA. (B) Amperogramas obtidos para injeções de soluções contendo: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CTF; $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF; $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e mistura dos três compostos (DIF + CAF + CTF) nas mesmas concentrações anteriores. Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms. Demais condições experimentais iguais a Fig. 40.

Como pode ser visto na Fig. 41B, apenas a CTF é oxidada em +1,10 V, sendo que corrente detectada é a mesma na presença ou ausência dos outros princípios, indicando que não há interação química entre CTF e CAF ou DIF ou com os respectivos produtos de oxidação. Em +1,40 V, tanto a CTF como a CAF são oxidadas. Na injeção de uma solução contendo os três analitos, o sinal de oxidação em +1,40 V corresponde à soma das correntes individuais da CTF e CAF obtidas neste pulso de potencial. No pulso de potencial de +1,70 V, os três compostos são oxidados. Na injeção de uma solução contendo os três analitos, o sinal de oxidação em +1,70 V corresponde à soma das correntes individuais da CTF, CAF e da DIF obtidas neste pulso de potencial.

Os resultados até aqui apresentados são similares aos obtidos na determinação simultânea de CTF, PIR e DIF. Somente os pulsos de potenciais adotados e o eletrólito são diferentes. Portanto, a estratégia para determinação simultânea dos três compostos é idêntica àquela usada na análise anterior.

Novamente, o cálculo de três fatores de correção (FC_1 , FC_2 e FC_3) foi necessário [23]. Os dois primeiros FCs (FC_1 , FC_2) foram obtidos mediante a injeção no sistema BIA-MPA de solução contendo apenas CTF (equação 16 e 17):

$$FC_1 = i_{CTF +1,40V} / i_{CTF +1,10V} \quad (16)$$

$$FC_2 = i_{CTF +1,70V} / i_{CTF +1,10V} \quad (17)$$

O terceiro FC (FC_3) foi obtido mediante a injeção no sistema BIA-MPA de solução contendo apenas CAF (equação 3):

$$FC_3 = i_{CAF +1,70V} / i_{CAF +1,40V} \quad (18)$$

Quando uma solução contendo uma mistura dos três compostos é injetada, as correntes relacionadas com CTF, CAF e DIF são obtidas da seguinte forma:

$$I_{CTF} = i_{+1,10V} \quad (19)$$

$$I_{CAF} = i_{+1,40V} - (FC_1 \times i_{+1,10V}) \quad (20)$$

$$I_{DIF} = i_{+1,70V} - (FC_3 \times I_{CAF em +1,40V}) - (FC_2 \times i_{+1,10V}) \quad (21)$$

Portanto, é possível detectar seletivamente as correntes de oxidação da CTF, CAF e da DIF quando presentes na mesma solução a partir dos três amperogramas (em 1,10, 1,40 e 1,70 V) e das equações acima.

4.2.2.2. Influência da concentração da CTF, CAF nos FCs

Neste estudo, o comportamento dos FCs em relação à concentração da CTF e CAF em meio de NaAc/HAc 0,05 mol L⁻¹ também foi realizado. O teste foi feito com injeções no sistema BIA-MPA de soluções com concentrações crescentes de CTF e CAF e aquisição de corrente nos três pulsos de potenciais otimizados anteriormente (+1,10 V, +1,40 V e +1,70 V). Na Figura 42 são apresentados os amperogramas obtidos neste estudo. As soluções foram injetadas de forma intercalada, ora de CTF, ora de CAF.

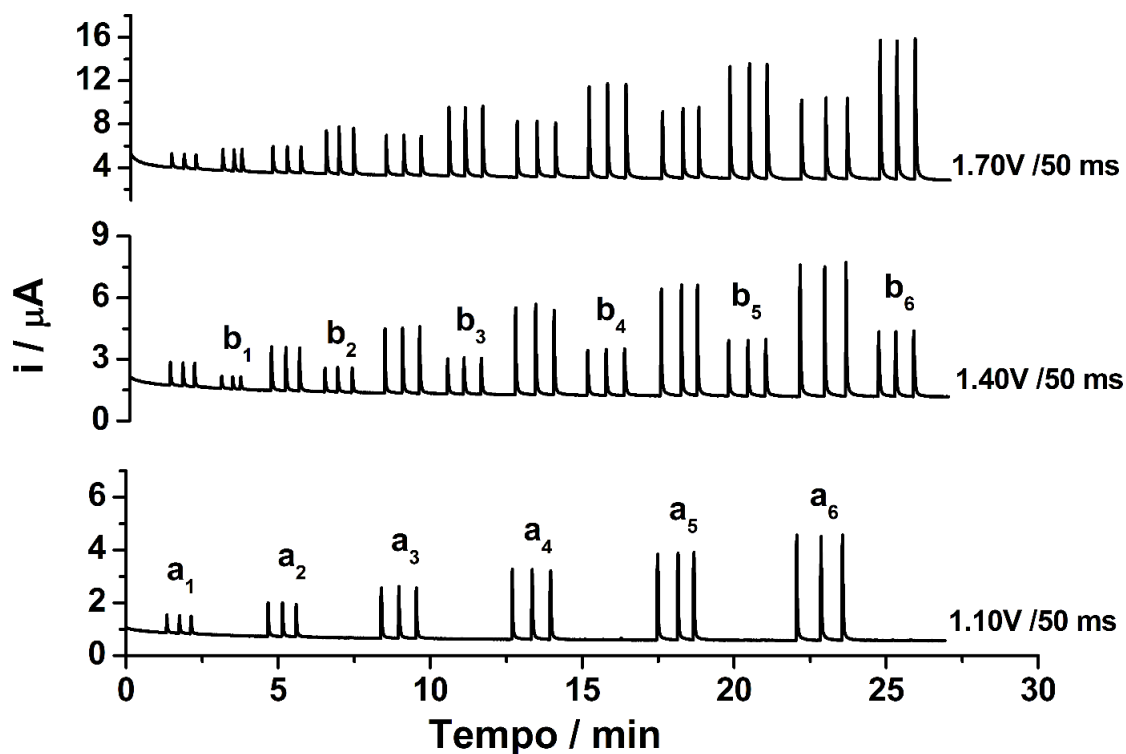


Figura 42. Amperogramas obtidos para injeções de seis soluções contendo concentrações crescentes de CTF (a_1 a a_6 - 10 a $80 \mu\text{mol L}^{-1}$) e de CAF (b_1 a b_6 - 10 a $80 \mu\text{mol L}^{-1}$). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms. Demais condições experimentais: Fig. 40.

A partir dos amperogramas acima, os seguintes gráficos foram obtidos:

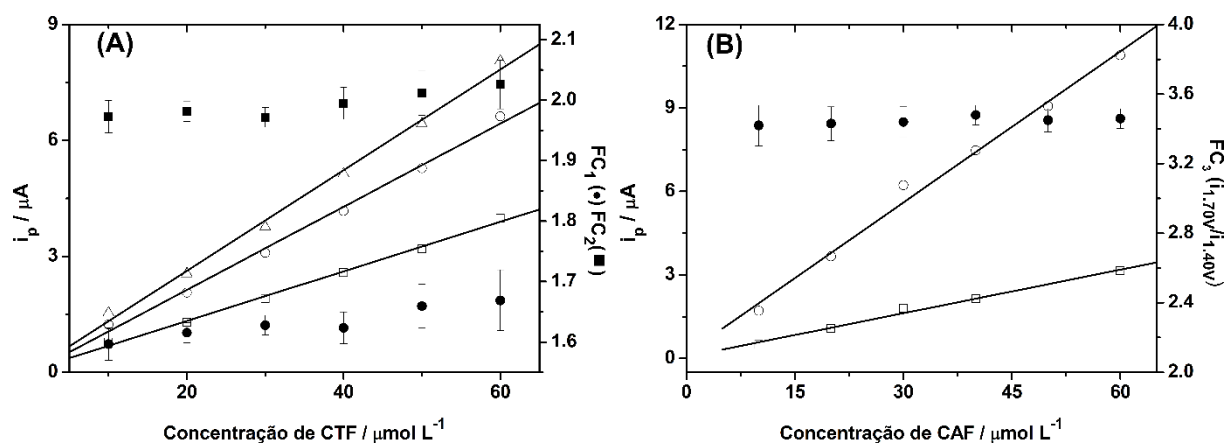


Figura 43. Curvas de calibração para injeções de concentrações crescentes de CTF (10 a $60 \mu\text{mol L}^{-1}$) monitorados nos potenciais de + 1,10 V (□), +1,40 V (○) e +1,70 V (Δ) e, respectivos valores calculados para FC_1 (●; $i_{\text{CTF}+1,40\text{V}} / i_{\text{CTF}+1,10\text{V}}$) e FC_2 (■; $i_{\text{CTF}+1,70\text{V}} / i_{\text{CTF}+1,10\text{V}}$). (B) Curvas de calibração para injeções de concentrações crescentes de CAF (10 a $60 \mu\text{mol L}^{-1}$) nos

potenciais + 1,40 V (\square), 1,70 V (\circ) e respectivo valor calculado para FC_3 (\bullet ; $i_{CAF+1,70V} / i_{CAF+1,40V}$).

Como pode ser verificado, a CTF e a CAF apresentam um comportamento linear na faixa de concentração entre 10 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em todos os pulsos de potenciais ($r \geq 0,998$). Os FC s são relativamente constantes em todas as faixas de concentração estudadas e apresentam os seguintes valores médios: $FC_1 = 1,63 \pm 0,01$ (DPR = 0,6%); $FC_2 = 1,97 \pm 0,02$ (DPR = 1,0%) e $FC_3 = 3,45 \pm 0,03$ (DPR = 0,9%). Posteriormente, as seguintes faixas de concentração foram definidas para serem usadas nas curvas de calibração: 10 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para CTF e DIF e de 20 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para CAF. Estas faixas de concentração foram definidas considerando a proporção molar aproximada encontrada nas amostras farmacêuticas contendo CTF, CAF e DIF, que é de 1: 2,4 :1, respectivamente.

4.2.2.3. Estudo de repetibilidade

O estudo de repetibilidade foi realizado utilizando os parâmetros hidrodinâmicos otimizados anteriormente no método para determinação simultânea de CTF e DIF por BIA-MPA (volume injetado: 150 μL ; Velocidade de injeção: 75 $\mu\text{L s}^{-1}$; velocidade de agitação: 1200 rpm). Nessas condições, o teste de repetibilidade foi realizado com a injeção de soluções contendo a mistura dos três compostos na menor e na maior concentração da faixa de trabalho. Os amperogramas obtidos são apresentados na Figura 44.

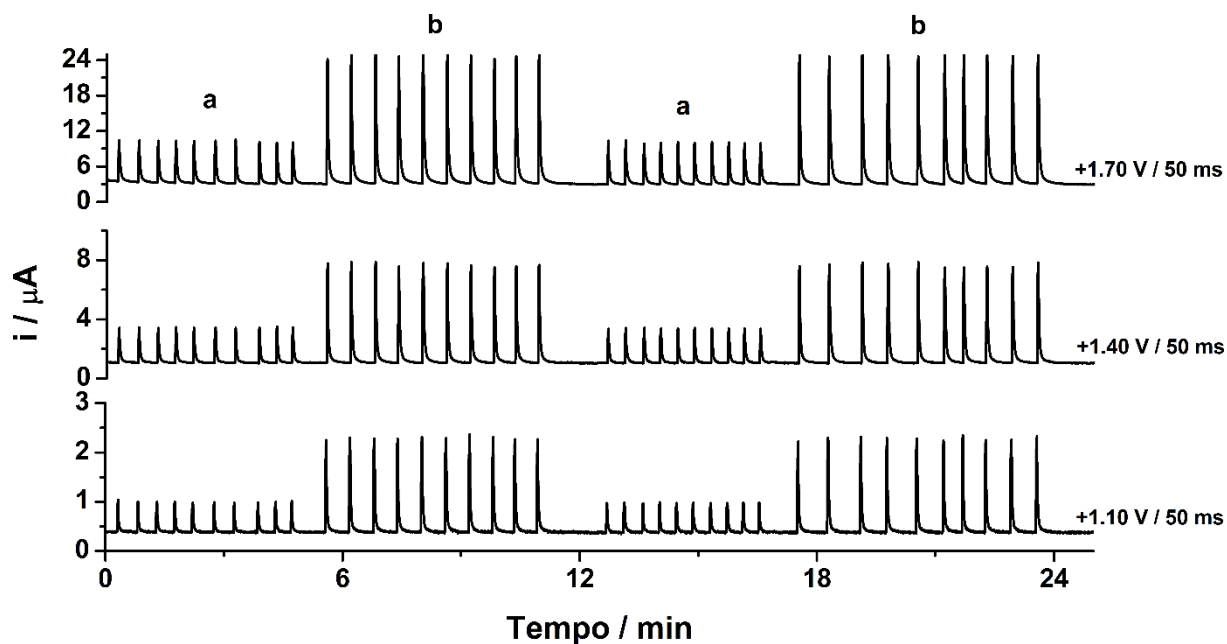


Figura 44. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo $10 + 10 + 20 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) ou $30 + 30 + 60 \text{ mol L}^{-1}$ (b) de CTF, DIF e CAF, respectivamente ($n=20$). Pulso de potencial de limpeza: $0,7\text{V} / 150\text{ms}$ (não apresentado). Demais condições experimentais ver Fig. 40.

O método demonstrou uma boa estabilidade, uma vez que a corrente de oxidação em todos os potenciais ($+1,10$, $+1,40$ e $+1,70 \text{ V}$) se manteve constante e baixos desvios padrões relativos foram alcançados ($n= 20$):

- CTF: $0,6 \%$ (a) e $0,4 \%$ (b) (em $+1,10 \text{ V}$);
- CAF: $0,7 \%$ (a) e $0,8 \%$ (b) (em $+1,40\text{V}$);
- DIF: $0,9 \%$ (a) e $0,9\%$ (b) (em $+1,70 \text{ V}$).

4.2.2.4. Análise simultânea de CTF, CAF e DIF em formulações farmacêuticas comerciais.

O método proposto para a quantificação simultânea de CTF, CAF e DIF também foi avaliado na análise de amostras farmacêuticas. As curvas de calibração para ambos os compostos foram obtidas levando-se em consideração a faixa de concentração onde os fatores

de correção (*FCs*) são constantes (10 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para CTF e DIF e de 20 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para CAF e a proporção molar de concentração de CTF, CAF e DIF (1: 2,4: 1) em formulações comerciais. A Figura 45 mostra os amperogramas obtidos em +1,10 V, +1,40 V e +1,70 V para injeções em triplicata de soluções em ordem crescente (c-g) e decrescente (g-c) de concentração. Duas amostras de formulações farmacêuticas previamente diluídas no eletrólito suporte (1 e 2) e uma solução contendo somente CTF (a) e somente CAF (b) (cálculo dos *FCs*) também foram injetadas.

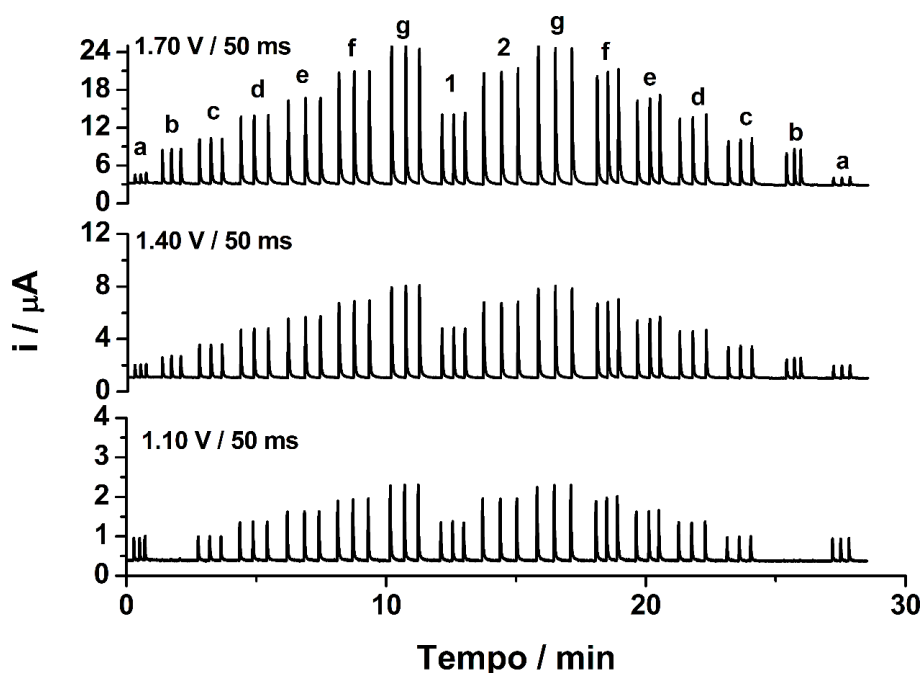


Figura 45. Amperogramas obtidos para injeções de solução contendo somente CTF (15 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (a), somente CAF (b) (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$), cinco soluções (c-g) contendo simultaneamente CTF e DIF (10 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e CAF (20 – 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras adequadamente diluídas (1 e 2). Demais condições experimentais ver Fig. 40.

Novamente, efeito de memória ou contaminação não foram notados, visto que tanto as soluções padrões injetadas em ordem crescente ou decrescente apresentaram respostas semelhantes. As demais características analíticas do método proposto estão reunidas na Tabela 8.

Tabela 8. Características analíticas do método proposto.

Características	CTF	CAF	DIF
r	0,999	0,997	0,995
Inclinação	$0,064 \pm 0,001$	$0,126 \pm 0,004$	$0,173 \pm 0,009$
Intercepto	$-0,001 \pm 0,023$	$-0,116 \pm 0,087$	$-1,339 \pm 0,206$
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,31	0,49	0,76
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,03	1,63	4,09
FA (injeções h^{-1})	120	120	120
Repetibilidade intra-dia (n= 20)	0,5%	0,8%	0,9%
Repetibilidade inter-dias (n=6)	5,0%	5,7%	6,3%

Onde: r: coeficiente de correlação; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; FA: frequência analítica; Para: Intra-dia: comparações obtidas de sinais em injeções sucessivas e Inter-dias: comparações realizadas entre sinais de dias diferentes, resultados em desvio padrão relativo (DPR); Intervalo de confiança = 95%;

Para testar a exatidão dos resultados obtidos com o método de BIA-MPA, as amostras farmacêuticas também foram analisadas por HPLC. A Tabela 8 mostra os resultados com os dois métodos (BIA-MPA e HPLC) com os respectivos desvios padrão (n = 3).

Tabela 9. Comparação dos resultados (média \pm DP; n = 3) obtidos na determinação simultânea de CTF, CAF e DIF em amostras farmacêuticas usando o método proposto *versus* HPLC.

Amostras		Valor Bula (mg / comp.)	BIA-MPA	HPLC
1	CTF	22,8	$23,7 \pm 0,1$	$23,6 \pm 0,2$
	CAF	50,0	$53,0 \pm 0,2$	$52,8 \pm 0,1$
	DIF	27,2	$27,8 \pm 0,2$	$27,7 \pm 0,2$
2	CTF	22,8	$22,8 \pm 0,1$	$22,9 \pm 0,2$
	CAF	50,0	$49,8 \pm 0,2$	$50,1 \pm 0,1$
	DIF	27,2	$27,8 \pm 0,2$	$27,5 \pm 0,2$

Analisando os resultados apresentados na Tabela 9, podemos afirmar que os resultados obtidos com os dois métodos são similares. A um nível de confiança de 95%, os valores do teste t calculados foram menores do que o valor teórico crítico (2,78, $n = 3$), o que demonstra que não há diferenças significativas entre o método proposto (BIA-MPA) e o método de referência (HPLC) e que o método proposto apresenta boa exatidão. Assim, os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a metodologia BIA-MPA pode ser utilizada com sucesso na determinação simultânea de CTF, CAF e DIF em amostras farmacêuticas.

5. Conclusões e Perspectivas

No presente trabalho foi demonstrada a potencialidade da detecção por amperometria de múltiplos pulsos acoplada à técnica BIA (BIA-MPA) no desenvolvimento de três novos métodos de análise: (a) determinação estequiométrica de DIM (CTF + DIF); (b) determinação simultânea de CTF, PIR e DIF; (c) determinação simultânea de CTF, CAF e DIF.

Os métodos propostos são simples, rápidos, apresentam baixo custo e necessitam de etapas simples de preparação da amostra (somente dissolução e diluição). Os métodos apresentaram sensibilidade, seletividade e estabilidade adequada para quantificação simultânea destes compostos em formulações farmacêuticas usando um eletrodo de trabalho (BDD) sem qualquer modificação química ou eletroquímica, o que torna os métodos mais atraentes para aplicações em análises de rotina.

Além disto, uma estratégia simples e rápida (injeção de somente uma solução padrão e amostra) para obtenção de informações sobre pureza, estequiometria e presença ou ausência de interferentes no sal de DIM (CTF + DIF) também foi proposta. Esta estratégia tem grande potencial para ser aplicada com inúmeras outras espécies analíticas.

Os resultados obtidos com os métodos propostos foram estatisticamente similares aos obtidos com a técnica de HPLC. Ademais, o sistema BIA-MPA permite análises mais rápidas (≥ 60 injeções h^{-1}), apresenta menor custo e consome menor quantidade de reagentes ou solventes. Devido às características portáteis do sistema BIA, os métodos propostos também têm potencialidade para serem usados em laboratórios com infraestrutura limitada.

6. Referências Bibliográficas

1. WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053-1056, 1991.
2. BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric and voltammetric detection in batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 19, p. 3145-3150, 1994.
3. ÖZKAN, C. K. et al. Determination of Dimenhydrinate Nasal Delivery System in the Blood by RP-LC. **Chromatographia**, v. 76, n. 21-22, p. 1521-1525, 2013.
4. HALPERT, A. G.; OLMSTEAD, M. C.; BENINGER, R. J. Dimenhydrinate produces a conditioned place preference in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 1, p. 173-179, 2003.
5. CUSIC, J. W. **B-haloxantfflne salts of diarylalkyl**. U.S. Patent n. 2499058, 28 fev. 1950.
6. VON LIEVEN, T. Symptom genesis and therapy of travel sickness. Experimentally produced motion sicknesses and the effect of dimenhydrate (Novomina). **Münchener medizinische Wochenschrift (1950)**, v. 112, n. 43, p. 1953, 1970.
7. SEIBEL, K.; SCHAFFLER, K.; REITMEIR, P. A randomised, placebo-controlled study comparing two formulations of dimenhydrinate with respect to efficacy in motion sickness and sedation. **Arzneimittelforschung**, v. 52, n. 07, p. 529-536, 2002.
8. LEATHEM, A. M. Safety and efficacy of antiemetics used to treat nausea and vomiting in pregnancy. **Clinical pharmacy**, v. 5, n. 8, p. 660-668, 1986.
9. GROTE, J.; BRINKHOFF, H. Experiences with dimenhydrinate (Vomex A retard) in cytostatic incompatibility. **Therapie der Gegenwart**, v. 116, n. 7, p. 1361, 1977.

10. HALPERT, A. G.; OLMSTEAD, M. C.; BENINGER, R. J. Mechanisms and abuse liability of the anti-histamine dimenhydrinate. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 1, p. 61-67, 2002.
11. NGUYEN, T. et al. Assessment of the rewarding effects of dimenhydrinate using the conditioned place preference paradigm in mice. **Neuroscience Letters**, v. 471, n. 1, p. 38-42, 2010.
12. BARBAS, C. et al. Optimization and validation of a method for the determination of caffeine, 8-chlorotheophylline and diphenhydramine by isocratic high-performance liquid chromatography: Stress test for stability evaluation. **Journal of Chromatography A**, v. 870, n. 1, p. 97-103, 2000.
13. DÖGE, U.; EGER, K. A simple HPLC-UV method for the determination of dimenhydrinate and related substances—identification of an unknown impurity. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 3, p. 174-178, 2007.
14. DONNELLY, R. F. Chemical stability of dimenhydrinate in minibags and polypropylene syringes. **The Canadian Journal of Hospital Pharmacy**, v. 55, n. 5, 2002.
15. KVIST, L. C. et al. Equipment for drug release testing of medicated chewing gums. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, n. 3, p. 405-411, 2000.
16. QU, W.; WU, K.; HU, S. Voltammetric determination of pyridoxine (Vitamin B6) by use of a chemically-modified glassy carbon electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 3, p. 631-635, 2004.
17. TOMČÍK, P. et al. Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1198-1204, 2012.
18. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analysis. **Chemical Analysis**, v. 62, 1981.

19. PEREIRA, P. F. et al. Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol. **Talanta**, v. 90, p. 99-102, 2012.
20. QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513-523, 2004.
21. PEREIRA, P. F. et al. Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 39, p. 41-46, 2013.
22. QUINTINO, M. S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
23. SILVA, R. A. B. **Caracterizações e aplicações analíticas de eletrodos compósitos modificados com Azul da Prússia e determinações simultâneas em sistemas de análise por injeção em batelada empregando somente um eletrodo de trabalho**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia
24. WANG, J. Injection analysis—from flow-injection analysis to batch-injection analysis. **Microchemical Journal**, v. 45, n. 2, p. 219-224, 1992.
25. BRETT, C. M. A. et al. Novel polymer-modified electrodes for batch injection sensors and application to environmental analysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 468, n. 1, p. 26-33, 1999.
26. WANG, J.; CHEN, L. Small-volume batch-injection analyser. **Analyst**, v. 119, n. 6, p. 1345-1348, 1994.
27. TORMIN, T. F. et al. Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: a simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 2014.
28. THAVARUNGKUL, P. et al. Batch injection analysis for the determination of sucrose in sugar cane juice using immobilized invertase and thermometric detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 14, n. 1, p. 19-25, 1999.

29. WANG, J.; RAYSON, G. D.; TAHA, Z. Batch injection analysis using fiber-optic fluorometric detection. **Applied Spectroscopy**, v. 46, n. 1, p. 107-110, 1992.
30. SIMÕES, F. R.; VAZ, C. M. P.; BRETT, C. M. A. Electroanalytical detection of the pesticide paraquat by batch injection analysis. **Analytical Letters**, v. 40, n. 9, p. 1800-1810, 2007.
31. DORNELLAS, R. M. et al. Electrochemical Oxidation of the Fungicide Dimoxystrobin and Its Amperometric Determination by Batch-Injection Analysis. **Analytical Letters**, v. 47, n. 3, p. 492-503, 2014.
32. SILVA, R. A. G. et al. Fast and direct determination of mancozeb through batch injection analysis with amperometric detection on boron-doped diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 733, p. 85-90, 2014.
33. KARIM, S. E. A.; EL-NASHAR, R. M.; ABADI, A. H. Potentiometric Determination of Imatinib under Batch and Flow Injection Analysis Conditions. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 7, p. 9668-9681, 2012.
34. EL GOHARY, N. A.; EL NASHAR, R. M.; ABOUL-ENIEN, H. Y. Potentiometric determination of sibutramine using batch and flow injection analysis. **Analytical Letters**, v. 44, n. 1-3, p. 241-257, 2011.
35. BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric batch injection analysis: Theoretical aspects of current transients and comparison with wall-jet electrodes in continuous flow. **Electroanalysis**, v. 7, n. 3, p. 225-229, 1995.
36. SILVA, R. A. B. et al. Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode. **Analytical Methods**, v. 3, n. 12, p. 2804-2808, 2011.
37. WANG, J. et al. Computerized pipettes with programmable dispensation. **Analytica Chimica Acta**, v. 267, n. 1, p. 171-177, 1992.
38. GIMENES, D. T. et al. Internal standard in flow injection analysis with amperometric detection. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 2, p. 216-218, 2010.

39. GIMENES, D. T. et al. Flow-Injection Amperometric Method for Indirect Determination of Dopamine in the Presence of a Large Excess of Ascorbic Acid. **Electroanalysis**, v. 22, n. 1, p. 74-78, 2010.
40. DOS SANTOS, W. T. P. et al. Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection. **Electroanalysis**, v. 20, n. 17, p. 1878-1883, 2008.
41. SILVA, R A et al. Development of a Simple and Fast Electrochemical Method to Evaluate Physical Stress in Athletes. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2601-2606, 2011.
42. KARUWAN, C. et al. Pulsed amperometry for anti-fouling of boron-doped diamond in electroanalysis of β -agonists: application to flow injection for pharmaceutical analysis. **Sensors**, v. 6, n. 12, p. 1837-1850, 2006.
43. JOHLL, M. E.; WILLIAMS, D. G.; JOHNSON, D. C. Activated pulsed amperometric detection of cysteine at platinum electrodes in acidic media. **Electroanalysis**, v. 9, n. 18, p. 1397-1402, 1997.
44. SCHIAVON, G. et al. Pulsed amperometric detection of ethanol in breath by gold electrodes supported on ion exchange membranes (solid polymer electrolytes). **Electroanalysis**, v. 8, n. 6, p. 544-548, 1996.
45. BRETT, A. M. O.; MATYSIK, F.; VIEIRA, M. T. Thin-film gold electrodes produced by magnetron sputtering. Voltammetric characteristics and application in batch injection analysis with amperometric detection. **Electroanalysis**, v. 9, n. 3, p. 209-212, 1997.
46. TORMIN, T. F. et al. Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1274-1278, 2011.
47. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principios de Análise Instrumental**. Madrid: McGraw-Hill, 2001.
48. BARD, A. J. et al., **Encyclopedia of Electrochemistry**, Volume 3, Instrumentation and Electroanalytical Chemistry. 2003.

49. WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. John Wiley & Sons, 2006.
50. GOSSER, D. K. **Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**. New York: VCH, 1993.
51. COMPTON, R. G.; BANKS, C. E. **Understanding Voltammetry**. Singapore: World Scientific, 2007.
52. NOEL, M.; VASU, K. I. **Cyclic Voltammetry and the Frontiers of Electrochemistry**. Aspect, 1990.
53. EKLUND, J. C. et al. Perspectives in modern voltammetry: Basic concepts and mechanistic analysis. **Advances in Physical Organic Chemistry**, v. 32, p. 1-120, 1999.
54. BOND, A. M. (Ed.). **Broadening Electrochemical Horizons: Principles and Illustration of Voltammetric and Related Techniques**. Oxford University Press, 2002.
55. HEINZE, J. Ultramicroelectrodes in electrochemistry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 32, n. 9, p. 1268-1288, 1993.
56. GIRAULT, H. H. Analytical and physical electrochemistry. **Fundamental Sciences (Chemistry)**, 2004.
57. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. New York: Wiley, 1980.
58. SAVÉANT, J. **Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry: An Electrochemical Approach to Electron Transfer Chemistry**. John Wiley & Sons, 2006.
59. CROW, D. R. **Principles and Applications of Electrochemistry**. CRC Press, 1994.
60. BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A.. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. Coimbra: Almedina, 1996.

61. ZHANG, W. et al. Amperometric Detection of Hydrogen Peroxide Using Glassy Carbon Electrodes Modified with Chromium Hexacyanoferrate/Single-Walled Carbon Nanotube Nanocomposites. **Electroanalysis**, v. 21, n. 2, p. 179-183, 2009.
62. JIA, W. et al. Vertically aligned CuO nanowires based electrode for amperometric detection of hydrogen peroxide. **Electroanalysis**, v. 20, n. 19, p. 2153-2157, 2008.
63. GUTIERREZ, A. et al. Amperometric Detection and Quantification of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) Using Dendrimer Modified Electrodes. **Electroanalysis**, v. 20, n. 21, p. 2294-2300, 2008.
64. HSU, P. F.; CIOU, W. L.; CHEN, P. Y. Voltammetric study of polyviologen and the application of polyviologen-modified glassy carbon electrode in amperometric detection of vitamin C. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1285-1292, 2008.
65. VARODI, C.; GLIGOR, D.; MURESAN, L. M. Carbon paste electrodes incorporating synthetic zeolites and methylene blue for amperometric detection of ascorbic acid. **Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia**, v. 52, n. 1, p. 109-117, 2007.
66. BURATTI, S.; BRUNETTI, B.; MANNINO, S. Amperometric detection of carbohydrates and thiols by using a glassy carbon electrode coated with Co oxide/multi-wall carbon nanotubes catalytic system. **Talanta**, v. 76, n. 2, p. 454-457, 2008.
67. RICHTER, E. M. et al. Disposable twin gold electrodes for amperometric detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 17, p. 2965-2969, 2004.
68. DE CARVALHO, R. M. et al. Effects of EDTA on signal stability during electrochemical detection of acetaminophen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 5, p. 871-878, 2004.
69. CHAILAPAKUL, O. et al. Recent electrochemical and optical sensors in flow-based analysis. **Sensors**, v. 6, n. 10, p. 1383-1410, 2006.
70. HAGHIGHI, B. et al. Carbon ceramic electrodes modified with laccase from *Trametes hirsuta*: fabrication, characterization and their use for phenolic compounds detection. **Electroanalysis**, v. 19, n. 9, p. 907-917, 2007.

71. PEDROSA, V. A.; LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. FIA Determination of Paracetamol in Pharmaceutical Drugs by Using Gold Electrodes Modified with a 3-Mercaptopropionic Acid Monolayer. **Electroanalysis**, v. 18, n. 9, p. 931-934, 2006.
72. CATARINO, R. I. L. et al. Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 4, p. 571-580, 2003.
73. GIMENES, D. T. **Desenvolvimento de metodologias analíticas usando FIA com detecção amperométrica: análise de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico**. Dissertação de mestrado, UFU. 2009.
75. MATOS, R. C. et al. Modified microelectrodes and multivariate calibration for flow injection amperometric simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, epinephrine and dipyrone. **Analyst**, v. 125, n. 11, p. 2011-2015, 2000.
76. PAIXÃO, T. R. L. C.; MATOS, R. C.; BERTOTTI, M. Development of a Dual-Band Amperometric Detector for Determination of Ascorbic Acid and Glucose. **Electroanalysis**, v. 15, n. 23-24, p. 1884-1889, 2003.
77. THANGARAJ, R. et al. A flow injection analysis coupled dual electrochemical detector for selective and simultaneous detection of guanine and adenine. **Electrochimica Acta**, v. 123, p. 485-493, 2014.
78. DOS SANTOS, W. T. P. et al. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: Potencialidades e aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1753-1761, 2011.
79. MEDEIROS, R. A. et al. Simple flow injection analysis system for simultaneous determination of phenolic antioxidants with multiple pulse amperometric detection at a boron-doped diamond electrode. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 20, p. 8658-8663, 2010.
80. SURAREUNGCHAI, W.; DEEPUNYA, W.; TASAKORN, P. Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose. **Analytica Chimica Acta**, v. 448, n. 1, p. 215-220, 2001.

81. SILVA, W. C. et al. A simple strategy for simultaneous determination of paracetamol and caffeine using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Electroanalysis**, v. 23, n. 12, p. 2764-2770, 2011.
82. TORMIN, T. F. et al. Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. **Talanta**, v. 99, p. 527-531, 2012.
83. SILVA, R. A. B. et al. Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode. **Analytical Methods**, v. 3, n. 12, p. 2804-2808, 2011.
84. DOS SANTOS, W. T. P. et al. Simple flow injection amperometric system for simultaneous determination of dipyrone and paracetamol in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 7, p. 1249-1255, 2009.
85. KHOSHAYAND, M. R. et al. Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by chemometric methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 70, n. 3, p. 491-499, 2008.
86. ELKADY, E. F. Simultaneous spectrophotometric determination of diclofenac potassium and methocarbamol in binary mixture using chemometric techniques and artificial neural networks. **Drug Testing and Analysis**, v. 3, n. 4, p. 228-233, 2011.
87. KHOSHAYAND, M. R. et al. Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceuticals using chemometric approaches. **Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 292, 2010.
88. KHOSHAYAND, M. R. et al. Simultaneous spectrophotometric determination of chlordiazepoxide and clidinium using multivariate calibration techniques. **Drug Testing and Analysis**, v. 2, n. 9, p. 430-435, 2010.

89. DIAMOND, D. et al. Multicomponent batch-injection analysis using an array of ion-selective electrodes. **Analytica chimica acta**, v. 281, n. 3, p. 629-635, 1993.
90. SÁNCHEZ-MORENO, R. A. et al. Potentiometric Screen-Printed Bisensor for Simultaneous Determination of Chromium (III) and Chromium (VI). **Electroanalysis**, v. 23, n. 1, p. 287-294, 2011.
91. LOURENCAO, B. C. et al. Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Caffeine in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 15, p. 1717-1723, 2010.
92. BABAEI, A.; GARRETT, D. J.; DOWNARD, A. J. Selective simultaneous determination of paracetamol and uric acid using a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotube/chitosan composite. **Electroanalysis**, v. 23, n. 2, p. 417-423, 2011.
93. ZEN, J.; TING, Y. Simultaneous determination of caffeine and acetaminophen in drug formulations by square-wave voltammetry using a chemically modified electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 342, n. 2, p. 175-180, 1997.
94. LOURENCAO, B. C. et al. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 748-752, 2009.
95. GOYAL, R. N.; BISHNOI, S.; AGRAWAL, B. Electrochemical sensor for the simultaneous determination of caffeine and aspirin in human urine samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, n. 2, p. 97-102, 2011.
96. MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 886-891, 2010.
97. SAFAVI, A. et al. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 359, n. 2, p. 224-229, 2006.

98. UHLIG, A. et al. Chip-array electrodes for simultaneous stripping analysis of trace metals. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 25, n. 1, p. 899-903, 1995.
99. FIGURA, P.; MCDUFFIE, B. Determination of labilities of soluble trace metal species in aqueous environmental samples by anodic stripping voltammetry and chelex column and batch methods. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 1433-1439, 1980.
100. RISO, R. D.; LE CORRE, P.; CHAUMERY, C. J. Rapid and simultaneous analysis of trace metals (Cu, Pb and Cd) in seawater by potentiometric stripping analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 351, n. 1, p. 83-89, 1997.
101. DE MIRANDA, J. A. T. et al. Determinação simultânea de ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica pulsada. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1459-1463, 2012.
102. GIMENES, D. T. et al. Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac. **Talanta**, v. 116, p. 1026-1032, 2013.
103. PEREIRA, P. F. et al. Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 713, p. 32-38, 2014.
104. GIMENES, D. T. et al. Determination of propranolol and hydrochlorothiazide by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytical Methods**, v. 6, n. 10, p. 3261-3267, 2014.
105. RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
106. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008**, 2003.
107. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); **Resolução RE nº 899**, 29 de maio de 2003, Diário Oficial da União, 02/06/2003, Brasília, DF.

108. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de Química Analítica**. Reverté, 1997.
109. SALAZAR-BANDA, G. R. et al. On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 22, p. 4612-4619, 2006.
110. PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 673-675, 1996.
111. GRANGER, M. C. et al. Standard electrochemical behavior of high-quality, boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 16, p. 3793-3804, 2000.
112. SPĂȚARU, N. et al. Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application. **Electroanalysis**, v. 14, n. 11, p. 721-728, 2002.
113. MABBOTT, G. A., An introduction to cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 697, 1983.
114. DRYHURST, G. Electrochemical Oxidation of Uric Acid and Xanthine at the Pyrolytic Graphite Electrode Mechanistic Interpretation of Electrochemistry. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 119, n. 12, p. 1659-1664, 1972.
115. TOLEDO, R. A. et al. Estudo eletroquímico e químico-quântico da oxidação do antidepressivo tricíclico amitriptilina. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 456, 2005.
116. SWAIN, M. Chemicalize. org. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 2, p. 613-615, 2012.
117. SATERLAY, A. J.; FOORD, J. S.; COMPTON, R. G. Sono-cathodic stripping voltammetry of manganese at a polished boron-doped diamond electrode: application to the determination of manganese in instant tea. **Analyst**, v. 124, n. 12, p. 1791-1796, 1999.

118. FUCHIGAMI, T. et al. Electrochemical generation of unstable nitrogen species. 4. Electrochemical and chemical oxidation of cyclic and open-chain diamines. The formation of cyclic hydrazine derivatives. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 53, n. 7, p. 2040-2045, 1980.
119. SURMANN, P.; PETER, B. Carbon electrodes in amine analysis: Effect of chemically modified carbon surfaces on signal quality and reproducibility. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 685-691, 1996.
120. FONSECA, C. A. et al. Exploiting ion-pair formation for the enhancement of electroanalytical determination of pyridoxine (B6) onto polyurethane-graphite electrodes. **Microchemical Journal**, v. 99, n. 2, p. 186-192, 2011.