

**Universidade Federal de Uberlândia**

**Instituto de Química**

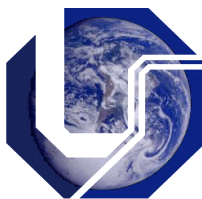
**Programa Multiinstucional de Doutorado em Química**

***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***

**RODRIGO AMORIM BEZERRA DA SILVA**

**Uberlândia**

**Junho / 2012**



**Universidade Federal de Uberlândia**

**Instituto de Química**

**Programa Multiinstucional de Doutorado em Química**

***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***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multiinstucional de Doutorado em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química.

**Doutorando:** Rodrigo Amorim Bezerra da Silva

**Orientador:** Eduardo Mathias Richter

**Co-orientador:** Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

**Área de concentração:** Química Analítica

**Uberlândia - MG**

**Junho / 2012**



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



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa Multi-institucional de Doutorado em  
Química das Universidades Federais de Goiás, Mato Grosso do Sul e de Uberlândia  
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 16/COPGQ.

DATA: 06/06/2012

DISCENTE: Rodrigo Amorim Bezerra da Silva

MATRÍCULA: 100486

TÍTULO DO TRABALHO: Caracterizações e aplicações analíticas de eletrodos compostos modificados com Azul da Prússia e determinações simultâneas em sistemas de análise por injeção em batelada empregando somente um eletrodo de trabalho.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

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

Às treze horas e trinta minutos do dia seis de junho do ano dois mil e doze, no Auditório E do Bloco SO-A, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Lúcio Angnes e Claudimir Lúcio do Lago, da USP – Universidade de São Paulo; André Luiz dos Santos, da Faculdade de Ciências Integradas/UFU; Djeneine de Souza, da UFU, Campus de Patos de Minas e Eduardo Mathias Richter, professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa apresentou o candidato 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 02/2010/COPGQ. Em seguida, o presidente da mesa concedeu a palavra ao candidato para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir a apresentadora. A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimeada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou o candidato. Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Mantido

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. 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 60 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 19 horas e 10 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Lúcio Angnes – USP

Prof. Dr. Claudimir Lúcio do Lago – USP

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

Profª Dra. Djeneine de Souza – UFU/Patos de Minas

Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter – IQUFU  
Orientador

## DEDICATÓRIA

*Às duas mulheres da minha vida:*

*À minha amada e companheira esposa Fabiângela*

*A minha amada e presente mãe Efigênia, referência pessoal e profissional*

*O amor e força de vontade de vocês inspiram todos os dias da minha vida*

*Tenho a felicidade de ter vocês ao meu lado buscando um futuro melhor*

*Dedico esta tese*

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por sempre estar presente em todos os momentos e me guiando nesta jornada da vida. Neste momento singelamente agradeço pela conquista desta vitória.
- A toda a minha família (de Uberlândia e Monte Alegre) pela motivação, carinho e força dados nos momentos bons e ruins: Efigênia, Rubens, Alessandro, Diego, Edson, Vanda e Guilherme, muito obrigado por tudo. Sempre terão meu amor e respeito.
- À minha mais recente família, que me acolheu com tanto amor e respeito: Fabiângela, Joel, Alzira, Fernando, Rubbiane, Fabiano e Priscila. Aos meus sobrinhos, frutos desta família maravilhosa: Nathália, Isabella (também afilhada) e Rafael.
- Ao meu orientador prof. Dr. Eduardo Mathias Richter, pelos ensinamentos, amizade, confiança, humildade, incentivo e respeito sempre oferecidos. Seu esforço, dedicação e história de vida contagiam a mim e todos os seus alunos.
- Ao meu co-orientador prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Munoz, pelos ensinamentos, amizade, humildade e compromisso. Estas qualidades enaltecem o seu trabalho já bastante reconhecido. Obrigado por fazer parte da nossa equipe do laboratório.
- Aos profs. Drs. Lúcio Angnes, Claudimir Lúcio do Lago, André Luiz dos Santos e Djenaine de Souza pelo aceite de participação nesta banca de defesa de tese e pelas enormes contribuições oferecidas para este trabalho.
- Ao meu primeiro orientador prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras (professor e pesquisador exemplar), pela amizade e contribuições dadas na iniciação científica.
- Ao prof. Dr. Valdir Souza Ferreira pela sua ajuda, confiança e acolhimento no laboratório de pesquisa do departamento de Química da UFMS (Campo Grande-MS).
- Aos amigos do Laboratório de Instrumentação Analítica e Eletroquímica Aplicada, pela amizade, respeito e pelos inúmeros momentos de descontração, discussão, ajuda e troca de experiências: Denise, Rafael (Pisquilha), Rodrigo (Banana), Tatielli, Thiago, Eduardo (Dudu), Polyana, Mariana, Florence e Joyce. Em especial agradeço aos amigos Rafael e Rodrigo que tanto ajudaram nesta tese e que sempre aceitaram com muito respeito alguns questionamentos e orientações nos seus projetos de pesquisa. Desejo todo o sucesso na vida pessoal e profissional na vida de vocês.

- Aos ex-companheiros (sempre amigos) dos laboratórios de pesquisa do IQUFU que, com muito mérito, hoje são profissionais em instituições de ensino e pesquisa: Adriano (UFSCAR), Wallans (UFVJM), Lucas Caixeta (IFGO), Abílio (IQ-UFU), Moacir (IQ-UFU), Carla (UFTM), Daiane (IFMT), Diego (IQ-UFU), Lucas Franco (UFVJM) e Daniel (UFBA).
- Aos amigos de longa data que mesmo à distância sempre demonstraram respeito e amizade: Túlio, Hugo, Moacir, Renato, Felipe, Henrique e Alisson.
- Aos recentes amigos servidores do IFMS-Três Lagoas, pela parceria e por tornar o ambiente de trabalho bastante agradável: Ana Carina, Adilson, Adriana, Alan, Andreza, Ângelo, Ápio, Augusto, Beto, Carmen, Camila, Cíntia, Edson, Everton, Joel, Guilherme, Gilmar, Girlane, Jaqueline, Kleber, Mauro, Paulo, Renata, Rhasla, Suelen e Thiago. Em especial agradeço os amigos de república Evandro (IFMS), Cadu (IFMS), Felipe (IFMS), Guga (UEL) e Alessandro (IFTM). Obrigado a todos pela amizade e contribuições que me fazem a cada dia crescer como pessoa e na carreira docente.
- Ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida (número do processo: 141972 / 2009-2).
- À FAPEMIG e ao CNPq, pela ajuda financeira concedida em eventos científicos.
- Ao Instituto de Química (IQ-UFU) pelo espaço concedido e pela oportunidade de desenvolver praticamente toda a minha carreira até o momento. Agradeço aos seus servidores pela paciência, colaboração e demonstração de amizade: Manuel (“in memoriam”), Waldomiro, Carlão, Faria, Francisco, Sérgio, Reinaldo, Wendell, Yaico, Moacir, Otávio, Edmar, Edmilson, André, Ildo, Ivan, Buiate, Mayta e Marilda.

# ÍNDICE

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE TABELAS .....	viii
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	ix
TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O DOUTORAMENTO.....	x

## **1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO..... 1**

1.1. Considerações Gerais .....	2
1.2. Análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês "Flow injection analysis").....	4
1.3. Análise por injeção em batelada (BIA: do inglês "Batch injection analysis").....	8
1.4. Eletrodos compósitos.....	14
1.5. Sensores modificados com azul da Prússia (FeHCF) .....	17
1.6. Eletrodos de filme de diamante dopado com boro (BDD).....	21
1.7. Determinações simultâneas com detecção eletroquímica .....	24
1.8. Informações sobre os compostos e amostras avaliados na tese .....	26
1.9. Justificativas .....	32
1.10. Objetivos .....	33

## **2. PARTE EXPERIMENTAL .....** 34

2.1. Materiais, reagentes, soluções e pré-tratamento das amostras .....	35
2.2. Preparação do compósito fluido condutor .....	36
2.3. Imobilização de azul da Prússia (AP) no eletrodo compósito .....	37
2.4. Instrumentação .....	39
2.4.1. Eletrodos de trabalho.....	39
2.4.1.1. Eletrodos compósitos:.....	39
2.4.1.2. Eletrodos de diamante dopado com boro (BDD):.....	41
2.4.2. Sistema FIA .....	42
2.4.3. Sistema BIA.....	43
2.5. Estudos de caracterização do eletrodo compósito modificado com AP .....	47

2.6. Aplicações dos eletrodos compósitos modificados com AP .....	48
2.6.1. Sensor “3 em 1” adaptado ao sistema FIA.....	48
2.6.2. Eletrodo compósito em sistema BIA .....	48
2.7. Aplicações do eletrodo de diamante dopado com boro em sistema BIA.....	49
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>50</b>
3.1. Estudos de caracterização do eletrodo compósito modificado com AP .....	51
3.1.1. Síntese de partículas de AP para modificação no corpo do compósito (pAP <sub>1</sub> /pAP <sub>2</sub> ) .....	51
3.1.2. Partículas de AP presentes no ET (pAP <sub>2</sub> ) versus filme de AP eletrodepositado....	55
3.1.3. Otimizações do compósito fluido modificado com pAP <sub>2</sub> .....	57
3.1.4. Durabilidade do compósito fluido.....	60
3.2. Aplicações dos eletrodos compósitos modificados com azul da Prússia.....	62
3.2.1. Sensor “3 em 1” adaptado ao sistema FIA.....	62
3.2.1.1. Otimizações no sistema FIA .....	62
3.2.1.2. Determinação de peróxido de hidrogênio em antisséptico bucal .....	63
3.2.1.3. Determinação de peróxido de hidrogênio em leite por FIA .....	65
3.2.2. Eletrodo compósito modificado em sistema BIA .....	67
3.3. Aplicações do eletrodo de BDD adaptado ao sistema BIA.....	73
3.3.1. Determinações simultâneas com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (MPA).....	73
3.3.1.1. Paracetamol (PA) e Cafeína (PA) .....	74
3.3.1.1.1. Otimizações no sistema BIA-MPA .....	78
3.3.1.1.2. Aplicações em formulações farmacêuticas.....	83
3.3.1.2. Dipirona (DI) e Cafeína (CA) .....	87
3.3.1.3. TBHQ, BHA e BHT .....	92
3.3.1.3.1. Otimizações .....	96
3.3.1.3.2. Aplicações.....	103
<b>4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>109</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>112</b>



## RESUMO

*SILVA, Rodrigo Amorim Bezerra. 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. Uberlândia: Instituto de Química, UFU, junho de 2012. Tese de doutorado.*

Esta tese apresenta algumas potencialidades dos sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) e análise por injeção em batelada (BIA) acopladas à detecção amperométrica para o desenvolvimento de métodos de rotina úteis em alguns setores industriais, como o alimentício, farmacêutico e de biocombustíveis. Nesta perspectiva, foi empregado um eletrodo compósito modificado com azul da Prússia na determinação de peróxido de hidrogênio em leite e antisséptico bucal. Além disso, um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) foi usado em determinações simultâneas de fármacos presentes na mesma formulação farmacêutica (paracetamol e cafeína; dipirona e cafeína) e de três antioxidantes adicionados em biodiesel: terc-butilhidroquinona (TBHQ), butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT).

O eletrodo compósito modificado com azul da Prússia foi construído a partir de um compósito fluído preparado em laboratório (grafite / adesivo epóxi / ciclohexanona / partículas de azul da Prússia). Os melhores resultados foram obtidos quando o grafite modificado com azul da Prússia foi adicionado no compósito fluído em proporções de até 30 % (m/m). Este compósito modificado foi inserido em dois distintos materiais suporte: (1) ponteira de micropipeta ( $\varnothing = 1,6$  mm, sensor “3 em 1”); (2) tubo de poliamida ( $\varnothing = 7,2$  mm). Estes eletrodos foram utilizados em sistemas FIA e BIA e o peróxido de hidrogênio foi detectado seletivamente por detecção amperométrica. Empregando os dois sistemas eletroquímicos e adequadas condições experimentais (eletrólito: KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH = 7,2); volume injetado: 100 µL; vazão (FIA): 16,7 µL s<sup>-1</sup>; velocidade de injeção (BIA): 100 µL s<sup>-1</sup>) foi obtida uma recuperação de peróxido próxima a 100 % nas amostras de leite e antisséptico bucal. Os métodos desenvolvidos por FIA e BIA apresentaram elevada frequência analítica (100 h<sup>-1</sup> e 80 h<sup>-1</sup>) e baixos limites de detecção (0,8 µmol L<sup>-1</sup> e 0,19 µmol L<sup>-1</sup>).

Em outra proposta, os procedimentos de determinação simultânea (fármacos e antioxidantes) foram baseados em análise por injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos (BIA-MPA). Na determinação simultânea de paracetamol e cafeína, cada pulso de potencial otimizado foi aplicado em um eletrodo

de BDD com um objetivo específico: a) + 1,20 V (40 ms): oxidação do paracetamol e quantificação seletiva; b) + 1,55 V (40 ms): oxidação de ambos os analitos. A cafeína pode ser quantificada subtraindo-se as correntes obtidas em ambos os pulsos.

Na determinação simultânea de dipirona e cafeína o mesmo esquema foi utilizado. Porém, os pulsos de potencial aplicados foram + 1,10 V e + 1,55V. As condições experimentais otimizadas na determinação dos fármacos foram: tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (eletrólito suporte), volume injetado = 100 µL, velocidade de injeção = 156 µL s<sup>-1</sup> e tempo de pulso de potencial: 40 ms. Nestas condições, o sistema BIA-MPA apresentou alta frequência analítica (160 injeções por hora), elevada precisão (DPRs < 2%, n = 10) e baixos limites de detecção (paracetamol: 1,72 µmol L<sup>-1</sup>; cafeína: 0,84 µmol L<sup>-1</sup>; dipirona: 0,72 µmol L<sup>-1</sup>).

Para a determinação simultânea de TBHQ, BHA e BHT por BIA-MPA os seguintes pulsos de potencial foram aplicados sequencialmente no eletrodo de diamante dopado com boro: a) + 0,6 V (50 ms): oxidação do TBHQ e seletiva quantificação; b) + 0,8 V (50 ms): oxidação de TBHQ e BHA sem a interferência de BHT; c) + 1,3 V (50 ms): oxidação de TBHQ, BHA e BHT. Simples expressões matemáticas e fatores de correção foram utilizados na obtenção das correntes de oxidação de cada analito. Na determinação simultânea destes compostos em biodiesel, uma solução mista de ácido clorídrico e cloreto de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> em 50 % de etanol (v/v) foi utilizada como eletrólito suporte. As condições experimentais otimizadas foram as seguintes: volume injetado = 200 µL, velocidade de injeção = 256 µL s<sup>-1</sup> e velocidade de agitação = 2200 rpm. Deste modo, o sistema BIA-MPA apresentou os seguintes resultados, respectivamente a TBHQ / BHA / BHT: limites de detecção de 2,30 µmol L<sup>-1</sup> / 0,18 µmol L<sup>-1</sup> / 0,54 µmol L<sup>-1</sup>, DPRs (n = 20) de 0,68 % / 0,99 % / 1,75 % e frequência analítica de 120 injeções hora. Os resultados obtidos na determinação simultânea destes antioxidantes em biodiesel de soja demonstraram uma recuperação próxima a 100 % para TBHQ e BHA e próximo a 50 % para BHT.

**Palavras-chave:** FIA, BIA, eletrodo compósito de grafite/epóxi, diamante dopado com boro, Azul da Prússia, peróxido de hidrogênio, leite, fármacos, antioxidantes sintéticos, amperometria de múltiplos pulsos, azul da Prússia, determinação simultânea.

## ABSTRACT

SILVA, Rodrigo Amorim Bezerra. Characterizations and analytical applications of composite electrodes modified with Prussian blue and simultaneous determinations by batch injections analysis using a single working electrode. Uberlândia: Instituto de Química, UFU, junho de 2012. Doctorate thesis.

The present thesis demonstrates some potentialities of flow injection analysis (FIA) and batch injection analysis (BIA) coupled with amperometric detection to the development of routine methods applicable in industry (food, pharmaceuticals and biofuels). In this way, a composite electrode modified with Prussian blue was used to determination of hydrogen peroxide in milk and antiseptic mouthwash. Moreover, a boron-doped diamond electrode was employed in simultaneous determinations of pharmaceuticals presents in commercial tablets (paracetamol and caffeine; dipyrone and caffeine) and three biodiesel preservatives: tert-butylhydroquinone (TBHQ), butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT).

The Prussian-blue bulk modified graphite-composite electrode was made from a fluid graphite-composite prepared in laboratory (graphite / epoxy adhesive / cyclohexanone / graphite modified with Prussian blue). The best results were obtained when the graphite modified with Prussian blue were added in the fluid composite in proportion of up to 30 % (m/m). This modified composite was inserted in distinct supporting materials: (1) micropipette tip ( $\varnothing = 1.6$  mm, three-electrode-integrated sensor) and (2) polyamide tube ( $\varnothing = 7.2$  mm). Respectively, these electrodes were used in FIA and BIA systems and hydrogen peroxide was selectively detected by amperometry. Employing both electrochemical systems and appropriate experimental conditions (supporting electrolyte:  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl and  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer solution (pH = 7.2); injected volume:  $100 \text{ }\mu\text{L}$ ; flow rate (FIA):  $16.7 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ ; dispensing rate (BIA):  $100 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ ), recovery values close to 100 % were obtained for milk and antiseptic mouthwash samples. The FIA and BIA methods showed high analytical frequency ( $100 \text{ h}^{-1}$  and  $80 \text{ h}^{-1}$ ) and low limits of detection ( $0,8 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  and  $0,19 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

In another aim, the methods for simultaneous determinations (pharmaceuticals and antioxidants) were based on batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection (BIA-MPA). In the simultaneous determination of paracetamol

and caffeine, each optimized potential pulse was applied in sequence on boron-doped diamond working electrode for a specific purpose: a) +1.20 V (40 ms): paracetamol oxidation and selective quantification; b) +1,55 V (40 ms): oxidation of both compounds. Caffeine can then be quantified by subtraction of the currents obtained from both potential pulses and using a correction factor.

In the simultaneous determination of dipyrone and caffeine the same strategy was employed. However, the potential pulses adopted were +1.1 V and +1.55V. The experimental conditions optimized to the analysis of pharmaceuticals were: 0.1 mol L<sup>-1</sup> acetate buffer (supporting electrolyte), injected volume = 100 µL and dispensing rate = 156 µL s<sup>-1</sup>. In these conditions, BIA-MPA presented high-throughput analysis (160 injections per hour), elevated precision (RSDs < 2%, n = 10) and low limits of detection (paracetamol: 1.72 µmol L<sup>-1</sup>; caffeine: 0.84 µmol L<sup>-1</sup>; dipyrone: 0.72 µmol L<sup>-1</sup>).

In the simultaneous determination of TBHQ, BHA and BHT by BIA-MPA, the following potential pulses were applied in the BDD working electrode: a) + 0.6 V (50 ms): TBHQ oxidation and selective quantification; b) + 0.8 V (50 ms): TBHQ and BHA oxidations without interference of BHT; c) + 1.3 V (50 ms): oxidation of TBHQ, BHA and BHT. Simple mathematic equations (and correction factors) were used to obtain the currents of each compound. In the simultaneous determination of these compounds in biodiesel, hydroethanolic (50 % ethanol, v/v) containing 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl + HCl solution was used as supporting electrolyte. The optimized experimental conditions were: injected volume: 200 µL; dispensing rate: 256 µL s<sup>-1</sup>; stirring rate of BIA cell: 2200 rpm. In these conditions, the BIA-MPA exhibited the following results, respectively to TBHQ / BHA / BHT: limits of detection of 2.30 µmol L<sup>-1</sup> / 0.18 µmol L<sup>-1</sup> / 0.54 µmol L<sup>-1</sup>, RSD (n = 20) of 0.68 % / 0.99 % / 1.75 % and analytical frequency of 120 injections per hour. After the simultaneous determination of these antioxidants in soybean biodiesel we obtained recovery close to 100 % to TBHQ and BHA and close to 50 % to BHT.

**Palavras-chave:** FIA, BIA, graphite-epoxy composite working electrode, boron-doped diamond working electrode, Prussian blue, hydrogen peroxide, pharmaceuticals, synthetic antioxidants, multiple pulse amperometry, simultaneous determinations.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> (A) Componentes de um sistema FIA típico de linha única. (B) Esquema do gradiente de concentração dos padrões e amostras e (C) sinais analíticos obtidos.....	5
<b>Figura 2.</b> Esquema de uma típica célula BIA. ....	9
<b>Figura 3.</b> Esquema dos picos obtidos num sistema BIA com detecção amperométrica. ....	11
<b>Figura 4.</b> Número de artigos publicados relacionados ao sistema BIA.....	13
<b>Figura 5.</b> Voltamograma cíclico característico do FeHCF.....	18
<b>Figura 6.</b> Esquema do mecanismo de redução catalítica do $H_2O_2$ nos sensores de AP. ....	19
<b>Figura 7.</b> Número de artigos publicados relacionados ao eletrodo de BDD.....	23
<b>Figura 8.</b> Diferentes configurações dos eletrodos compósitos empregados na tese.....	40
<b>Figura 9.</b> Esquema da construção do ET compósito empregado no sistema BIA.....	41
<b>Figura 10.</b> Esquema da construção do eletrodo de BDD fixado em suporte de aço. ....	41
<b>Figura 11.</b> (A) Esquema e (B) imagem do sistema BIA utilizado na tese (célula n° 1).....	44
<b>Figura 12.</b> (A) Esquema e (B) imagem do sistema BIA utilizado na tese (célula n° 2).....	45
<b>Figura 13.</b> Imagem dos componentes individuais da célula BIA n° 2.....	46
<b>Figura 14.</b> Voltamogramas cíclicos do eletrodo: (A) compósito não modificado; (B) compósito contendo 2,15 % (m/m) de $pAP_1$ e (C) 2,15 % (m/m) de $pAP_2$ .....	52
<b>Figura 15.</b> Amperogramas obtidos em dois eletrodos compósitos modificados ( $pAP_1$ e $pAP_2$ ) por injeções sucessivas de solução de $H_2O_2$ em célula sob agitação.....	53
<b>Figura 16.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> após suaves polimentos com eletrodos compósitos contendo $pAP_1$ (A) e $pAP_2$ (B). ....	54
<b>Figura 17.</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de baixa resolução obtida da superfície de um eletrodo compósito de grafite contendo 2,15 % de $pAP_2$ . ....	54
<b>Figura 18.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> nos eletrodos de filme de AP eletrodepositado (CV/AP, C/AP) e de $pAP_2$ no corpo do compósito. ....	56
<b>Figura 19.</b> (A) Sensibilidades e (B) sensibilidades residuais* obtidas nos eletrodos de filme de AP eletrodepositado (CV/AP, C/AP) e de $pAP_2$ no corpo do compósito .....	56
<b>Figura 20.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> com os eletrodos compósitos contendo diferentes proporções de Gr- $pAP_2$ : Gr.....	58
<b>Figura 21.</b> Curvas de calibração para eletrodos em diferentes proporções de Gr- $pAP_2$ : Gr .....	59
<b>Figura 22.</b> Curva de calibração média de cinco eletrodos de composição 30:70 (Gr- $pAP_2$ :Gr)..	60
<b>Figura 23.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> para o estudo da durabilidade do compósito fluido: (A) não modificado e (B) modificado com $pAP_2$ .....	61

<b>Figura 24.</b> Amperogramas de $H_2O_2$ em fluxo para a otimização das variáveis do sistema FIA ..	62
<b>Figura 25.</b> (A) Amperograma obtido (FIA) para injeções de distintas soluções padrão de $H_2O_2$ e duas amostras de antisséptico bucal e (B) respectivas curvas de calibração. ....	64
<b>Figura 26.</b> Recuperações de $H_2O_2$ calculadas nas amostras de leite (desnatado e integral) submetidas a distintas diluições. ....	66
<b>Figura 27.</b> (A) Amperogramas para injeções (FIA) de distintas soluções padrão de $H_2O_2$ e amostras diluídas de leite desnatado e integral e (B) respectiva curva de calibração. ....	67
<b>Figura 28.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos comparativos entre eletrodos modificados com AP e não modificados nos sistema FIA e BIA.....	68
<b>Figura 29.</b> Injeções de diferentes volumes de soluções de $H_2O_2$ no sistema BIA (A) e respectivas correntes e frequências analíticas obtidas (B) .....	69
<b>Figura 30.</b> Injeções de soluções de $H_2O_2$ no sistema BIA em diferentes velocidades de injeção (A) e respectivas correntes e frequências analíticas obtidas (B). ....	70
<b>Figura 31.</b> Amperogramas obtidos para injeções de soluções de $H_2O_2$ no sistema BIA em concentrações crescentes (A) e crescentes e decrescentes (B).....	71
<b>Figura 32.</b> (A) Amperograma obtido para injeções de soluções padrão de $H_2O_2$ em concentrações crescentes, amostra de leite diluído dopado e não dopado com $H_2O_2$ ; (B) Dez injeções de uma mesma solução de leite dopado com $H_2O_2$ .....	72
<b>Figura 33.</b> (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de TAC $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com o eletrodo compósito e eletrodo de BDD; Amperogramas para injeções de solução contendo PA ou CA no sistema BIA com o ET de compósito (B) e BDD (C). ....	74
<b>Figura 34.</b> (A) Esquema da sequência de pulsos de potencial aplicados no ET de BDD para a investigação do comportamento eletroquímico de PA e CA; (B) MPA para PA e CA; (C) Voltamogramas hidrodinâmicos de PA e CA.....	75
<b>Figura 35.</b> Mecanismos das reações de oxidação de PA e CA. ....	76
<b>Figura 36.</b> (A) Esquema da sequência de pulsos aplicados no BDD para a detecção simultânea de PA e CA; (B) MPA obtidos para injeções de soluções de PA, CA e mistura.....	77
<b>Figura 37.</b> Correntes obtidas para PA em função do tempo de aplicação dos pulsos de potencial (A), volume injetado (B) e velocidade de injeção (C) .....	80
<b>Figura 38.</b> (A) DPR das correntes monitoradas e do fator para injeções de solução contendo PA; Amperogramas adquiridos em tempo de pulso de 40 ms (B) e 400 ms (C). ....	82
<b>Figura 39.</b> Amperogramas obtidos para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de PA (A) ou CA (C) e respectivas curvas de calibração calculadas (B).....	84

<b>Figura 40.</b> Amperogramas (BIA-MPA) após injeções de distintas soluções de PA e CA (padrões) e duas formulações farmacêuticas; (B) respectivas curvas de calibração .....	86
<b>Figura 41.</b> (A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de solução contendo PA e CA no sistema BIA-MPA e (B) respectivas correntes de oxidação de PA e CA. ....	87
<b>Figura 42.</b> (A) Esquema da sequência de pulsos aplicados no BDD para a detecção simultânea de DI e CA; (B) MPA obtidos para injeções de soluções de PA e CA e (C) respectivos voltamogramas hidrodinâmicos.....	88
<b>Figura 43.</b> Mecanismos das reações de oxidação de DI.....	89
<b>Figura 44.</b> (A) Esquema da sequência de pulsos aplicados no BDD para a detecção simultânea de DI e CA; (B) MPA obtidos para injeções de soluções de DI, CA e mistura.....	90
<b>Figura 45.</b> (A) Amperogramas obtidos por BIA-MPA após injeções de soluções contendo misturas de DI e CA em concentrações crescentes e uma formulação farmacêutica e (B) respectivas curvas de calibração obtidas para DI e CA. ....	91
<b>Figura 46.</b> (A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de solução de DI e mistura (DI + CA) e (B) respectivas correntes de oxidação de DI e CA. ....	92
<b>Figura 47.</b> (A) Esquema da sequência de pulsos aplicados no BDD; (B) BIA-MPA obtidos para injeções de soluções de TBHQ, BHA ou BHT; (C) voltamogramas hidrodinâmicos. ....	93
<b>Figura 48.</b> Mecanismos das reações de oxidação de TBHQ, BHA e BHT .....	94
<b>Figura 49.</b> (A) Sequência de pulsos aplicados no eletrodo de BDD; (B) BIA-MPA obtidos após injeções de soluções de TBHQ, BHA, BHT e misturas de dois ou três componentes. ....	95
<b>Figura 50.</b> MPA obtidos para injeções de solução padrão contendo TBHQ, BHA e BHT sob diferentes volumes injetados.....	98
<b>Figura 51.</b> Perfil dos picos amperométricos obtidos na injeção de solução contendo mistura de TBHQ, BHA e BHT em distintas condições do sistema BIA-MPA.....	99
<b>Figura 52.</b> Superfícies de resposta (frequência analítica, ruído, DPR) e respectivas equações matemáticas obtidas para o TBHQ. ....	101
<b>Figura 53.</b> Superfícies de resposta (DPR) para BHA e BHT.....	102
<b>Figura 54.</b> Amperogramas e respectivas curvas de calibração obtidas para injeções de soluções contendo TBHQ ou BHA ou BHT em concentrações crescentes.....	103
<b>Figura 55.</b> (A) BIA-MPA após injeções de soluções mistas de TBHQ, BHA e BHT (padrões) e sete amostras simuladas; (B) respectivas curvas de calibração. ....	104
<b>Figura 56.</b> (A) BIA-MPA obtidos para injeções sucessivas de solução mista contendo TBHQ, BHA e BHT; (B) respectivas correntes de oxidação de TBHQ, BHA e BHT. ....	106

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Alguns dados estruturais e propriedades físicas do PA, DI e CA[149] .....	29
<b>Tabela 2.</b> Estruturas e algumas propriedades físicas do TBHQ, BHA e BHT[149].....	30
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros voltamétricos dos eletrodos compósitos contendo diferentes proporções de grafite modificado com AP (Gr-pAP <sub>2</sub> ) e grafite puro (Gr) .....	58
<b>Tabela 4.</b> Curvas de calibração e figuras de mérito obtidas na detecção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	64
<b>Tabela 5.</b> Comparação dos resultados obtidos pelo método proposto e por titulação iodométrica na determinação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em amostras de antisséptico bucal. ....	64
<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em amostra de antisséptico bucal empregando o sensor “3 em 1” acoplado ao sistema FIA .....	65
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em leite empregando o sistema BIA. ....	72
<b>Tabela 8.</b> Resultados da análise simultânea de PA e CA em medicamento por BIA-MPA .....	86
<b>Tabela 9.</b> Condições experimentais para a otimização das variáveis do sistema BIA-MPA para a determinação simultânea de TBHQ, BHA e BHT.....	99
<b>Tabela 10.</b> Resultados obtidos por BIA-MPA na determinação simultânea de TBHQ, BHA e BHT em amostras simuladas.....	106
<b>Tabela 11.</b> Figuras de mérito obtidas na determinação simultânea de TBHQ, BHA e BHT com eletrólito na proporção de 50:50 em volume .....	107
<b>Tabela 12.</b> Recuperações obtidas para TBHQ, BHA e BHT em amostras de biodiesel dopadas com TBHQ, BHA e BHT. ....	108



## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\varnothing_i$	Diâmetro interno
$\Gamma$	Excesso superficial
$\Delta E_p$	Diferença (módulo) entre os potenciais de pico catódico ( $E_{p_c}$ ) e anódico ( $E_{p_a}$ )
$\Delta I_p$	Diferença (em módulo) entre as correntes de pico catódica ( $I_{p_c}$ ) e anódica ( $I_{p_a}$ )
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AP</b>	Azul da Prússia – Hexacianoferrato de Ferro III
<b>BHA</b>	Butilhidroxianisol
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>BIA</b>	Análise por Injeção em batelada, do inglês “ <i>Batch Injection Analysis</i> ”
<b>BDD</b>	Diamante dopado com boro, do inglês “ <i>Boron-Doped Diamond</i> ”
<b>CA</b>	Cafeína
<b>CV</b>	Carbono vítreo
<b>DI</b>	Dipirona
<b>DPR</b>	Desvio padrão relativo
<b>EA</b>	Eletrodo auxiliar
<b>EPR</b>	Eletrodo de pseudo-referência
<b>ER</b>	Eletrodo de referência
<b>ET</b>	Eletrodo de trabalho
<b>FIA</b>	Análise por Injeção em Fluxo, do inglês “ <i>Flow Injection Analysis</i> ”
$I_{\max}$	Patamar de corrente
<b>LD</b>	Limite de detecção. $LD = (3 \times DP_{\text{Branco}} - C_L) / S$ , onde $C_L$ é o coeficiente linear e $S$ é a sensibilidade da reta de calibração.
<b>LQ</b>	Limite de quantificação. $LQ = (10 \times DP_{\text{Branco}} - C_L) / S$ .
<b>MPA</b>	Amperometria de múltiplos pulsos, do inglês “ <i>Multiple pulse amperometry</i> ”
<b>PA</b>	Paracetamol
<b>PVC</b>	Policloreto de vinila
<b>TAC</b>	Tampão acetato
<b>TBHQ</b>	Terc-butilhidroquinona
<b>TPH</b>	Tampão fosfato
<b>Web of Science (ISI)</b>	Instituto de Informação Científica (Base de dados de citação)

## TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O DOUTORAMENTO

### PUBLICAÇÕES EM REVISTAS CIENTÍFICAS:

1. Silva, R.A.B., Montes, R.H.O., Richter, E.M., Muñoz, R.A.A. *Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection. Food Chemistry*, **133**, (2012), 200-204.
2. Silva, R.A.B., Gimenes, D.T., Tormin, T.F., Muñoz, R.A.A., Richter, E.M. *Batch Injection Analysis with Amperometric Detection: Application for Simultaneous Analysis Using a Single Working Electrode. Analytical Methods*, **3**, (2011), 2804-2808.
3. Silva R.A.B., Silva A.T.C., Cunha R.R., de Oliveira A.L.B, Espindola F.S., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Development of a simple and fast electrochemical method to evaluate physical stress in athletes. Electroanalysis*, **23**, (2011), 2601-2606.
4. Silva W.C., Silva R.A.B., Muñoz R.A.A., Richter E.M., A simple strategy for simultaneous determination of paracetamol and caffeine using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection. *Electroanalysis*, **23**, (2011), 2764-2770.
5. Silva R.A.B., Montes, R.H.O., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Determinação de peróxido de hidrogênio em antisséptico bucal usando um microdispositivo contendo partículas de azul da Prússia. Química Nova*, **34**, (2011), 987-991.
6. Silva R.A.B., Rabelo A. C., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Three-Electrode-Integrated Sensor into a Micropipette Tip. Electroanalysis*, **22**, (2010), 2167-2171.
7. Silva R.A.B., Rabelo A. C., Bottecchia O.L., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Desenvolvimento, caracterização e aplicação eletroanalítica de um compósito fluido de adesivo epóxi, grafite e ciclohexanona. Química Nova*, **33**, (2010), 1398-1402.

### TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

1. Silva R.A.B., Ferreira V.S., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Estudos para a determinação simultânea dos antioxidantes TBHQ, BHA e BHT empregando BIA com detecção por amperometria de múltiplos pulsos. XX SIBAE. Fortaleza – CE / 25 a 30 de março de 2012.*
2. Silva R.A.B., Gimenes D.T., Cunha R.R.C., Muñoz R.A.A. Richter E.M., *O uso de padrão interno em sistemas de “batch injection analysis” como estratégia para minimizar erros gerados por injetores manuais. XX SIBAE. Fortaleza – CE / 25 a 30 de março de 2012.*
3. Silva R.A.B., Montes R.H.O., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Estudos eletroanalíticos comparativos entre eletrodos compósitos modificados com distintas partículas de hexacianoferrato de ferro. XX SIBAE. Fortaleza – CE / 25 a 30 de março de 2012.*
4. Gimenes D.T., Cunha R.R., Silva R.A.B., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Injeções reprodutíveis em sistema BIA usando seringas descartáveis: emprego do método do padrão interno. 16º ENQA. Campos do Jordão - SP / 23 a 26 de outubro de 2011.*
5. Silva R.A.B., Gimenes D.T., Tormin T.F., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *“Batch Injection Analysis” com determinação amperométria pulsada: aplicação em determinações simultâneas. (Apresentação oral). XVIII SIBEE. Bento Gonçalves – RS / 28 ago. a 01 de setembro de 2011.*

6. Silva R.A.B., Montes, R.H.O., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Determinação de peróxido em leite empregando "batch injection analysis" (BIA) e eletrodo modificado*. **34ª RASBQ. Florianópolis – SC / 23 a 26 de maio de 2011.**
7. Silva R.A.B., Barbosa T.G.G., Marinho J.Z., de Lima R.C., Muñoz R.A.A., Richter, E.M., *Emprego de nanopartículas de óxido de bismuto em eletrodos compósitos de grafite / Araldite®*. **IV CIAQA & X ENQAA. Cóncon – Chile / 14 a 17 de novembro de 2010.**
8. Silva W.C., Silva R.A.B., Muñoz R.A.A., Richter, E.M., *Determinação simultânea de paracetamol e cafeína em fármacos por FIA e detecção amperométrica*. **IV CIAQA & X ENQAA. Cóncon – Chile / 14 a 17 de novembro de 2010.**
9. Silva R.A.B., Meireles C.S., Rodrigues Filho G., Muñoz R.A.A., Richter E.M. *Construção de eletrodos compósitos de grafite e acetato de celulose obtido da reciclagem de caroço de manga*. **XXIV ERSBQ-MG. Viçosa – MG / 30 de outubro a 01 de novembro de 2010.**
10. Silva R.A.B., Montes, R.H.O., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Estudo comparativo da estabilidade de Azul da Prússia sob diferentes materiais de eletrodo na redução de  $H_2O_2$* . **XXIV Encontro regional da SBQ-MG. Viçosa – MG / 30 de outubro a 01 de novembro de 2010.**
11. Silva R.A.B., Montes, R.H.O., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Determinação de peróxido de hidrogênio em leite empregando um microdispositivo eletroquímico acoplado a sistema de análise por injeção em fluxo*. **50ª CBQ (ABQ). Cuiabá – MT / 10 a 14 de outubro de 2010.**
12. Silva A.T.C., Silva R.A.B., de Oliveira A.L.B., Espindola F.S., Richter, E. M. *Avaliação de uma metodologia amperométrica para o monitoramento do estresse físico de atletas*. **33ª Reunião Anual da SBQ. Águas de Lindóia – SP / 28 a 31 de maio de 2010.**
13. Silva R.A.B., Montes R.H.O., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Eletrodos de compósitos de grafite e adesivo epóxi Araldite® modificados com partículas de Azul da Prússia*. **33ª Reunião Anual da SBQ. Águas de Lindóia – SP / 28 a 31 de maio de 2010.**
14. Silva R.A.B., Montes R.H.O., Muñoz R.A.A., Richter E.M., *Determinação amperométrica em fluxo de  $H_2O_2$  em amostras de enxaguante bucal com eletrodo compósito de grafite/adesivo epóxi*. **33ª Reunião Anual da SBQ. Águas de Lindóia-SP / 28 a 31 de maio de 2010.**
15. Cunha R.R., Silva R.A.B., da Silva A.T.C., Espindola F.S., Richter E.M., *Monitoramento do nível de estresse físico através da análise de proteínas totais em saliva*. **15º ENQA e 3º CIAQA. Salvador-BA / 18 a 21 de outubro de 2009.**
16. Silva A.T.C., Cunha R.R., Silva R.A.B., Richter E.M., *Avaliação da insalubridade de um ambiente a exposição ocupacional pelo monitoramento de poluentes na saliva*. **15º ENQA e 3º CIAQA. Salvador-BA / 18 a 21 de outubro de 2009.**
17. Cunha R.R., Silva A.T.C., Duarte A.P.S., Silva R.A.B., Richter E.M., *Monitoramento do estresse físico pela proteína total da saliva via detecção amperométrica*. **IX Encontro Interno & XIII Seminário de Iniciação Científica. Uberlândia-MG / 19 a 20 de outubro de 2009.**
18. Silva R.A.B., Rabelo A.C., Richter E.M., *Construção e caracterização de um compósito de grafite para utilização como eletrodos em análises eletroquímicas e junção entre condutores*. **XVII SIBEE. Fortaleza-CE / 15 a 19 de abril de 2009.**

# ***INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO***

## 1.1. Considerações Gerais

Análises químicas são de vital importância 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 pesquisa ou de empresas de pequeno porte.

Algumas características devem estar presentes em metodologias analíticas para que sejam aplicáveis em qualquer laboratório, como: fácil automação, rapidez nas análises, mantendo adequada sensibilidade, seletividade, robustez, precisão e baixo custo. Neste sentido, as análises por injeção em fluxo (FIA – “Flow Injection Analysis”) [1] ou por injeção em batelada (BIA – “Batch Injection Analysis”) [2] satisfazem em quase sua totalidade estas características. Nos sistemas FIA, uma alíquota de amostra ou solução padrão é inserida em uma tubulação contendo uma solução transportadora com o fluxo direcionado no sentido de um detector. Nos sistemas BIA, esta alíquota é inserida diretamente sobre a superfície do detector, o que dispensa o uso de uma solução transportadora.

Na literatura, os procedimentos por FIA e BIA são encontrados acoplados a diversas técnicas instrumentais de detecção. No entanto, a detecção eletroquímica oferece algumas vantagens frente à detecção espectroscópica ou análises cromatográficas, por exemplo: a) as medidas podem ser normalmente realizadas sem etapas de purificações ou separações prévias [3]; b) o analito pode interagir diretamente com a superfície do ET, tornando desnecessária a adição de reagentes [3]; c) a análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas é possível [3]; d) baixo custo de aquisição e manutenção dos equipamentos e materiais utilizados; e) possibilidade do uso de materiais alternativos e dispositivos miniaturizados em análises em campo.

Dentre as técnicas eletroquímicas, a amperometria (convencional, pulsada e de múltiplos pulsos) é frequentemente utilizada. Na amperometria convencional, um

potencial é aplicado no eletrodo de trabalho (ET) durante um intervalo de tempo e então a corrente do processo redox (redução ou oxidação) de determinado analito é proporcional à sua concentração, desde que alguns parâmetros sejam mantidos constantes [3]. Na amperometria pulsada ou na amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês “multiple pulse amperometry”), dois ou mais pulsos de potencial podem ser aplicados de forma sequencial (ciclos sucessivos) no mesmo eletrodo em função do tempo. Portanto, é possível a criação de métodos mais versáteis, seja através da aplicação de potenciais de limpeza (reduzindo significativamente a passivação do ET, que é um problema frequentemente encontrado na detecção por amperometria convencional) ou a possibilidade da análise simultânea de dois analitos eletroativos contidos na mesma amostra [4]. A amperometria pulsada e a MPA são duas técnicas similares, a diferença básica está na aquisição do sinal de corrente. Na MPA, a leitura da corrente é possível em até 10 pulsos de potenciais diferentes (obtenção de 10 amperogramas diferentes “simultaneamente”), enquanto que na pulsada, somente um amperograma pode ser adquirido durante o experimento (o programa permite a aquisição de corrente em um pulso de potencial).

A extensa variedade de métodos analíticos com detecção amperométrica se deve a vantagens como a elevada sensibilidade e enorme quantidade de compostos eletroativos existentes. Além disso, as células eletroquímicas podem ser adaptadas com maior facilidade em diferentes arranjos experimentais (sistemas convectivos, estacionários) e construídas em dimensões convencionais ou reduzidas (emprego de microcélulas e/ou ultramicroeletrodos para medidas em até nanolitros). Adicionalmente, uma variedade de eletrodos de trabalho pode ser utilizada em detecções amperométricas. Como exemplos clássicos se enquadram os eletrodos de mercúrio, carbono vítreo, ouro, cobre, de platina, entre outros [3, 5]. No entanto, mais recentemente, o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) [5] vem recebendo destaque por apresentar várias características desejáveis em um eletrodo de trabalho, como ampla janela de potenciais de trabalho, baixa contaminação da superfície, boa resistência à passivação e baixa corrente capacitiva.

Outra classe de materiais largamente empregados são os eletrodos compósitos, que são preparados pela mistura de um polímero isolante com determinado(s)

material(is) condutor(es) de eletricidade. Com estes eletrodos podem ser obtidas características interessantes, como a renovação da superfície com um simples polimento [6], realização de análises em meios não-aquosos [7], e construção de eletrodos em dimensões reduzidas [8, 9]. Além disso, é possível a inserção de modificadores químicos e/ou biológicos no corpo do eletrodo, de forma a promover o aumento da seletividade e sensibilidade do mesmo, além da possibilidade da renovação da superfície de um eletrodo modificado através de um simples polimento [6, 10] (o que não é possível num eletrodo modificado somente na superfície).

Dentre os modificadores que podem ser adicionados a determinado eletrodo compósito se destacam os complexos formados por ânions de hexacianoferrato (HCF) com metais de transição. Estes materiais são interessantes para serem empregados em eletroquímica devido às suas propriedades catalíticas, eletrocromicas e de troca iônica [11]. Vários metais ou óxidos metálicos em distintos estados de oxidação (Fe, Cr, Cd, Ni, RuO, etc.) podem ser utilizados na síntese de diferentes HCFs [11]. Dentre estes, o mais usado é o hexacianoferrato de Fe (ou “Azul da Prússia”), devido ao baixo custo, rápida síntese e excelente atividade catalítica para a redução de O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

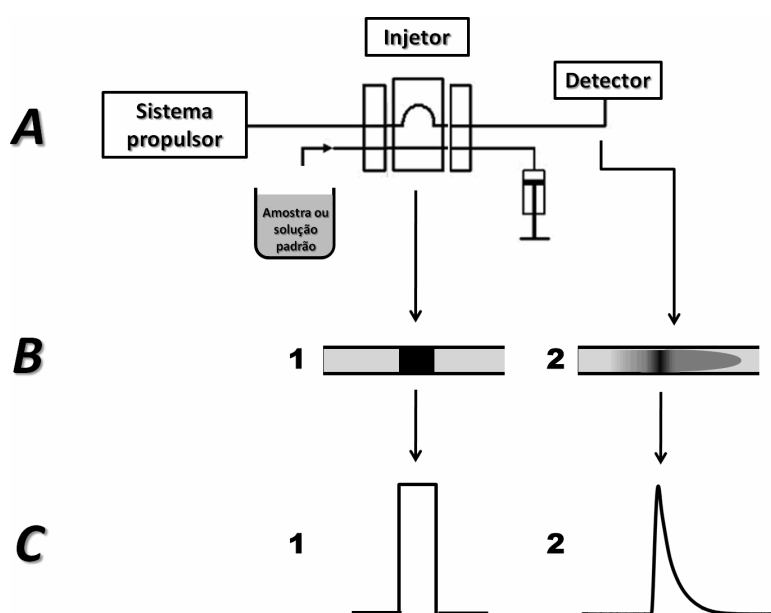
Nos capítulos posteriores são apresentados alguns aspectos teóricos e práticos sobre análises por Injeção em Fluxo (FIA) e em batelada (BIA) com detecção amperométrica, eletrodos compósitos, sensores baseados em azul da Prússia, eletrodos de diamante dopado com boro e análises simultâneas. Além disto, para cada assunto será abordada uma breve revisão bibliográfica.

## **1.2. Análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês “Flow injection analysis”)**

A técnica FIA foi divulgada pela primeira vez em 1975 por Ruzicka e Hansen [1]. Estes autores propuseram um sistema no qual era possível realizar análises químicas de maneira contínua, de forma que as medidas fossem realizadas rapidamente e com menor manipulação de amostras. Nesta técnica, realiza-se a injeção de uma amostra líquida em um fluxo transportador contínuo, que é constituído por uma solução adequada. A amostra injetada forma uma zona que posteriormente atravessa uma célula em fluxo, onde um detector medirá continuamente o parâmetro físico

desejado [1]. Resultados reproduzíveis e confiáveis podem ser obtidos em FIA, desde que as condições iniciais (vazão, volume injetado e dimensões do sistema) permaneçam inalteradas até o final do experimento.

Um arranjo experimental típico de um sistema FIA de linha única é composto basicamente por três componentes: sistema de propulsão dos líquidos, injetor de amostras e detector [12]. Na Figura 1 é apresentado o esquema geral de um sistema FIA de linha única e o perfil dos sinais analíticos obtidos.



**Figura 1.** (A) Disposição dos componentes de um sistema FIA típico de linha única. (B) Esquema do gradiente de concentração das amostras (ou padrões) criado em distintos momentos no fluxo transportador com os (C) sinais analíticos obtidos.

O sistema propulsor (Figura 1A) serve para impulsionar o líquido transportador da amostra (ou solução padrão), que é injetada durante o movimento deste fluxo. Fluidos podem ser transportados através das tubulações do sistema FIA por distintos mecanismos físicos. Propulsores de bomba de pistão, propulsão a gás, fluxo gravitacional, bombas peristálticas e bombas de membrana são alguns sistemas possíveis para movimentar a solução transportadora em uma tubulação. Porém, a bomba peristáltica é o propulsor mais utilizado, devido a maior versatilidade relativa (vazão constante gerada, controle da vazão por sistemas computadorizados, controle da vazão em várias tubulações simultaneamente, etc.). No entanto, as vazões



produzidas pelas bombas peristálticas são pulsadas, o que pode gerar ruídos nos detectores, principalmente nos eletroquímicos. Neste sentido, sistemas de propulsão alternativos que utilizam a pressão gerada por outras bombas (de membrana, por exemplo) são mais indicados [13]. Neste sistema, o acoplamento de uma coluna d'água possibilita maior comodidade na variação e controle da vazão [14]. É importante lembrar que bombas peristálticas mediante o uso de amortecedores de pulsos ("pulse damper") em linha também permitem a obtenção de vazões com reduzida pulsação [15].

O injetor (Figura 1A) introduz a amostra ou solução padrão no sistema em fluxo. O sistema de introdução empregado deve ser capaz de inserir um determinado volume de amostra na solução transportadora de maneira reprodutível e sem alterar a vazão do sistema FIA. Normalmente, nos sistemas FIA convencionais, volumes injetados são normalmente da ordem de 50 a 300  $\mu\text{L}$ . Dentre os injetores mais utilizados [16], o injetor manual do tipo proporcional construído em Piracicaba (Cena-USP) é usado em nosso grupo de trabalho [17].

O detector é responsável pela quantificação do analito conduzido pela solução transportadora. Este componente deve interagir de maneira física ou química com o analito de interesse. Os dados obtidos são armazenados e tratados em sistemas de registro apropriados (p. ex. softwares instalados em computadores) conectados ao detector. Os primeiros trabalhos envolvendo FIA empregavam detecção espectrofotométrica, porém, hoje são encontrados na literatura trabalhos com detecção por espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão atômica (ICP-AES), fluorimetria, quimioluminescência, potenciometria, voltametria e amperometria [18, 19], entre outros. Os detectores eletroquímicos apresentam algumas vantagens em relação aos demais, como o baixo custo de implementação, alta sensibilidade e relativa simplicidade (podem ser construídos em laboratório comum). Dentre estes, os detectores amperométricos são bastante utilizados [20].

Em amperometria, um potencial constante (amperometria convencional) ou dois ou mais pulsos de potencial (MPA ou amperometria pulsada) é (são) aplicado (s) no ET e uma reação de oxidação e/ou redução do analito de interesse deve ocorrer. As correntes referentes a estas conversões redox são monitoradas e podem ser

relacionadas com a concentração dos respectivos analitos [3]. Além disso, na maioria dos casos são utilizados sistemas de linha única (Figura 1A), devido à direta e instantânea conversão do analito na superfície do eletrodo de trabalho (ET). Portanto, a introdução de reatores e confluências (normalmente utilizados para a derivatização dos analitos) é geralmente desnecessária quando este tipo de detecção é empregada. Nesta técnica, uma célula eletroquímica contendo os eletrodos de trabalho, de referência (ER) e auxiliar (EA) normalmente é utilizada. No entanto, quando as dimensões do ET são micrométricas, a célula eletroquímica pode ter somente o ET e de referência (ER), pois a corrente gerada no sistema é tão pequena (na ordem de nA) que não gera uma variação significativa no potencial do ER.

Desvantagens da detecção amperométrica (emprego de eletrodos sólidos) estão relacionadas às modificações que ocorrem na superfície do ET durante as medidas. Em alguns casos, produtos da reação redox do analito ou constituintes das amostras podem adsorver na superfície do ET. Este fenômeno, conhecido como envenenamento ou passivação do eletrodo provoca a gradual diminuição da corrente monitorada, devido à proporcional redução da área disponível no ET. No entanto, trabalhos recentes vêm propondo maneiras de contornar este problema. Uma das alternativas emprega a técnica MPA, que torna possível aplicar alternadamente pulsos de potenciais de detecção e limpeza em função do tempo (tempo de duração de cada pulso na ordem de milissegundos). Esta estratégia pode possibilitar a remoção eletroquímica destes contaminantes da superfície do eletrodo ou mesmo impedir que a adsorção ocorra [4, 21]. Ainda explorando a MPA, é possível adicionar um padrão interno (PI) nas amostras e soluções padrão, de modo que o seu sinal seja detectado em potencial diferente do analito. Se a área disponível do ET diminui gradativamente, as correntes das duas espécies (analito e PI) também diminuem. Porém, a razão entre o sinal do analito e do PI permanece praticamente constante [22]. Outras estratégias podem ser utilizadas, como através do emprego de um ET que apresente reduzida contaminação (diamante dopado com boro, por exemplo) ou que tenha fácil renovação da superfície por simples polimentos mecânicos (eletrodos compósitos).

Em sistemas FIA, o perfil dos sinais obtidos são picos transientes (Figura 1C2) e suas características (largura e altura) são dependentes das condições peculiares de

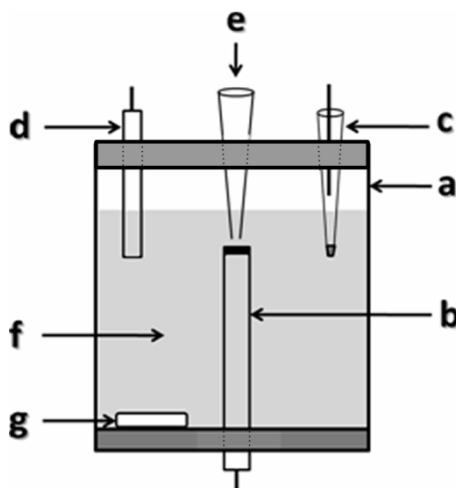
cada sistema. Para a compreensão do perfil destes picos é necessário verificar os fenômenos que ocorrem quando a amostra entra em contato com a solução transportadora. No momento da injeção da amostra líquida no percurso analítico, toda a zona da amostra está na mesma concentração (Figura 1B1). Porém, durante o percurso entre o injetor e o detector, a alíquota da amostra é submetida à chamada dispersão (Figura 1B2), que é proveniente devido ao atrito da solução com as paredes das tubulações e da difusão de concentração da zona que contém a amostra que permanece em contato com a solução transportadora. Este fenômeno explica os perfis transientes dos picos obtidos em qualquer sistema FIA (Figura 1C2). No entanto, as condições de cada sistema FIA (distância percorrida pela amostra, vazão, volume injetado, diâmetro interno do tubo) devem ser otimizadas de forma a minimizar tanto quanto possível a dispersão. Na ausência total de dispersão, os sinais obtidos seriam picos transientes simétricos e sem distorções (Figura 1C1) [12].

Os sistemas FIA iniciaram um novo ramo de pesquisa em Química Analítica. A partir do trabalho publicado por Ruzicka e Hansen (1975) até hoje foram encontrados na literatura (Web of Science, tópico "flow injection analysis") aproximadamente oito 8000 publicações científicas, sendo em torno de 1240 com detecção amperométrica. Estes sistemas se tornaram populares devido a várias características interessantes, como a baixa intervenção do analista, baixo consumo de reagentes, pequeno tempo de análise, simplicidade operacional, versatilidade, alta precisão e reprodutibilidade, além de um baixo custo de implantação. Algumas variações em relação ao sistema FIA de linha única, tal como FIA com confluências, com zonas coalescentes, monossegmentado, com reamostragem, parada de fluxo ("stopped flow") e cinética diferencial não são comuns quando é utilizada a detecção amperométrica. Por isso, discussões acerca das mesmas fogem ao objetivo desta tese. Uma vasta bibliografia abordando o tema FIA pode ser localizada na literatura [12, 20, 23-27].

### **1.3. Análise por injeção em batelada (BIA: do inglês "Batch injection analysis")**

BIA é uma técnica analítica divulgada pela primeira vez em 1991, através de um trabalho publicado por Wang e Taha [2]. Nesta técnica, diferentemente dos sistemas

FIA, a solução de análise é injetada diretamente na superfície do eletrodo de trabalho (configuração “wall jet”) localizado numa célula eletroquímica contendo um grande volume de eletrólito suporte e inerte (célula *BIA*). Na Figura 2 é apresentado o diagrama esquemático de uma célula BIA convencional.



**Figura 2.** Esquema de uma típica célula de BIA. a) Recipiente da célula; b) ET; c) ER; d) EA; e) Ponteira de micropipeta do injetor; f) Solução do eletrólito suporte; g) Barra magnética (opcional).

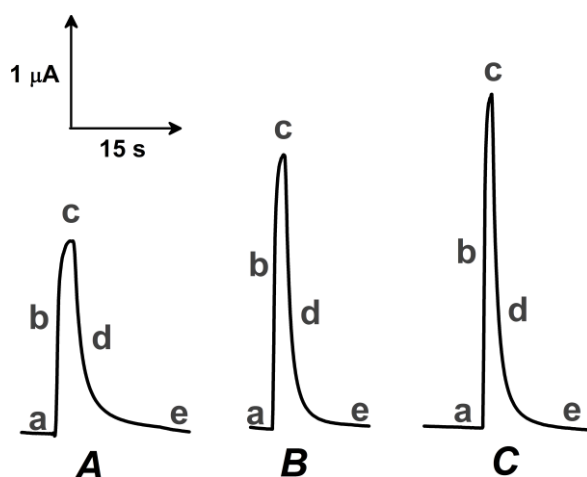
Numa célula BIA, o ET é posicionado na direção oposta à da injeção (Figura 1b), ou seja, ele se encontra numa posição invertida em relação à posição normalmente utilizada em células eletroquímicas. Para a injeção das soluções de análise pode ser utilizada uma micropipeta convencional ou uma micropipeta eletrônica [28]. Entretanto, a última fornece maior precisão, pois as condições (volume e principalmente velocidade de injeção) são programadas eletronicamente; deste modo, operadores com pouca (ou nenhuma) experiência podem efetuar as injeções no sistema de forma reprodutível. A ponteira da micropipeta é acomodada em um orifício (localizado na tampa da célula) posicionado na direção exatamente oposta (frontal) ao ET, de modo que todas as injeções sejam feitas com a mesma distância entre a ponteira e a superfície do ET (Figura 2e). O ET pode ser movido para cima ou para baixo, de modo a ajustar a melhor distância entre a superfície do eletrodo e a ponteira da micropipeta. Em outros dois orifícios localizados na tampa da célula são fixados o ER (Figura 2c) e EA (Figura 2d). Opcionalmente pode também ser inserida uma barra magnética (Figura 2g) para acelerar o transporte de massa no interior da célula. Por

último, é adicionada a solução do eletrólito suporte em volume suficiente para que os três eletrodos tenham contato elétrico entre si.

Os primeiros trabalhos publicados empregando BIA utilizavam como técnica de detecção a amperometria convencional (potencial constante) [2, 28-30]. Nestes trabalhos, os sinais obtidos são picos transientes, tal como os obtidos em FIA (sendo que a altura ou área dos picos é proporcional à concentração do analito). Este perfil de sinal é explicado por alguns fenômenos observados nos diferentes momentos da injeção. Antes da injeção (Figura 3a), observa-se uma corrente constante referente ao eletrólito suporte (ausência de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução); no início da injeção (Figura 3b) existe o aumento abrupto da corrente, referente à conversão redox do analito (oxidação ou redução) que está sendo transportado mecanicamente (micropipeta eletrônica) até a superfície do ET; no final da injeção (Figura 3c) é alcançado um valor máximo de corrente (patamar de corrente –  $I_{\text{máx}}$ ), que permanece constante durante um pequeno intervalo de tempo; após o fim da injeção ocorre uma forte queda na corrente (Figura 3d), que é referente a mudança do transporte mecânico (micropipeta) para o transporte de massa por difusão. Nesta etapa, o analito começa a ser diluído pelo eletrólito suporte (difusão de concentração) até que se restabeleçam as condições iniciais do equilíbrio existente antes da injeção (Figura 3e). Esta remoção do analito da superfície do ET (“lavagem”) pode ser acelerada através de agitação magnética (Figura 2g).

Algumas condições de trabalho típicas de sistemas BIA com detecção amperométrica são:

- ✓ Células com volume total entre 10,0 e 200,0 mL;
- ✓ Volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$ , pois geralmente a  $I_{\text{máx}}$  é facilmente atingida com este volume injetado (para ET com diâmetro de 2 ou 3 mm). Assim, a injeção de volumes maiores causa somente o alargamento do pico devido ao maior período de injeção do analito.
- ✓ Distância entre a superfície do ET e a ponteira da micropipeta de 2 mm. O emprego de distâncias menores provoca efeitos de retorno (fluxo reverso) e distâncias maiores causam um aumento da dispersão da zona de amostra [30].



**Figura 3.** Picos obtidos no sistema BIA com detecção amperométrica convencional e as etapas de injeção: (a) antes da injeção; (b) durante a injeção; (c) final da injeção; (d) diluição do analito (“lavagem do ET”); (e) re-estabelecimento do equilíbrio inicial. Analito: paracetamol  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; Velocidades de injeção: (A)  $25 \mu\text{L s}^{-1}$ ; (B)  $42 \mu\text{L s}^{-1}$ ; (C)  $58 \mu\text{L s}^{-1}$ . Volume injetado:  $100 \mu\text{L}$ . Potencial aplicado:  $+1,20 \text{ V}$ .

Os sistemas BIA e FIA possuem várias características em comum, como: elevada frequência analítica, baixo consumo de amostras e reagentes, elevada sensibilidade e repetibilidade adequada no procedimento de injeção (em BIA, com o uso de pipeta eletrônica) [31]. Além disso, o fenômeno de passivação ou contaminação do ET é menor em relação aos sistemas em batelada, devido ao tempo relativamente curto de contato entre o analito e a superfície do eletrodo [32]. No entanto, a técnica BIA é menos versátil quando a derivatização do analito se faz necessária. Esta limitação ocorre devido a curta distância entre o injetor e o detector, minimizando o tempo em que o reagente e o analito permanecem em contato. Nestes casos, a cinética da reação entre o reagente adicionado no eletrólito e o analito deve ser suficientemente alta para que a reação ocorra. No entanto, num sistema BIA com detecção eletroquímica, a seletividade a um dado analito pode ser alcançada na superfície do ET [31]. Neste sentido, o emprego dos eletrodos quimicamente modificados (CME) tem sido objeto de estudo [33-38].

Apesar destas limitações, os sistemas BIA apresentam algumas vantagens em relação aos sistemas FIA:

- ✓ Geralmente apresentam melhor sensibilidade, pois a amostra é submetida a mínimos efeitos de dispersão no momento da injeção (ausência de fluxo transportador em direção ao ET) [31, 39];
- ✓ Possibilidade de injeção das amostras sem prévia diluição no eletrólito suporte, pois a força iônica da solução permanece praticamente inalterada (um volume pequeno de solução amostra é injetada em meio a uma solução de eletrólito de volume muito superior) [2];
- ✓ Geração de um menor volume de resíduos;
- ✓ Nos sistemas BIA não existem bombas (peristálticas ou de membrana), válvulas ou tubulações (tal como FIA). Portanto, problemas associados a vazamentos, formação de bolhas no sistema e variações na vazão são minimizados [31];
- ✓ Os arranjos experimentais utilizados em BIA são mais simples e robustos;
- ✓ As células de BIA podem ser miniaturizadas, pois o perfil hidrodinâmico da injeção “wall jet” elimina a necessidade de uma enorme diluição, logo células com menores volumes de trabalho podem ser utilizadas [40];
- ✓ Metodologias adequadas para o desenvolvimento de métodos de análise em campo (metodologias portáteis).

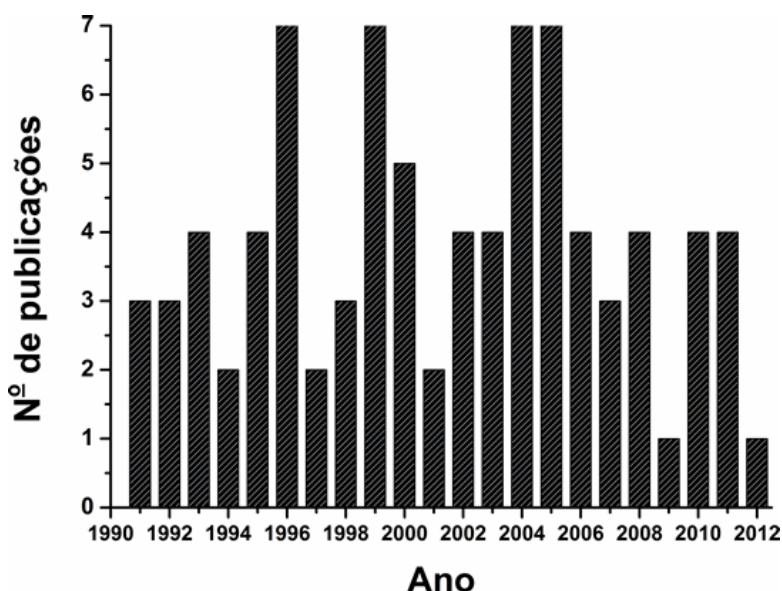
### **1.3.1. Aplicações – BIA**

Numa revisão bibliográfica realizada no portal de periódicos “Web of Science” em janeiro de 2012, nota-se que após 21 anos de divulgação do sistema BIA, poucas publicações foram encontradas. Digitando a palavra-chave “batch injection analysis” no portal ISI web of science foram localizados apenas 85 trabalhos (pesquisa por tópico). Esta pesquisa está detalhada na Figura 4. Basicamente, os trabalhos que empregam BIA com detecção eletroquímica podem ser divididos em dois grupos:

#### **1. Determinações com detecção potenciométrica ou amperométrica:**

Nestes trabalhos, os sinais obtidos são picos transientes (seção 1.3). Estão incluídos alguns trabalhos com eletrodos íon-seletivos para a detecção potenciométrica de cloreto em água [2, 31] e em produtos derivados de carne bovina

[41], ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas [42], íons mercúrio em água [43] e uso de três eletrodos íon-seletivos na análise multi-elementar de sódio, cálcio e potássio em água mineral [44]. Além destes também estão incluídos trabalhos para a detecção amperométrica de ácido ascórbico em sucos de fruta [45], íons mercúrio em águas residuais (CME) [33], fosfato em água do mar [46], glicose em soluções parenterais (CME) [35], peróxido de hidrogênio em cosméticos (CME) [36] e em água de chuva [47], hidrazina (CME) [38] e butil-hidroxi-anisol (BHA) em biodiesel [48]. Publicações sobre a análise de drogas como o ácido acetilsalicílico [49], paracetamol (CME) [34], salbutamol [50], bisulfito de sódio (CME) [37] e isoniazida [51] em formulações farmacêuticas também foram encontradas.



**Figura 4.** Número de artigos publicados desde 1991 até fevereiro de 2012 no banco de dados do portal ISI Web of Science com a palavra-chave “batch injection analysis”.

## 2. Determinações simultâneas com detecção voltamétrica:

Neste grupo, o perfil dos sinais obtidos por voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês “square wave voltammetry”) ou voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês “differential pulse voltammetry”) é semelhante aos obtidos com estas técnicas em sistemas estacionários. A maioria das publicações está relacionada à determinação simultânea de metais pesados ( $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$ ) em matrizes ambientais [39, 52-55] e forenses [56]. Nestes trabalhos, as injeções das amostras são realizadas



durante a etapa de deposição (pré-concentração) dos metais na superfície do ET. Desta forma, o tempo de deposição máximo empregado foi de 60 s, pois tempos superiores não geravam melhora na sensibilidade (procedimento de injeção relativamente curto). A etapa de redissolução é idêntica à utilizada em procedimentos com células eletroquímicas tradicionais.

Publicações que também devem ser consideradas são as que descrevem a análise por injeção em batelada capilar (CBIA, do inglês “Capillary Batch Injection Analysis”) [57, 58]. Trata-se de uma versão do BIA miniaturizada, na qual os volumes da célula e os de injeção foram reduzidos a 1,0 mL e 100,0 nL, respectivamente. Na CBIA são utilizados ultramicroeletrodos e injeções são realizadas através de capilares e micro-seringas. Em 2004, um artigo de revisão sobre o tema (BIA) foi publicado por Quintino e Angnes [32]. Neste trabalho, os autores descrevem os principais aspectos relacionados ao sistema BIA, como os princípios da técnica, detectores utilizados e os trabalhos publicados até então. Um dos objetivos desta revisão é a divulgação dos sistemas BIA que até então haviam sido pouco explorados. No entanto, apenas vinte trabalhos foram encontrados na literatura após a publicação deste artigo. Detalhes sobre o sistema BIA são muito bem discutidos na tese de doutorado de Maria do Socorro Maia Quintino [59].

#### **1.4. Eletrodos compósitos**

Um eletrodo compósito é definido como um eletrodo formado por um material misto que contém um ou mais materiais condutores de eletricidade e um material aglutinante não condutor [6]. As propriedades elétricas do compósito dependem da natureza de cada componente, suas quantidades relativas e sua distribuição. A resistência elétrica é determinada pela conectividade das partículas condutoras na matriz polimérica [6]. As propriedades mecânicas dependem fundamentalmente da natureza do polímero. Cada componente possui uma característica, enquanto o material compósito distingue em suas características químicas, mecânicas e físicas das apresentadas pelos constituintes isolados.

O eletrodo compósito mais conhecido é o eletrodo de pasta de carbono. Neste material, o carbono em diversas formas alotrópicas (p. ex. grafite, fulereno, nanotubos de carbono, carbono vítreo) é misturado com um polímero líquido e viscoso (p.ex. óleo mineral) [60], de forma a obter um eletrodo moldável, compacto e pouco solúvel em água. No entanto, este material resultante possui um pequeno tempo de vida útil, devido a uma relativa baixa resistência do óleo. Na investigação de eletrodos compósitos mais robustos, outros polímeros aglutinantes podem ser utilizados. Neste sentido, podem ser encontrados trabalhos propondo o uso de PVC [61, 62], teflon [63, 64], polietileno [65], poliestireno [66], nafion [67], acetato de celulose [68, 69], borracha silicone [70, 71] e adesivo epóxi [72, 73]. Além disto, foi verificado que algumas resinas epóxi e a borracha silicone podem também ser utilizadas em medidas eletroquímicas em meios orgânicos [7].

Na literatura, dois procedimentos básicos de preparação de compósitos condutores na confecção de eletrodos são apresentados. No primeiro, o condutor e o aglutinante são misturados manualmente na ausência de solvente orgânico [73, 74]. No segundo, as duas fases são misturadas na presença de um solvente orgânico, permanecendo então fluídos. Estes materiais, também conhecidos como tintas condutoras são largamente empregados na fabricação de eletrodos impressos [75]. Após a preparação do material compósito, os eletrodos podem ser confeccionados com diferentes configurações. Normalmente, os compósitos sem solvente são confeccionados pelo empacotamento mecânico (por pressão) do material em determinado molde. Após atingir o tempo de cura (tempo para estabelecimento das propriedades finais do material), tem-se o material compósito em dimensões definidas. Este objeto, normalmente chamada de tarugo, é então aderido a determinado suporte de eletrodo [74]. Eletrodos preparados com materiais compósitos fluídos apresentam uma confecção relativamente simples. Neste procedimento, o material fluido é esparramado no molde do eletrodo e após a cura e polimento, tem-se o eletrodo pronto para ser utilizado. No entanto, estas tintas condutoras são geralmente adquiridas de empresas especializadas, assim informações sobre a composição estão normalmente protegidas por patentes. Poucos protocolos da fabricação de tintas elaboradas em laboratório, chamadas de “homemade inks”,

podem ser localizados na literatura [68, 69] e consistem na mistura de acetato de celulose, ciclohexanona, acetona e pó de grafite.

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa publicou uma nota técnica descrevendo um protocolo de preparação de um compósito fluido constituído de grafite, ciclohexanona e adesivo epóxi [76]. Este material apresentou fluidez, resistência mecânica e condutividade adequada para a construção de eletrodos posicionados em ponteiros de micropipeta [9] e em células microfluídicas [8]. Na literatura pode ser encontrado o uso de eletrodos compósitos de grafite e adesivo epóxi com diversas finalidades analíticas, como na fabricação de eletrodos convencionais [74], dispositivos com arranjo de microeletrodos de grafite [72], detectores para eletroforese em microchips [77], material suporte para a formação de filmes metálicos in situ [78] e suporte para a construção de biossensores [79], imunossensores [80] e genossensores [81]. Mais recentemente este eletrodo compósito (modificado com nanopartículas metálicas) foi empregado em uma língua eletrônica utilizada na classificação de amostras de vinho [82].

Em resumo, o emprego de eletrodos compósitos pode ser vantajoso, devido à fácil regeneração da superfície através de simples polimento, fabricação de eletrodos com resistência mecânica e/ou a solventes não aquosos, custo de fabricação relativamente baixo, boa durabilidade e possibilidade de imobilização de modificadores no corpo do eletrodo (não somente na superfície) [6]. Mais detalhes sobre o assunto podem ser encontrados na literatura [83, 84].

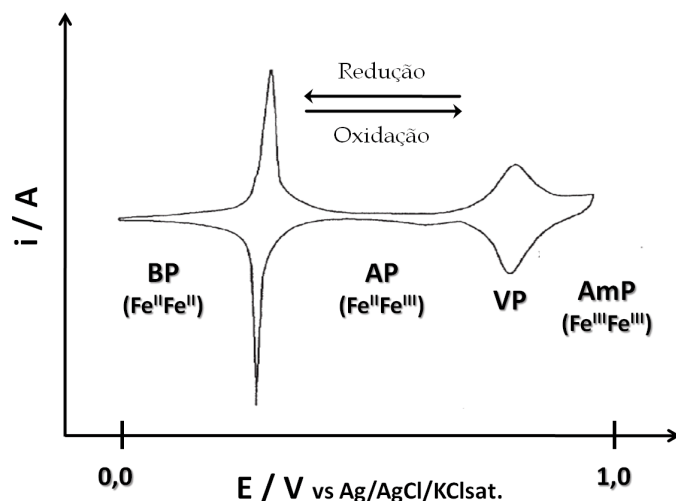
Com a finalidade da construção de sensores eletroquímicos, ou seja, eletrodos seletivos a determinadas espécies, a imobilização de modificadores no ET (biológicos e/ou sintéticos) que interajam especificamente com determinado analito alvo tem sido objeto de estudo de inúmeros grupos de pesquisa. Dentre estes modificadores, o grupo dos materiais hexacianoferratos (HCF's) tem sido bastante utilizado, devido principalmente à excelente atividade eletrocatalítica para diversos analitos de interesse biológico e ambiental. Especificamente, o hexacianoferrato de ferro será discutido na seção 1.5.

### 1.5. Sensores modificados com azul da Prússia (FeHCF)

O hexacianoferrato de ferro (III) ou Azul da Prússia (AP) é um complexo inorgânico formado entre ânions hexacianoferrato ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ) e cátions férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Este material, que foi descoberto acidentalmente pelo artista alemão Diesbach em 1704, é o composto de coordenação mais antigo relatado na literatura [11]. Nesta época, este material foi utilizado como pigmento de tintas. Porém, atualmente conhece-se um amplo uso deste material em química analítica (p.ex. troca iônica, dispositivos eletrocromicos e eletroquímicos). Desde a sua descoberta, complexos formados por ânions hexacianoferratos com outros metais (p. ex. cobre, níquel, cobalto, molibdênio, vanádio, óxido de rutênio) são objetos de estudo na área de sensores eletroquímicos [85]. De maneira genérica, estes materiais são conhecidos como hexacianoferratos (HCF's).

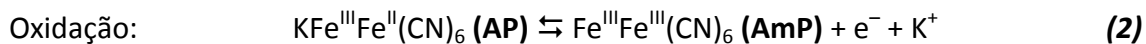
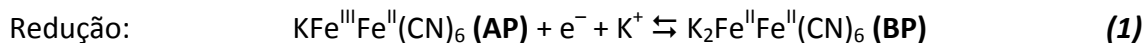
O AP possui a estrutura de uma zeólita, sendo constituído de uma rede polimérica de grupos cianeto e íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  alternados em uma estrutura cúbica de face centrada. Esta rede possui alguns defeitos, locais intersticiais e buracos nos quais contra-cátions e outras espécies moleculares podem ser intercarcalados [11].

O AP existe sob a forma “solúvel” ( $\text{KFe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6$ ) e a forma “insolúvel” ( $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$ ). Apesar destas formas serem pouco solúveis em água ( $K_{ps} \approx 1 \times 10^{-40}$ ), este termo se refere à facilidade da formação de soluções coloidais. No entanto, o voltamograma cíclico destas duas formas de AP é idêntico. Conforme observado na Figura 5 (adaptada de artigo publicado por Koncki R.) [11]), este composto apresenta dois pares de picos, que são referentes a duas reações redox reversíveis: redução para branco da Prússia (BP, chamado sal de Everitt) e oxidação para amarelo da Prússia (AmP) através de uma forma de valência intermediária chamada de verde da Prússia (VP) ou verde de Berlin. O par de picos observado em potenciais mais baixos ( $\approx +0,2 \text{ V}$ ) resulta da redução/oxidação do  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  não coordenado, enquanto que o outro em potenciais maiores ( $\approx +1,0 \text{ V}$ ) é correspondente à reação redox do par  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  coordenado com grupos cianeto [11].

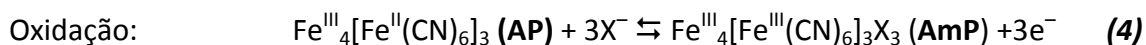
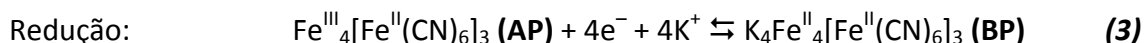


**Figura 5.** Voltamograma cíclico ilustrativo do FeHCF nos diferentes estados de oxidação: BP (branco da Prússia), AP (azul da Prússia) e AmP (amarelo da Prússia). Ilustração adaptada do artigo de revisão publicado por Koncki [11].

Apesar da paridade no voltamograma cíclico da Figura 5, existem distintos mecanismos propostos para as duas formas do AP. Para o AP “solúvel”, têm-se as seguintes reações reversíveis [86]:



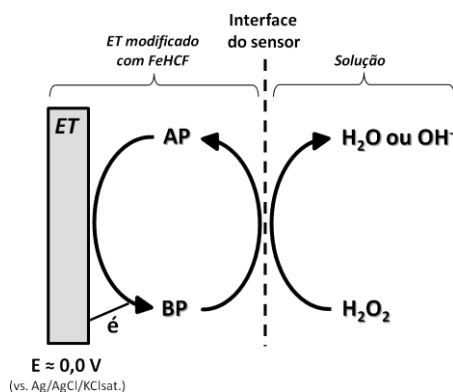
Para o AP “insolúvel”, as reações reversíveis abaixo são propostas [87]:



Nos mecanismos de redução propostos, existe a incorporação de cátions no AP “solúvel” (1) e “insolúvel” (3). A oxidação envolve a perda de cátions na forma “solúvel” (2) ou a incorporação de ânions na forma “insolúvel” (4). As conversões redox entre  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  que ocorrem na estrutura zeolítica permitem que o fluxo de cátions passe por entre os canais e buracos dos sólidos da estrutura do HCF. Estes íons promovem a compensação de carga [11]. Durante estes processos, cátions com pequeno raio hidratado penetram livremente no HCF, enquanto outros cátions com

maiores raios hidratados podem bloquear estas conversões [11]. Por exemplo, foi demonstrado que a compensação de carga no AP é realizada facilmente por íons  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$  e  $NH_4^+$ . No entanto, íons com maior raio hidratado ( $Na^+$ ,  $Li^+$  e  $H^+$  e todos os cátions do grupo II) bloqueiam a sua atividade eletroquímica [88]. Além disto, todas estas mudanças nos estados de oxidação do ferro são acompanhadas da alteração de cor (branco, azul, verde), por isto, o uso deste em dispositivos eletrocromicos.

Em 1984, Itaya e colaboradores [89] demonstraram a principal aplicação analítica do AP. Neste trabalho foi demonstrado que o branco da Prússia (forma reduzida do AP) tem um efeito catalítico para a redução do oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Este efeito foi atribuído à morfologia do AP. Os pequenos canais da estrutura zeolítica do AP (diâmetros de canal de aproximadamente  $0,32\ \mu m$ ) permitem a difusão de moléculas de baixo peso molecular, tal como  $O_2$  e  $H_2O_2$ . No entanto, atualmente sabe-se que além deste efeito de “exclusão por tamanho”, existe um efeito catalítico do íon  $Fe^{2+}$  (não complexado) para a redução do  $H_2O_2$ . Estes íons existem na forma BP, que pode ser obtida pela aplicação de potenciais menores que  $+0,2\ V$  no ET (Figura 5). A Figura 6 ilustra esquematicamente este efeito catalítico.



**Figura 6.** Esquema do mecanismo de redução catalítica do  $H_2O_2$  nos sensores de AP.

Como pode ser observado, o  $H_2O_2$  é reduzido enquanto o BP ( $Fe^{II}Fe^{II}$ ) é oxidado à AP ( $Fe^{III}Fe^{II}$ ). O produto de redução do  $H_2O_2$  depende do pH do meio: Em meio ácido, a redução gera moléculas de água, e em meio neutro, o produto é o íon hidroxila ( $OH^-$ ) [90]. Como indicado na Figura 5, a redução electrocatalítica do  $H_2O_2$  ocorre mediante a aplicação de um baixo potencial ( $\approx 0,0\ V$ ), o que permite a obtenção de boa seletividade, pois neste potencial poucas espécies apresentam eletroatividade.

Além disto, nestes sensores, a constante de redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem a mesma ordem de magnitude da enzima peroxidase. Devido a isto (seletividade e atividade catalítica), o AP pode ser considerado uma “peroxidase artificial” [91]. Além disto, é importante salientar que os mediadores inorgânicos podem ser mais vantajosos do que os enzimáticos, devido ao custo reduzido e superior estabilidade operacional.

Segundo a literatura, os sensores modificados com AP (e seus análogos) são normalmente preparados de dois modos: deposição eletroquímica em solução com a formação de filmes na superfície de eletrodos sólidos [92, 93] ou a incorporação de partículas de AP em eletrodos de pastas de carbono [94] ou em tintas usadas para a confecção de eletrodos impressos [95]. Comparando-se alguns trabalhos sobre o tema [96] foi verificado que os sensores preparados com a eletrodeposição dos filmes de AP são mais sensíveis à peróxido do que os sensores contendo partículas de AP incorporadas ao corpo do eletrodo, devido, provavelmente, a um maior excesso superficial ( $\Gamma$ ) de AP nestes eletrodos. No entanto, os eletrodos contendo partículas de AP no corpo do eletrodo apresentam maior estabilidade em diferentes pHs. Além disto, em caso de uma possível contaminação da superfície, estes sensores podem recuperar a atividade catalítica inicial com um simples polimento, pois o compósito atua como um reservatório de AP.

A tendência atual em relação aos sensores baseados em AP está na sua síntese em escala nanométrica, merecendo destaque a técnica “layer by layer”. Na literatura podem ser encontradas publicações que empregam substratos de óxidos mesoporosos (de diâmetro nanométrico) [97] e nanotubos de carbono [98]. Nestes trabalhos foi observada uma melhoria na sensibilidade, estabilidade e reprodutibilidade dos transdutores. Além disto, o comportamento destes sensores depende basicamente da quantidade das camadas depositadas e da grande área superficial das partículas de AP construídas em escala nanométricas.

Os sensores baseados em AP são altamente indicados na determinação de peróxido de hidrogênio. Entretanto, outras moléculas (p.ex. glicose, lactato, sacarose, etc) também podem ser detectadas empregando os eletrodos de AP. Neste caso, estes biosensores devem conter as enzimas oxidases específicas à molécula de interesse,

que liberam  $\text{H}_2\text{O}_2$  como produto da reação da molécula com a enzima. Logo, a detecção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelo mediador de AP quantifica indiretamente esta molécula [96].

### **1.6. Eletrodos de filme de diamante dopado com boro (BDD)**

O diamante é uma forma alotrópica do carbono formado por ligações simples (hibridização  $\text{sp}^3$ ) entre carbonos numa geometria tetraédrica, possuindo propriedades únicas como alta condutividade térmica, dureza, resistividade, força de flexão e inércia química. Devido a estas e outras propriedades, o diamante (natural ou sintético) é usado em diversos setores tais como o mecânico, eletrônico, óptico, espacial, médico e eletroquímico (desde que dopado) [99].

O primeiro filme de BDD foi obtido por Pofert *et al.* [100] em 1973, sendo este preparado pela técnica de deposição química a partir da fase vapor (CVD, do inglês “chemical vapor deposition”). Este método está baseado na deposição de um filme de diamante sobre diferentes substratos (inclusive o diamante), a partir da ativação de uma fase gasosa introduzida em um reator. Na composição da fase gasosa devem estar presentes moléculas fontes de carbono (tais como metano, metanol, acetona, etanol, etc.) para a formação do diamante, além do boro ou seus derivados (tal como  $\text{B}_2\text{H}_6$ ), responsáveis pelo aumento da condutividade do material. Usualmente o diamante é dopado com boro em níveis que vão do intervalo de 500 a 10.000 ppm.

Alguns parâmetros devem ser analisados na construção de um eletrodo de filme de BDD. Na preparação dos filmes é importante considerar a mistura gasosa e o substrato utilizados, o nível de dopagem e o método de deposição utilizado. Na etapa de construção do eletrodo deve-se verificar o contato elétrico entre o substrato e o suporte de eletrodo, que deve ter menor resistência ôhmica possível. Além disto, o mesmo deve estar bem vedado nas bordas de forma que somente o BDD fique em contato com a solução de medida, evitando possíveis infiltrações da solução no suporte, o que prejudica o contato elétrico entre o BDD e o suporte. Informações detalhadas em relação ao histórico da produção de filmes de BDD, técnicas de síntese, empresas fabricantes, métodos de caracterização do filme de BDD (elétrica, estrutural



e morfológica) podem ser encontradas num artigo de divulgação publicado por Barros *et al.* [99] e outro por Luong *et al.* [101].

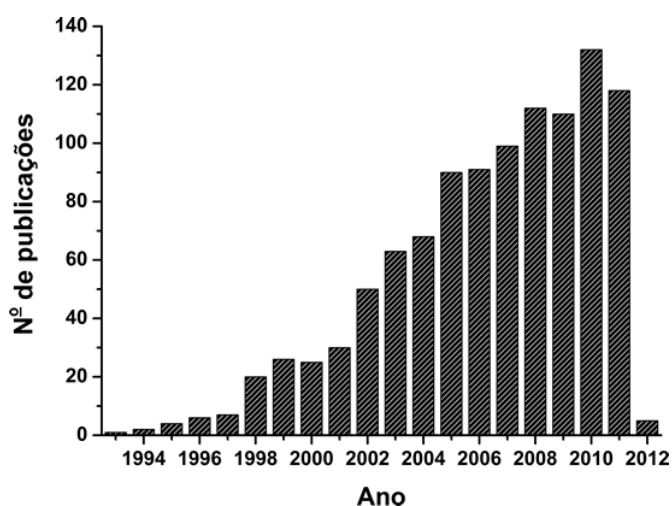
Os eletrodos de filme de BDD apresentam propriedades para aplicação em eletroquímica e eletroanalítica superiores a outras formas de carbono (grafite, carbono vítreo, carbono pirolítico, etc.), tais como: (1) baixa corrente capacitiva (corrente de fundo), (2) ampla janela de potencial em meio aquoso, (3) rápida cinética de transferência de elétrons em vários sistemas redox, (4) fraca adsorção molecular (baixa passivação) e (5) resistência à corrosão [102].

No entanto, o desempenho eletroquímico dos filmes de BDD é altamente dependente das condições de pré-tratamento (limpeza e/ou ativação) do eletrodo. Na literatura [5] podem ser encontrados procedimentos por polimento mecânico (sem eficiência), lavagem ácida seguida de hidrogenação por CVD, limpeza com isopropanol, tratamento térmico e polarização eletroquímica. Dentre estas, a mais utilizada é a polarização eletroquímica devido à sua simplicidade e eficiência. Nesta, o eletrodo em meio ácido é polarizado anodicamente ou catodicamente em potenciais (ou correntes) extremos para promover a geração de oxigênio ou hidrogênio molecular, respectivamente. Concomitantemente à geração de cada respectivo gás, a superfície do BDD permanece funcionalizada com hidrogênio ou oxigênio terminais, que podem aumentar o desempenho analítico a determinado grupo de moléculas. Até o início da última década, a ativação considerada padrão para o eletrodo de BDD era anódica em meio ácido (tampão Britton–Robinson) [103, 104]. No entanto, em 2004, Suffredini *et al.* [105] demonstraram um melhor desempenho eletroquímico na resposta a clorofenóis (aumento da reversibilidade, sensibilidade e estabilidade) em função do tratamento catódico (- 3,0 V por 30 min em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 mol L<sup>-1</sup>) em substituição ao tratamento anódico. Posteriormente, esta melhora promovida pela ativação catódica foi também observada por Medeiros *et al.* [106] na resposta eletroquímica dos antioxidantes fenólicos BHA e BHT.

#### **1.6.1. Eletrodos de filme de BDD - Aplicações eletroanalíticas e perspectivas:**

O primeiro trabalho utilizando filmes de BDD em aplicações em eletroquímica foi publicado em 1993 [107]. Neste trabalho, Swain e Ramesham divulgaram as já

citadas propriedades do eletrodo de BDD (baixas correntes de fundo, reduzida contaminação, ampla faixa de trabalho). Obviamente, devido às suas propriedades únicas, os eletrodos de filme de BDD despertaram a atenção de vários grupos de pesquisa no mundo. Após aproximadamente vinte anos da publicação deste trabalho, na internet (Web of Science) podem ser encontrados vários trabalhos sobre estudos e aplicações do eletrodo de BDD nas áreas de eletroanalítica e eletrocatalise ( $\approx 1000$  publicações), conforme apresentado na Figura 7. Além disso, o número de artigos publicados é crescente a cada ano. Em um recente artigo de revisão, Luong *et al.* [101] apresentam algumas perspectivas em relação aos eletrodos de filme de BDD, como: a) modificação da superfície do BDD com nanopartículas metálicas e/ou filmes eletropolimerizados para conferir novas características e aumentar o desempenho dos eletrodos (p.ex. aumento do transporte de massa, acréscimo de efeito catalítico para oxidação/redução de alguma molécula, etc.); b) funcionalização da superfície de BDD com biomoléculas para o estímulo em futuras aplicações bioanalíticas; c) Uso de BDD na elaboração de nano-dispositivos. Além disto, neste trabalho está presente uma ampla revisão bibliográfica voltada para a aplicação de eletrodos de filmes de BDD na detecção de vários compostos orgânicos e inorgânicos, bem como o uso de BDD como detector amperométrico em sistemas FIA, HPLC e CE (capilar e em microchips).



**Figura 7.** Número de artigos publicados desde 1993 até fevereiro de 2012 no banco de dados do portal ISI Web of Science com a palavra-chave “boron-doped diamond” (pesquisa por tópico). Filtros da pesquisa: “chemistry” and “electrochemistry”.

## 1.7. Determinações simultâneas com detecção eletroquímica

Uma perspectiva presente no desenvolvimento de novos métodos de análise se refere à possibilidade de determinações simultâneas, ou seja, a análise de mais de um componente na amostra numa 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, do inglês “high performance liquid chromatography”) ou a cromatografia gasosa (GC, do inglês “gas chromatography”). No entanto, estas técnicas são dispendiosas, tanto na aquisição dos equipamentos como na realização das análises devido ao uso de solventes de grau espectroscópico (HPLC) ou gases ultrapuros (GC). Neste sentido, separações por eletroforese capilar (CE, do inglês “capillary electrophoresis”) apresentam vantagens em relação às separações cromatográficas. Além disso, determinações simultâneas sem etapa prévia de separação em coluna também podem ser localizados na literatura. Nesta perspectiva, podem ser encontrados trabalhos baseados em detecção espectrofotométrica com tratamento dos dados por técnicas quimiométricas (PCR, PLS ou calibração multivariada) [108-111] 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 para análise dos íons cálcio, potássio e sódio [44], ácido peracético e peróxido de hidrogênio [112] e Cr(III)/Cr(VI) [113], as voltametrias de pulso (SWV e DPV) para a determinação de ácido ascórbico e cafeína [114], paracetamol e cafeína [115, 116], paracetamol e ácido úrico [117], cafeína e aspirina [118], BHA e BHT [119], catecol e hidroquinona [120, 121], ácido ascórbico e sulfito [122], dopamina e ácido ascórbico [123], biamperometria para determinação de nitrito e nitrato [124] e a amperometria de múltiplos pulsos acoplada a sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA-MPA), para a análise de glicose e frutose [125], paracetamol e ácido ascórbico [126], dipirona e paracetamol [127], BHA e BHT [128], paracetamol e cafeína [129], ácido ascórbico e aspirina [130] e o par nitrito/nitrato [131].

A detecção por MPA é disponibilizada pelo software GPES, que controla os potenciostatos comercializados pela empresa Metrohm - Eco Chemie. Este software permite aplicar de 2 até 10 pulsos de potencial de forma seqüencial 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. Diferentes estratégias (esquemas) podem ser adotadas dependendo da natureza das espécies oxidadas e/ou reduzidas no ET. Por exemplo, Santos *et al.* [127] determinaram simultaneamente dipirona e paracetamol empregando um eletrodo de carbono vítreo e a seguinte sequência de pulsos de potenciais:

- + 0,40 V/100 ms: detecção de dipirona sem interferência do paracetamol;
- + 0,65 V/100 ms: oxidação de ambos os compostos (paracetamol e dipirona);
- 0,00 V/200 ms: determinação indireta de paracetamol através da redução da N-acetil-p-benzoquinoimina gerada no pulso de potencial anterior;
- - 0,05 V / 400 ms: limpeza do eletrodo de trabalho.

Silva *et. al.* [129] determinaram simultaneamente paracetamol e cafeína com eletrodo de BDD utilizando os pulsos abaixo:

- + 1,20 V/50 ms ( $E_1$ ): paracetamol é oxidado sem a interferência da cafeína;
- + 1,55 V/50 ms ( $E_2$ ): ambos os compostos são oxidados, sendo que a corrente de oxidação da cafeína é obtida por subtração da corrente detectada em  $E_2$  e  $E_1$  (normalizada por um fator de correção);
- + 0,40 V/200 ms: limpeza do eletrodo de trabalho.

Estas variáveis devem ser escolhidas basicamente em função do mecanismo eletroquímico de cada espécie na superfície do ET. É importante salientar que em FIA-MPA, os parâmetros (vazão, volume injetado, etc) podem ser alterados para melhorar as características do sistema (aumento da sensibilidade, eliminação da interferência do produto da reação redox de um analito no potencial de detecção de outro analito, etc).

As análises com detecção por FIA-MPA apresentam vantagens como elevada frequência analítica, boa precisão e possibilidade de constante limpeza eletroquímica do ET durante as medidas, através da aplicação de um ou mais pulsos de potencial

onde não ocorre reação redox (potencial de limpeza). Esta estratégia minimiza a passivação do ET gerada pela adsorção de eventuais produtos de reação redox, que é uma das principais limitações do uso da amperometria de potencial constante.

Informações a respeito dos aspectos teóricos da detecção por FIA-MPA são pouco divulgadas na literatura, o que obviamente contribui para a baixa quantidade de trabalhos publicados empregando esta técnica. Buscando aumentar a popularidade da detecção por FIA-MPA, recentemente Santos *et al.* [4] publicaram um artigo de revisão, no qual são abordados alguns aspectos teóricos, potencialidades (determinação simultânea, análises indiretas, inserção de padrão interno para correção de variáveis do sistema em fluxo, etc.) e revisão bibliográfica sobre o tema FIA-MPA. Em outras revisões [18, 132, 133] estão reunidas informações sobre os modos de determinação simultânea em vários sistemas em fluxo com detecção eletroquímica (com ou sem separação prévia em coluna).

## **1.8. Informações sobre os compostos e amostras avaliados na tese**

### **1.8.1. Determinação de peróxido de hidrogênio em amostras de antisséptico bucal e leite empregando eletrodo compósito modificado com azul da Prússia:**

Devido à excelente atividade eletrocatalítica do AP para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bem como estabilidade, tempo de vida e custo bastante vantajoso frente aos sensores enzimáticos, vários trabalhos empregando este modificador na determinação seletiva de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram desenvolvidos [92-94, 134-137]. A determinação de peróxido é importante, pois é utilizado com diversas finalidades e em diferentes setores da economia. Devido ao seu alto poder oxidante ( $E_{\text{red}}^{\circ} = 1,77 \text{ V}$  na forma molecular e  $E_{\text{red}}^{\circ} = 2,8 \text{ V}$  na forma do radical  $\cdot\text{OH}$ ), este é utilizado em processos oxidativos avançados (POA), agente branqueador nas indústrias de papel e celulose e têxteis, anti-séptico em produtos de higiene e conservante em produtos lácteos, dentre outros [138].

Especificamente na indústria de laticínios, a determinação de peróxido é de grande importância, pois este atua como preservativo no leite e derivados. Um preservativo é qualquer composto químico ou qualquer processo industrial que,

quando adicionado no leite retarda alterações causadas pelo crescimento de microorganismos, que podem alterar o sabor ou aparência física do mesmo [139]. Em muitos países, a prática de adicionar peróxido no leite ainda é permitida. No entanto, de acordo com a legislação brasileira (ANVISA), a adição de  $H_2O_2$  ao leite é proibida em qualquer concentração, portanto, o  $H_2O_2$  é classificado como adulterante em leite. Em 2007, o leite ainda cru estava sendo adulterado com altas quantidades de peróxido de hidrogênio, o que foi considerado impróprio para consumo humano, conforme laudo realizado por um laboratório do Ministério da Agricultura. Além disso, suspeita-se que até hoje adulterações desta natureza ainda ocorram em horários onde os órgãos fiscalizadores não atuam. A ingestão de altas concentrações de peróxido pode causar irritação gastrointestinal e até óbito [140]. No entanto, a ingestão de baixas quantidades não é nociva, pois rapidamente o peróxido é degradado pela catalase presente no intestino delgado [140].

Na literatura foram encontrados dois trabalhos recentes sobre a detecção de  $H_2O_2$  em leite empregando sensores de AP. Em um destes, sensores voltamétricos descartáveis de filmes de AP associados a métodos quimiométricos tornaram possível a criação de uma língua eletrônica capaz de identificar a presença de peróxido de hidrogênio no leite [93]. Em outro, um eletrodo de filme de AP coberto com Nafion<sup>®</sup> foi utilizado na detecção amperométrica de peróxido em leite [137].

#### **1.8.2. Determinação simultânea de paracetamol/caféina e dipirona/caféina em formulações farmacêuticas com eletrodo de diamante dopado com boro**

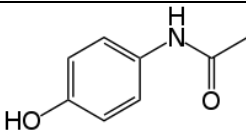
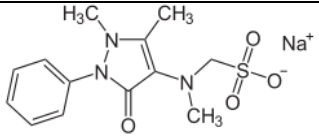
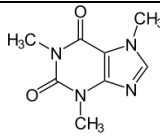
O paracetamol (PA), acetaminofeno ou N-(4-hidroxifenil)etanamida (IUPAC) é um fármaco com propriedades analgésicas e antipiréticas (antitérmicas), bastante utilizado em formulações farmacêuticas com capacidade de combater a dor e a febre, sem a geração de problemas gástricos [141]. Além disso, por ter ação similar ao ácido acetil salicílico (aspirina), é um fármaco alternativo para pacientes intolerantes a aspirina [141]. A atuação no organismo é realizada pela inibição da síntese das prostaglandinas, as quais são mediadores celulares responsáveis pelo aparecimento da dor e da febre [141]. Atualmente, é um dos analgésicos mais utilizados no mundo,

porém possui um alto potencial hepatotóxico, não devendo ser utilizado mais que 4000 mg diárias (8 comprimidos de 500 mg). O PA pode ser encontrado nas formas de cápsulas, comprimidos, gotas, xaropes e injetáveis [142].

Dipirona sódica (DI), metamizol sódico ou 1-fenil-2,3-dimetil-5-pirazolona-4-metilaminometano sulfonato de sódio (IUPAC) é um fármaco utilizado principalmente como analgésico e antipirético. É conhecida popularmente como dipirona<sup>®</sup>, novalgina<sup>®</sup>, neosaldina<sup>®</sup> (dentre outros) e é comercializada na forma de solução oral, injetável e de comprimidos. A DI tem o uso restrito em alguns países (como os Estados Unidos e a Suécia), sendo extremamente popular no Brasil, devido ao seu forte efeito analgésico e baixo custo [143]. A restrição imposta à DI nestes países (p.ex. Estados Unidos) está relacionada com a descoberta de uma doença chamada de agranulocitose [144]. No entanto, até o momento não foi comprovada a relação direta da incidência desta enfermidade com exposição à DI, que pode estar também associada a outros fármacos ou agentes químicos. Assim como o PA, a DI é metabolizada no fígado e é inibidora das prostaglandinas.

A cafeína (CA) ou 1,3,7-trimetil-1H-purino-2,6(3H,7H)-diona (IUPAC) é uma substância classificada como alcalóide do grupo das xantinas. A cafeína está presente em algumas plantas, bebidas (café, chá e refrigerantes do tipo cola) e em medicamentos. A ingestão de cafeína em doses terapêuticas provoca dilatação dos vasos periféricos e estimula o coração, aumentando a sua capacidade de trabalho. Além disto, apresenta efeito diurético e estimula o sistema nervoso central [145]. Devido a estas propriedades, a cafeína é adicionada em formulações farmacêuticas para atuar em conjunto com outras drogas, de maneira a aumentar a absorção do princípio ativo pelo organismo [146]. Atualmente, no mercado podem ser encontradas formulações contendo cafeína juntamente com um ou mais de um dos seguintes compostos: ácido ascórbico, paracetamol, dipirona, aspirina, diclofenaco, carisoprodol, orfenadrina, isomepteno, taurina, propifenazona e fenindamina [147]. Quando estes medicamentos são utilizados, geralmente se recomenda uma dose diária de 200 mg de cafeína [148]. As estruturas químicas e as fórmulas moleculares dos fármacos paracetamol, dipirona e cafeína são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Alguns dados estruturais e propriedades físicas do PA, DI e CA [149]

	Paracetamol	Dipirona sódica	Cafeína
Fórmula estrutural			
Fórmula molecular	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> SNa	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Massa molar*	151,16	311,36	194,19
Solubilidade em água**	12,75	solúvel	20,00

\* Massa molar em g mol<sup>-1</sup>; \*\* Solubilidade em água (em g L<sup>-1</sup>) a 20 °C.

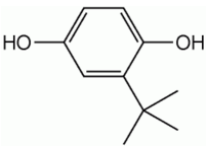
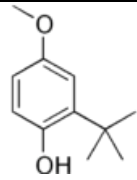
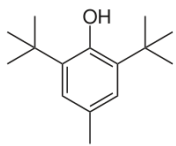
De acordo com Santos *et al.* [150], o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de fármacos é extremamente importante para obter a autenticidade dos produtos farmacêuticos introduzidos no mercado. Segundo a farmacopéia americana, na análise de formulações que contenham dois ou mais fármacos, HPLC com detecção no ultravioleta (UV) é considerado método padrão. No entanto, devido ao elevado custo destes equipamentos e dos solventes de alta pureza (grau espectroscópico), estas análises ficam impossibilitadas em laboratórios com pouco recurso financeiro (tal como as farmácias de manipulação).

### 1.8.3. Determinação simultânea de TBHQ/BHA/BHT em biodiesel com eletrodo de diamante dopado com boro

O terc-butilhidroquinona (TBHQ), butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) estão entre os antioxidantes sintéticos mais utilizados em amostras que contenham alto teor de lipídios. Assim, eles podem ser adicionados em alimentos gordurosos como a maionese, a margarina, a manteiga, o creme vegetal, óleos e em combustíveis oleosos, tal como o biodiesel. A escolha de qual(is) antioxidante(s) que será(ão) adicionado(s) em uma amostra deve considerar a estabilidade deste(s) nas condições que a mesma será armazenada ou submetida (material do reservatório, exposição ao ar, temperatura, luz, etc.). As estruturas e alguns dados destes compostos fenólicos são fornecidos na Tabela 2.



**Tabela 2.** Estruturas e algumas propriedades físicas do TBHQ, BHA e BHT [149]

	TBHQ	BHA	BHT
Fórmula estrutural			
Fórmula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
Massa molar*	166,22	180,24	220,35
Solubilidade em água	Levemente solúvel	Insolúvel	Insolúvel
Solubilidade em etanol	Solúvel	Solúvel	Pouco solúvel
Solubilidade em gordura	Solúvel	Solúvel	Solúvel

\* Massa molar em g mol<sup>-1</sup>;

Segundo a ANVISA, antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa de lipídios, ou seja, exerce efeito conservante em matrizes gordurosas. Do ponto de vista químico, estes antioxidantes (naturais ou sintéticos) exercem um papel significativo no retardamento da oxidação dos lipídios, através da interrupção das reações em cadeia dos radicais livres envolvidos na autooxidação, que são a forma mais comum de deterioração de gorduras [151]. Esta interrupção se dá através da formação de radicais mais estáveis com os antioxidantes, que são estabilizados pela ressonância dos anéis aromáticos presentes na estrutura dos antioxidantes fenólicos [152]. A degradação destes lipídios (principalmente de ésteres poliinsaturados) é induzida pela ação da luz, temperatura e/ou oxigênio molecular [151]. Uma forma comum de reconhecer estes produtos de degradação (hidroperóxidos, ácidos orgânicos, etc.) se dá pelo aparecimento do gosto e cheiro de ranço, além do aumento da viscosidade da amostra. No biodiesel, a formação destes produtos insolúveis pode ocasionar problemas de acúmulo de depósitos e entupimento do sistema de injeção de combustível no motor [153].

Independente da amostra oleosa, estes antioxidantes sintéticos (TBHQ, BHA e BHT) podem ser adicionados individualmente ou em conjunto, devido à combinação do potencial antioxidante de cada componente [154]. Na literatura, podem ser encontrados trabalhos nos quais é avaliada a estabilidade oxidativa de biodiesel de

soja em função da adição de TBHQ, BHA e BHT individualmente ou misturados, através da medida do período de indução [155-157]. Nestes trabalhos, estes períodos de indução são avaliados em função da concentração de cada antioxidante (adicionados individualmente ou em conjunto) em biodiesel de soja (200 a 8000 mg kg<sup>-1</sup>) e da temperatura (100 a 130 °C). O período de indução é o tempo decorrente até a detecção dos ácidos orgânicos voláteis, gerados através do método Rancimat. Neste método, a amostra oleosa é submetida a um fluxo de ar em elevadas temperaturas (100 a 130 °C) para acelerar a oxidação, formando inicialmente os hidroperóxidos e por último os ácidos voláteis. Estes ácidos são detectados através da mudança da condutividade da água destilada contida em outro recipiente. Segundo a norma EN 14214, o valor mínimo de período de indução é de 6 h [153].

No Brasil, a quantidade de antioxidantes adicionados em alimentos é limitada pela ANVISA, que restringe a quantidade de TBHQ e BHA ao nível de 200 mg kg<sup>-1</sup> e de 100 mg kg<sup>-1</sup> para o BHT [158]. Estas limitações foram impostas devido a suspeita do potencial carcinogênico destes compostos (observado em experimentos com animais de laboratório). Devido à produção de biodiesel ser relativamente recente, ainda não existe uma lei regulamentando as quantidades limites de antioxidantes adicionados no biodiesel.

Segundo Takemoto *et al.* [159], na literatura são encontrados diversos trabalhos para a análise quantitativa destes antioxidantes sintéticos em óleos e gorduras, sendo que a maioria emprega HPLC e GC, com uma separação prévia e posterior quantificação. Devido à eletroatividade dos grupos fenólicos presentes nestes antioxidantes em superfícies de eletrodos de carbono, foram propostos na literatura alguns métodos eletroquímicos para a determinação simultânea de até dois antioxidantes em alimentos [106, 128]. Ainda não existem trabalhos na literatura sobre a determinação simultânea de TBHQ, BHA e BHT em biodiesel com detecção eletroquímica. No entanto, foram encontrados trabalhos com a determinação individual de TBHQ [160, 161] e BHA [48].

## 1.9. Justificativas

O desenvolvimento de métodos analíticos baseados em análise por injeção em batelada (BIA) mostra-se interessante, devido à possibilidade de se combinar as vantagens inerentes de um sistema FIA (rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade, etc.) num sistema mais robusto e portátil (passível de ser utilizado fora do laboratório). No entanto, conforme apresentado na seção 1.3.1, o sistema BIA foi pouco explorado até o momento. Logo, esta realidade abre inúmeras possibilidades para o desenvolvimento de novos métodos de análise química que sejam reconhecidos pela alta frequência analítica, robustez e simplicidade operacional. Estas características são muitas vezes desejadas numa análise de rotina ou em laboratórios com carência financeira para aquisição de equipamentos dispendiosos (tal como HPLC, por exemplo) e custeio de analistas com alto grau de treinamento. Nesta perspectiva, a combinação de sistemas BIA com detecção eletroquímica (amperométrica) que utilize eletrodos robustos e reprodutíveis (de compósitos condutores rígidos, filme de diamante dopado com boro, por exemplo) pode oferecer uma alternativa bastante viável às análises químicas convencionalmente realizadas em diversos setores da economia, tal como o de combustíveis, alimentício, farmacêutico, dentre outros.

## 1.10. Objetivos

O presente doutoramento apresentou duas propostas gerais:

1. Determinação amperométrica de peróxido de hidrogênio empregando eletrodo compósito contendo partículas de azul da Prússia no corpo do eletrodo (modificação “bulk”);
2. Determinação simultânea de três distintos grupos de analitos encontrados em formulações farmacêuticas (PA e CA; DI e CA) e em amostras de biodiesel e alimentos (TBHQ, BHA e BHT).

Nestas duas propostas, buscou-se o desenvolvimento de procedimentos de análise por injeção em fluxo (FIA) e análise por injeção em batelada (BIA), devido à simplicidade, rapidez e baixo custo por análise. Os objetivos específicos relacionados a estas duas propostas são listados na tabela abaixo.

Proposta 1	Proposta 2
<ul style="list-style-type: none"><li>→ Imobilização de azul da Prússia (AP) no compósito fluído de grafite;</li><li>→ Caracterização dos eletrodos construídos com o compósito modificado com AP;</li><li>→ Aplicação das microcélulas de ponteira (modificadas com AP) como dispositivos seletivos para <math>H_2O_2</math> em sistemas FIA;</li><li>→ Aplicação do ET compósito modificado com AP no sistema BIA para a determinação de <math>H_2O_2</math> em leite.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>→ Estudo do comportamento eletroquímico de cada analito (PA, DI, CA, TBHQ, BHA e BHT) no eletrodo de BDD;</li><li>→ Otimizações das variáveis do sistema BIA (volume injetado, velocidade de injeção e velocidade de agitação do eletrólito) e da detecção por MPA (sequência e tempo de aplicação dos pulsos de potencial);</li><li>→ Determinação simultânea de PA/CA e DI/CA em formulações farmacêuticas e de TBHQ/BHA/BHT em biodiesel.</li></ul>

## ***PARTE EXPERIMENTAL***

## 2.1. Materiais, reagentes, soluções e pré-tratamento das amostras

A maioria dos materiais empregados na construção dos microdispositivos pode ser facilmente adquirida. Dentre estes são relacionados: adesivo epóxi Araldite® 24 h profissional Brascola, PVC de tubulações Tigre®, adesivo plástico para PVC Tigre®, polímero termomoldável, tubo de poliamida, compósito de prata (PC 9045) da Joint Metal Comércio Ltda (Diadema/SP), fita Teflon®, fios rígidos de cobre em diferentes diâmetros e ponteiros de polipropileno de 100 µL (utilizada em micropipetas). Os materiais utilizados na preparação do material compósito fluído foram: grafite com granulometria até 2 µm (Sigma-Aldrich), adesivo epóxi Araldite® 24 h profissional (Brascola) e ciclohexanona (VETEC). Os reagentes utilizados na síntese do azul da Prússia foram os seguintes: ferrocianeto de potássio dodecahidratado (Sigma Aldrich) ou ferricianeto de potássio (Proquimios), cloreto férrico tetrahidratado (Synth) e cloreto de potássio (Proquimios). As soluções destes reagentes foram realizadas pela dissolução dos respectivos sais em água deionizada.

As placas de BDD foram adquiridas da empresa Adamant Technologies AS (La Chaux-de-Fonds, Suíça). Segundo especificações do fabricante, estas placas possuem uma base de silício cristalino de 1 mm de espessura (0,7 x 0,7 cm) coberta com uma camada de BDD de 1,2 µm (8000 ppm de dopagem com boro).

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade  $\geq 18$  MΩ cm - 25°C) obtida de sistema de purificação Milli-Q.plus (Millipore). Os reagentes utilizados eram de grau analítico. O peróxido de hidrogênio (30 % v/v) usado na preparação das soluções estoque foi adquirido da empresa Merck. Os padrões de PA, DI e CA foram obtidos da empresa Synth e os padrões de TBHQ, BHA e TBHQ foram adquiridos da Acros Organics. As amostras de formulações farmacêuticas, anti-séptico bucal e leite UHT (desnatado e integral) foram adquiridos em comércios locais. A amostra de biodiesel de soja foi adquirida da empresa Caramuru (Caramuru Alimentos LTDA, São Simão-GO).

As soluções padrão de peróxido ( $H_2O_2$ ) foram preparadas a partir de diluições apropriadas da solução estoque (30 % v/v). As amostras de leite (UHT desnatado e integral) foram dopadas nas concentrações de 300 e 800 mg L<sup>-1</sup> de  $H_2O_2$ , adicionando-

se volumes adequados da solução estoque 30 % (v/v). Posteriormente, estas amostras foram diluídas com o propósito de apresentarem uma composição semelhante à do eletrólito suporte empregado nos sistemas FIA e BIA.

As soluções estoque dos fármacos (PA, DI e CA) foram obtidas a partir da dissolução do padrão sólido em água deionizada e posteriormente diluídas no eletrólito suporte (TAC 0,1 mol L<sup>-1</sup>) para então serem injetadas no sistema BIA-MPA. No preparo das amostras de formulações farmacêuticas, os comprimidos presentes em uma cartela (8 ou 12 comprimidos) eram triturados em um almofariz. Em seguida, empregando uma balança analítica (com quatro casas decimais), uma massa deste material foi dissolvida em água num balão volumétrico. Na etapa seguinte, uma alíquota desta solução foi diluída apropriadamente em TAC 0,1 mol L<sup>-1</sup> (eletrólito suporte) usado no procedimento.

As soluções dos antioxidantes (TBHQ, BHA e BHT) foram preparadas pela dissolução dos padrões em etanol absoluto (VETEC). Posteriormente estas soluções foram diluídas adequadamente no mesmo eletrólito suporte da célula BIA (KCl + HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em meio de etanol 30 % ou 50 % (v/v)). A amostra de biodiesel foi dopada misturando-se 100 µL de soluções etanólicas de TBHQ, BHA e/ou BHT 300 mmol L<sup>-1</sup> a 900 µL de biodiesel. Estas misturas correspondem à concentração de 30 mmol L<sup>-1</sup> de cada antioxidante na amostra de biodiesel (ou 5000, 5400 e 6600 mg L<sup>-1</sup> de TBHQ, BHA e BHT, respectivamente). Após agitação manual destas misturas por 5 minutos, uma alíquota de cada amostra dopada (total de sete dopagens) foi diluída de forma a ter a mesma composição do eletrólito suporte da célula BIA (KCl + HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em meio de etanol 30 % ou 50 % (v/v)).

## **2.2. Preparação do compósito fluido condutor**

A preparação do compósito fluído foi realizada pela mistura de adesivo epóxi, grafite e ciclohexanona na proporção de 4%, 56 % e 40 % (m/m), respectivamente. O procedimento detalhado segue o seguinte protocolo: (1) Adicionou-se 0,05 g de resina epóxi (Araldite® 24 h) a 1,5 mL de ciclohexanona sob agitação magnética até a dissolução (≈ 5 min.); (2) Posteriormente, acrescentou-se 0,05 g de poliaminoamida

(endurecedor - Araldite® 24 h), mantendo a agitação por mais 10 minutos; (3) Em seguida, adicionou-se lentamente 1,0 g de grafite (granulometria até 2  $\mu\text{m}$ ), mantendo-se o sistema em agitação por mais 24 h. Após este período, pequenas quantidades deste compósito podem ser transferidas para a superfície de interesse. A quantidade deste compósito fluido preparado por este procedimento rende vários eletrodos compósitos nas dimensões das células eletroquímicas utilizadas nesta tese. Na cura do material, este compósito deve permanecer exposto ao ar por 24 h (temperatura ambiente).

### **2.3. Imobilização de azul da Prússia (AP) no eletrodo compósito**

A modificação do eletrodo compósito com AP foi avaliada por três protocolos (P) encontrados na literatura. Nos dois primeiros (P1 e P2) são sintetizadas partículas de AP que posteriormente são inseridas na etapa de preparação do compósito fluido condutor. No terceiro procedimento (P3), as partículas (ou filme de AP) são eletrodepositadas num eletrodo compósito não modificado. Os procedimentos de modificação são detalhados a seguir.

#### **Procedimento 1 (P<sub>1</sub>): Síntese química de partículas de AP (pAP<sub>1</sub>)**

Partículas de AP foram preparadas pela mistura de 10,0 mL de soluções equimolares 0,1 mol L<sup>-1</sup> de ferrocianeto de potássio (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) e cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>). Desde o primeiro contato entre as soluções, a formação do AP é observada devido ao aparecimento de uma coloração azul intensa. Em seguida, adicionou-se acetona ( $\approx$  10 mL) para induzir a cristalização do AP. Após a estabilização da mistura, os cristais de AP foram separados por filtração. O material sólido foi levado a uma estufa para aquecimento a 150 °C por 10 horas para a ativação do modificador. Nesta etapa, os sítios ativos das partículas de AP ficam mais disponíveis devido à saída das moléculas de água por evaporação. Posteriormente, as partículas de AP foram submetidas à fricção mecânica com almofariz e pistilo, para a redução das dimensões. Finalmente, este pó foi separado em três intervalos de granulometria, através da



exclusão gerada por diferentes peneiras empilhadas e fixadas a um agitador mecânico. Os seguintes intervalos de partículas ( $P$ ) foram avaliados neste estudo:  $\varnothing < 37 \mu\text{m}$ ;  $37 \mu\text{m} < \varnothing < 90 \mu\text{m}$  e  $\varnothing > 90 \mu\text{m}$ .

Este procedimento de síntese de AP foi adaptado de um trabalho publicado em 2001 por O'Halloran e co-autores [95], que empregaram estas partículas para a fabricação de eletrodos impressos. Nesta tese, as partículas de AP são inseridas na etapa anterior à adição do grafite (etapa 3, item 2.2).

#### **Procedimento 2 ( $P_2$ ): Síntese química de partículas de AP adsorvidas em grafite ( $pAP_2$ )**

Neste procedimento, sob agitação magnética, é realizada a mistura de 10,0 mL de uma solução de ferricianeto de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  a 1,0 g de grafite (granulometria até  $2 \mu\text{m}$ ) e 10,0 mL de uma solução de cloreto férrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Estas duas soluções são preparadas na presença de HCl  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . Após dez minutos, o grafite contendo partículas de AP adsorvidas na superfície (Gr-AP) é submetido à filtração. Nesta etapa, o sólido é lavado com solução de HCl  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  até a obtenção de uma solução transparente. Então, o material sólido filtrado (Gr-AP) é ativado em estufa a  $100^\circ\text{C}$  por 1,5 h. No armazenamento deste material, o mesmo deve permanecer em um frasco escuro e hermeticamente fechado.

Este procedimento é similar ao de um trabalho publicado em 2001 por Moscone e colaboradores [94]. Nesta ocasião, o Gr-AP foi empregado na preparação de eletrodos de pasta de carbono. Nesta tese, este material é também adicionado na preparação do compósito fluido (item 2.2).

#### **Procedimento 3 ( $P_3$ ): Eletrodeposição de filme de AP em eletrodo compósito de grafite**

Nesta forma de modificação, o AP é eletrodepositado na superfície de um eletrodo compósito de grafite não modificado. O procedimento de eletrodeposição é realizado pela aplicação de  $+ 0,4 \text{ V}$  por 30 ou 100 s em um eletrodo de trabalho mergulhado em solução equimolar ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  e  $\text{FeCl}_3$ , na presença de KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e HCl  $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Posteriormente, os filmes de AP foram ativados

pelo emprego de voltametria cíclica (varreduras entre -0,05 V e 0,35 V numa velocidade de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) em solução de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Para fins de comparação, um eletrodo de carbono vítreo previamente polido com alumina também foi submetido ao mesmo procedimento de formação do filme de AP.

Este procedimento de formação do filme foi adaptado de um trabalho publicado em 1996 por Karyakin *et. al.* [136], onde ET modificados (biosensores) foram utilizados em análises empregando sistemas FIA.

## **2.4. Instrumentação**

As medidas eletroquímicas foram realizadas empregando-se um potenciostato  $\mu$ AUTOLAB tipo III (Eco Chemie - Metrohm; software GPES 4.9.007) ou um mini potenciostato Palmsens (Palmsens Instruments; software PSLite 1.8 ou PSTrace 1.4). Um eletrodo de Ag/AgCl/KCl<sub>sat.</sub> construído em laboratório [162] e um fio de platina foram usados como ER e EA, respectivamente. Como ET foram utilizados eletrodos compósitos (modificados ou não com partículas de AP) e eletrodos de filme de diamante dopado com boro (BDD). Detalhes da construção dos mesmos serão abordados nas seções 2.4.1.1 e 2.4.1.2, respectivamente.

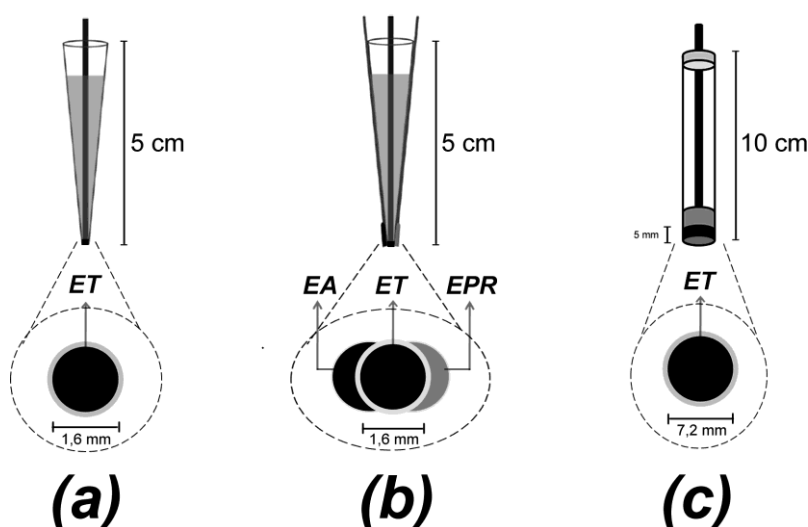
### **2.4.1. Eletrodos de trabalho**

#### **2.4.1.1. Eletrodos compósitos:**

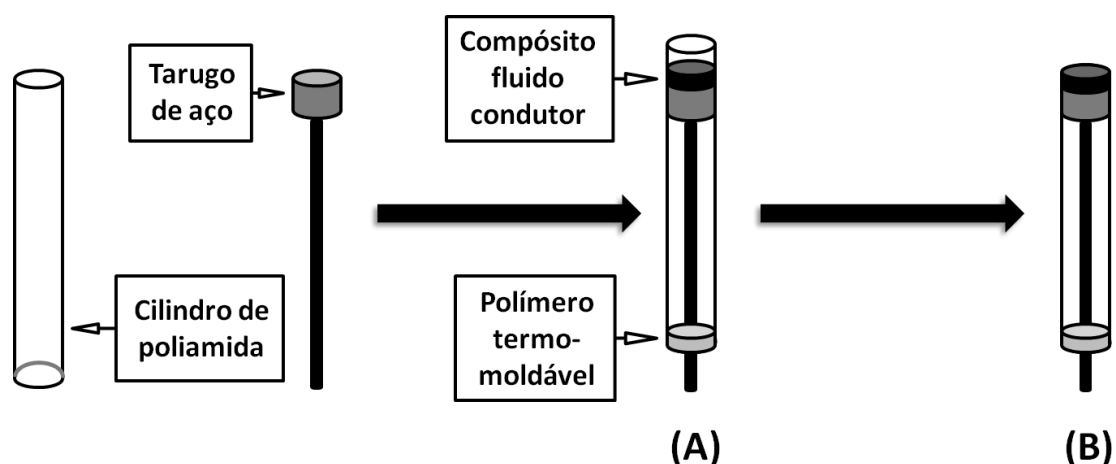
Todos os eletrodos compósitos foram construídos a partir do compósito fluído condutor preparado em laboratório (seção 2.2) não modificado ou modificado com AP. Porém, dependendo da finalidade, o ET foi construído em distintos suportes e arranjos. Nos estudos de caracterização, o ET compósito foi construído na extremidade de ponteiros de micropipeta ( $\varnothing_i = 1,6 \text{ mm}$ ; Figura 8a). No entanto, quando este eletrodo foi aplicado em sistemas FIA, dois outros eletrodos compósitos (EPR: compósito de prata e EA: compósito de grafite) foram imobilizados na extremidade externa da ponteira (Figura 8b) em posições diametralmente opostas. Deste modo,

tem-se uma microcélula (sensor “3 em 1”) facilmente adaptável na tubulação de um sistema FIA. Detalhes da construção deste sensor “3 em 1” são descritos em uma dissertação de mestrado [163] e em artigo publicado recentemente [9].

Na adaptação do ET de compósito no sistema BIA, o material foi imobilizado em suporte de tubo de poliamida ( $\varnothing_i = 7,2$  mm), obtendo-se então um eletrodo compósito de maior diâmetro (Figura 8c). A construção deste eletrodo foi realizada em duas etapas: 1) espalhamento do compósito fluido (modificado ou não com AP) sobre um tarugo de aço inox previamente fixado no interior de um tubo de poliamida (Figura 9A); 2) após a cura do material (24 h), a superfície do eletrodo foi polida com lixas d’água de granulação 400 (nivelamento da superfície do compósito e do tubo de poliamida) e 1200 (suavização da superfície) (Figura 9B). Esta etapa foi realizada com todos os eletrodos compósitos (Figuras 8a, 8b e 8c). Antes do início das medidas eletroquímicas, os eletrodos compósitos modificados com AP foram submetidos a alguns ciclos de potencial (voltamogramas cíclicos) entre - 0,10 V e + 0,35 V em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, para a ativação do modificador AP (estabilização do sinal). Usualmente, 30 voltamogramas cíclicos são suficientes. Já os eletrodos não modificados são estabilizados mais rapidamente ( $\approx$  5 voltamogramas).



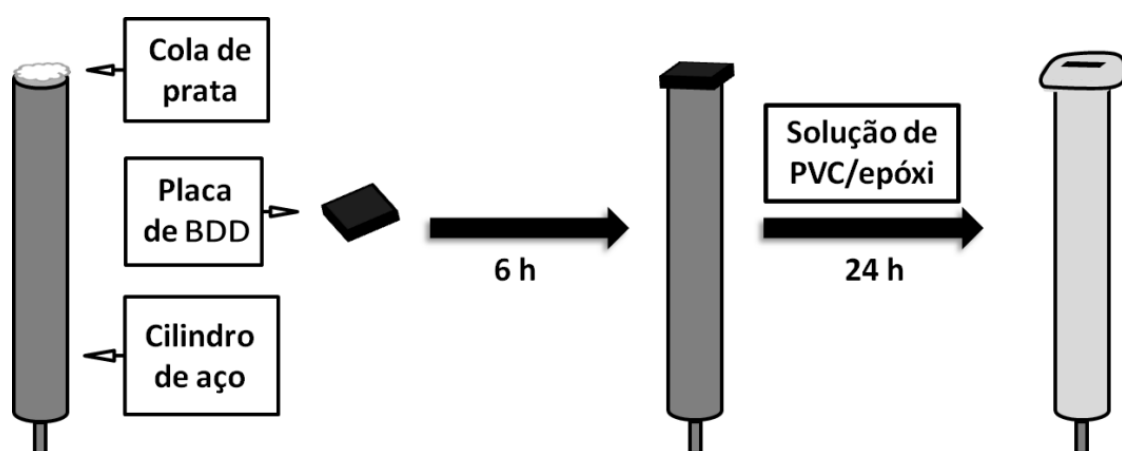
**Figura 8.** Diferentes configurações dos eletrodos compósitos empregados nesta tese (modificados ou não com AP). (a) Estudos de caracterização dos compósitos; (b) Aplicação em sistemas FIA (sensor “3 em 1”); (c) Aplicação em sistemas BIA.



**Figura 9.** Construção do ET compósito empregado no sistema BIA. (A) Fixação de um tarugo de aço inox em um cilindro de poliamida e inserção do compósito fluído na cavidade acima do tarugo e (B) e polimento do compósito pós cura (24 h).

#### 2.4.1.2. Eletrodos de diamante dopados com boro (BDD):

Conforme apresentado na Figura 10, os eletrodos de BDD foram construídos a partir da fixação de uma placa de BDD sobre um cilindro de aço com compósito de prata. Após o tempo de cura deste adesivo condutor ( $\approx 6$  h), a área lateral da placa de BDD e o cilindro de aço foram pincelados (espalhamento com auxílio de um pincel) com uma solução mista de PVC e adesivo epóxi preparada em laboratório (dissolução sob agitação de 1,0 g de raspas de PVC e 0,2 g de adesivo epóxi em 5,0 mL de tetrahydrofurano). Após o tempo de secagem do solvente e a cura do adesivo epóxi ( $\approx 24$  h), tem-se o então o eletrodo de BDD.



**Figura 10.** Esquema da construção do eletrodo de BDD fixado em suporte de aço.

A estratégia de isolar os eletrodos com PVC / adesivo epóxi permite que os eletrodos sejam utilizados por longo período nas medidas eletroquímicas em meio aquoso. Porém, em meios orgânicos esta longevidade fica bastante reduzida, devido, provavelmente, à gradual dissolução do adesivo epóxi neste meio. Para contornar esta limitação, as placas de BDD foram diretamente fixadas numa célula BIA em outra configuração (célula BIA 2, seção 2.4.3).

Antes do início das medidas eletroquímicas empregando o eletrodo de BDD, um procedimento de limpeza/ativação do eletrodo era necessário. Neste trabalho, duas ativações eletroquímicas foram utilizadas, a anódica e a catódica. Inicialmente, a ativação anódica era realizada com a aplicação de um potencial de + 2,0 V no eletrodo de BDD durante 1000 s em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ . Posteriormente aplicou-se uma corrente de - 0,01 A por 1000 s (ativação catódica) ao eletrodo de BDD no mesmo eletrólito para a funcionalização da superfície de BDD com átomos de hidrogênio terminais, tal como descrito por Suffredini *et. al.* [105]. O procedimento catódico foi realizado diariamente antes do início dos trabalhos. O anódico somente quando limpezas mais extremas eram necessárias. Porém, é importante salientar que após uma limpeza anódica, a catódica se faz necessária (funcionalização da superfície com hidrogênio).

#### **2.4.2. Sistema FIA**

Na detecção amperométrica em fluxo foi empregado um sistema FIA de linha única montado em laboratório. O esquema e os componentes básicos deste sistema são detalhados na Figura 1 (Introdução, item 1.2). As soluções foram transportadas por tubos de polietileno de 1 mm de diâmetro e 20 cm de comprimento (percurso analítico). O sistema de propulsão é baseado na pressão gerada por um mini compressor de ar (bomba de aquário) acoplado a uma coluna d'água [14], a qual permite um controle preciso de vazão sem pulsações. As injeções das soluções foram feitas por um injetor comutador manual (Cena- USP) [17]. A detecção foi realizada pela microcélula “3 em 1” construída em ponteira de micropipeta de 100  $\mu\text{L}$  [9], que é facilmente adaptada no final da tubulação de um sistema FIA (célula do tipo “wall

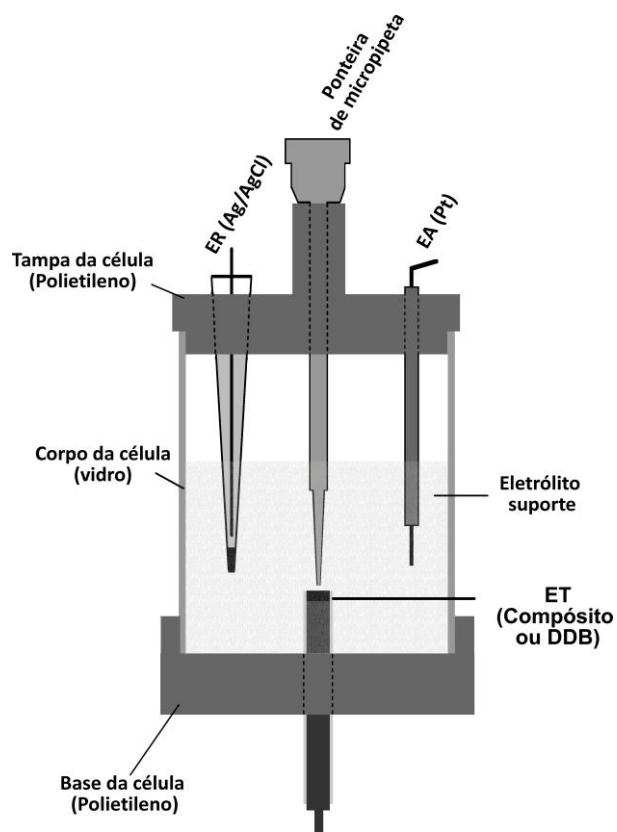
Jet"). Logo, não é necessária a construção de células para o posicionamento dos eletrodos, pois a ponteira já contém os três eletrodos (ET, EA e ER) posicionados em sua extremidade. No presente trabalho, o ET compósito da microcélula contém o modificador AP imobilizado no corpo do eletrodo, de forma a conferir seletividade ao peróxido de hidrogênio.

#### **2.4.3. Sistema BIA**

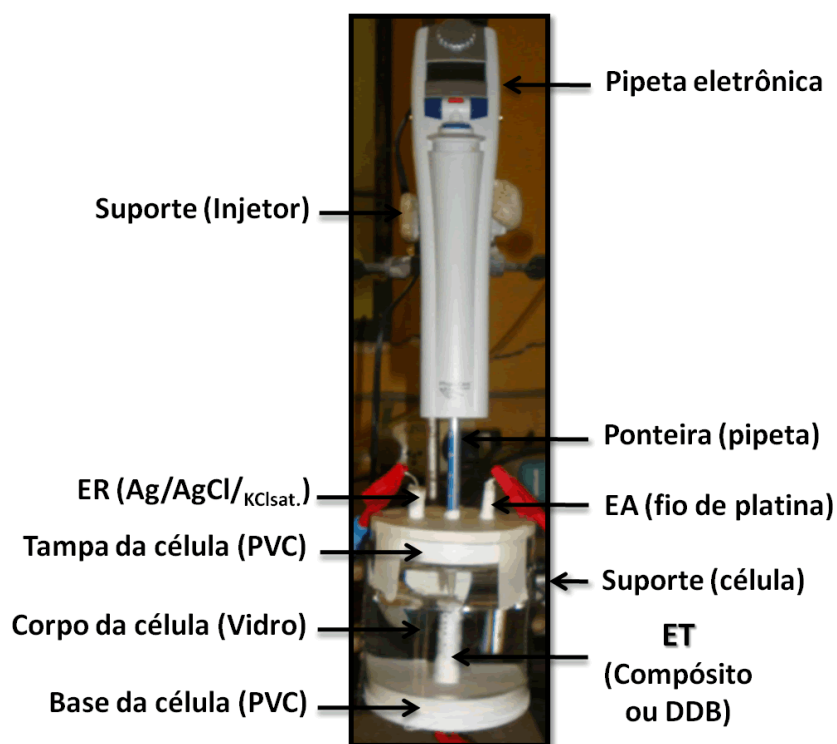
##### **Sistema BIA nº 1 - Célula para acomodação de ET compósito de corpo cilíndrico:**

O esquema do sistema BIA 1 é semelhante ao sistema descrito na Figura 2 (Introdução da tese, Item 1.3). No entanto, neste sistema BIA não foi utilizado um agitador magnético. O corpo da célula BIA era de vidro ( $H = 7,1$  cm;  $\varnothing_i = 7,3$  cm), com um volume total de eletrólito de aproximadamente 200 mL. Cilindros rígidos de PVC ( $\varnothing_i = 7,2$  cm, altura = 15,0 cm) foram empregados como tampa e base da célula. A tampa da célula continha três orifícios: um deles central (6,0 mm), para a inserção da ponteira da micropipeta eletrônica, e os outros dois (laterais) para o posicionamento do ER (Ag/AgCl/KCl<sub>sat.</sub>) e do EA (fio de platina). Na base da célula foi feito um orifício de 11,5 mm de diâmetro exatamente no centro para o encaixe do ET, que é inserido em posição invertida à usual. Esta célula BIA foi empregada quando foi utilizado o ET compósito modificado com AP em suporte de poliamida (Figura 9) e o ET de BDD suportado em cilindro de aço (Figura 10). As injeções foram realizadas com uma pipeta eletrônica (Eppendorf® Multipette stream). A extremidade da ponteira da pipeta foi mantida em distância fixa de 2,0 mm da superfície do ET, conforme recomendado em trabalho publicado anteriormente [32]. Todos os componentes da célula BIA são detalhados na Figura 11.

Com a finalidade do uso prolongado desta célula BIA, algumas estratégias foram adotadas para aumentar a robustez do sistema (p.ex. prevenir rachaduras e vazamento de soluções na célula): a) Vedação dos cilindros de PVC (tampa e base) ao corpo de vidro com silicone e b) Reforço da aderência do ET na base da célula através do espessamento do corpo do ET com fita Teflon®.



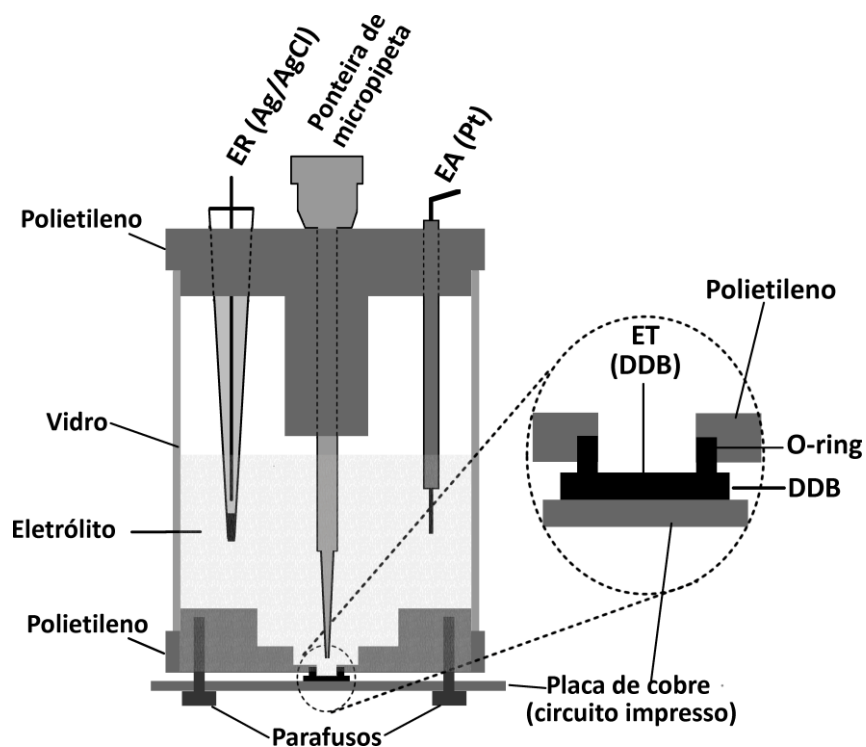
(A)



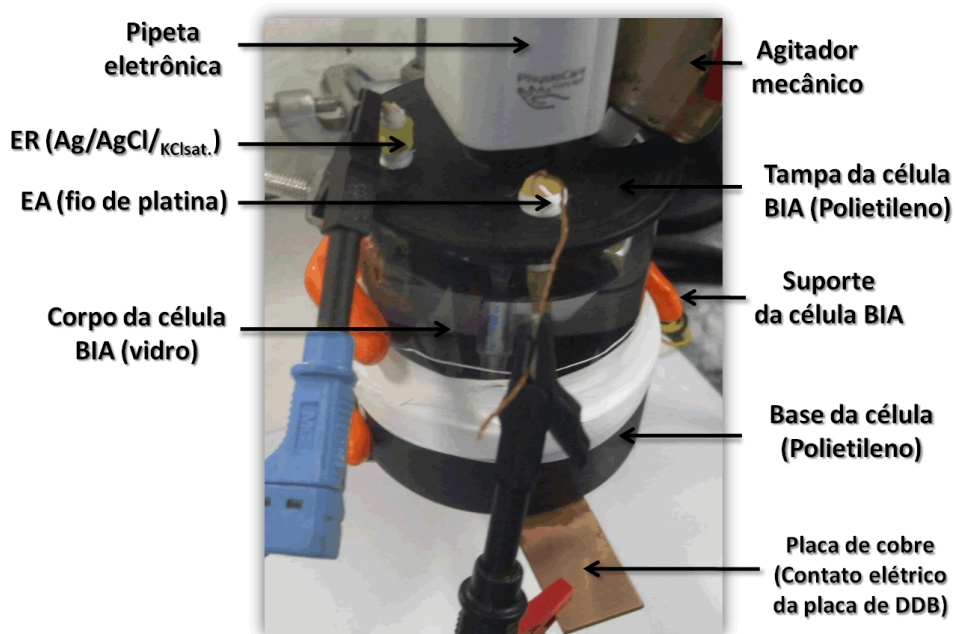
(B)

**Figura 11.** (A) Esquema do sistema BIA (célula 1); (B) Respectiva imagem da célula durante as medidas eletroquímicas.

**Sistema BIA nº 2 - Célula para inserção da placa de BDD:**



(A)

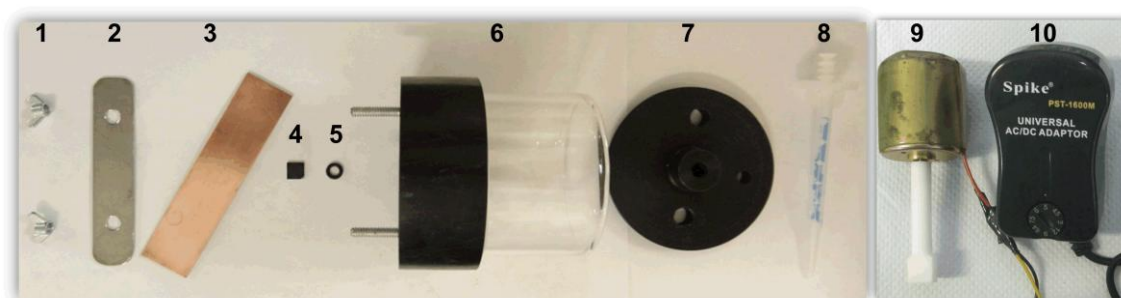


(B)

**Figura 12.** (A) Esquema do sistema BIA (célula 2); (B) Imagem em perspectiva da célula durante as medidas eletroquímicas.



As imagens da célula BIA 2 e dos seus componentes individualmente são mostradas na Figura 12 e 13, respectivamente. Nesta célula, a placa de BDD é prensada firmemente contra um anel de borracha (“o-ring”) de um lado e um contato elétrico de cobre (placa de circuito impresso) do outro lado. Esta fixação é possível girando-se duas borboletas metálicas a dois parafusos imobilizados na base da célula. O anel de borracha (“o ring”) tem a função de delimitar a área do ET e minimizar a força de repulsão gerada pela prensagem da célula BIA contra a frágil película de BDD. Além disto, ele é resistente a solventes orgânicos normalmente utilizados em medidas eletroquímicas, tal como etanol.



**Figura 13.** Vista dos componentes individuais da célula BIA 2: (1) Borboletas (porcas) para fixação nos parafusos imobilizados na base da célula; (2) placa metálica de reforço; (3) placa de circuito impresso de cobre; (4) placa de BDD (0,7 x 0,7 cm); (5) anel de borracha “o-ring” ( $\varnothing_{\text{interno}} = 8 \text{ mm}$ ); (6) tubo de vidro inserido em polietileno; (7) tampa da célula, (8) ponteira da micropipeta eletrônica (1,0mL); (9) agitador mecânico (micromotor DC); (10) fonte de alimentação universal.

A tampa da célula contém quatro orifícios, sendo um concêntrico ao ET para a posicionamento da ponteira da micropipeta eletrônica (distância entre o ET e a ponteira  $\approx 2 \text{ mm}$ ), dois para a fixação do ER (Ag/AgCl/KClsat.) e do EA (fio de Pt) e o último orifício para a inserção do agitador mecânico. Este agitador (Item 9, Figura 13) foi construído pela adaptação de uma “hélice” de teflon num micromotor DC de 24 V retirado de uma impressora. Este motor foi conectado eletricamente a uma fonte de alimentação universal (Spyke, PST-1600 M), mostrada no item 10 da Figura 13. Esta fonte permite a escolha de oito tensões de saída (3,0; 4,5; 5,0; 6,0; 7,5; 8,4; 9,0 ou 12 V), tornando então possível controlar a velocidade de agitação de acordo com a

intensidade da tensão de saída. Experimentalmente, foi verificado que essas tensões correspondem a velocidades de aproximadamente 700, 1200, 1400, 1800, 2200, 2600, 2700 e 4000 rotações por minuto (RPM).

## 2.5. Estudos de caracterização do eletrodo compósito modificado com AP

O desempenho destes sensores foi avaliado utilizando-se voltametria cíclica e amperometria. Nestes experimentos foi empregada uma célula de acrílico ( $\approx 5,0$  mL) contendo três eletrodos (ET: compósito, EA: Platina, ER: Ag/AgCl/KCl<sub>sat.</sub>) imersos no eletrólito suporte KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . As condições específicas são detalhadas abaixo:

- a) Voltametria cíclica: Cada ET foi avaliado mediante voltamogramas cíclicos sucessivos no intervalo entre  $-0,1 \text{ V}$  a  $+0,35 \text{ V}$  a  $20 \text{ mV s}^{-1}$ . Estes experimentos foram realizados sem agitação mecânica da solução (sistema estacionário) e foram úteis nos estudos de excesso superficial de azul da Prússia, resistência ôhmica, reprodutibilidade e estabilidade.
- b) Amperometria: Nestes ensaios, foi avaliada a resposta dos ET modificados com AP frente a adições de peróxido. Um potencial de  $0,0 \text{ V}$  foi aplicado ao ET, enquanto soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  eram sucessivamente injetadas na célula eletroquímica submetida à agitação magnética (convecção mecânica).

Além disto, foi realizada uma microscopia eletrônica da superfície do eletrodo de trabalho modificado com partículas de azul da Prússia sintetizadas na presença de grafite (pAP<sub>2</sub>). Para isto foi empregado um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo Supra 40 Zeiss.

## **2.6. Aplicações dos eletrodos compósitos modificados com AP**

### **2.6.1. Sensor “3 em 1” adaptado ao sistema FIA**

Este sistema foi empregado na determinação de peróxido de hidrogênio em amostras de anti-séptico bucal e leite UHT (desnatado e integral). Como técnica de detecção foi empregada a amperometria, através do monitoramento da corrente de redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na superfície do ET de compósito. Para ocorrer tal conversão, um potencial de -0,1 V foi aplicado entre o EPR (compósito de prata) e o ET. Uma solução mista de KCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e tampão fosfato 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 7,2) foi empregada como eletrólito suporte.

Os resultados obtidos com a metodologia proposta na determinação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em anti-séptico bucal foram comparados aos obtidos pelo método padrão de titulação iodométrica. Nesta metodologia, uma solução de iodeto ( $\text{I}^-$ ) é adicionada na amostra que contém peróxido. Então, o iodo ( $\text{I}_2$ ) gerado (produto da reação entre  $\text{I}^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é titulado com solução de tiosulfato de sódio [164]. Além disto, estudos de adição e recuperação foram realizados através das medidas eletroquímicas das soluções de amostras antes e após adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tanto nas amostras de antisséptico bucal quanto nas amostras de leite UHT.

### **2.6.2. Eletrodo compósito em sistema BIA**

Este sistema foi utilizado na determinação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em leite UHT desnatado e integral, ambas do tipo UHT. As condições experimentais neste sistema foram similares às empregadas no sensor “3 em 1” (FIA), porém com aplicação de 0,0 V (vs Ag/AgCl/ $\text{KCl}_{\text{sat.}}$ ). Para otimizar o sistema, foram avaliadas as correntes de redução referentes às injeções de diferentes volumes de solução padrão contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  na célula BIA. Além disto, soluções padrões contendo concentrações crescentes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram injetados no sistema, de forma a calcular os parâmetros analíticos do sistema (sensibilidade, faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação). A exatidão desta metodologia foi avaliada através de estudos de adição e recuperação. Neste

estudo, as amostras de leite foram analisadas antes e após serem dopadas com solução padrão de peróxido.

## **2.7. Aplicações do eletrodo de diamante dopado com boro em sistema BIA**

Este sistema foi utilizado nas determinações simultâneas de PA e CA, de DI e CA em formulações farmacêuticas e de TBHQ, BHA e BHT em amostras simuladas e de biodiesel. Na detecção simultânea destes analitos no sistema BIA, foi utilizada a detecção por Amperometria de Múltiplos Pulsos.

Anteriormente às análises simultâneas de cada conjunto de analitos, foram otimizadas a sequência e tempo dos pulsos de potencial aplicados ao ET (variáveis da detecção por MPA), bem como o volume injetado, velocidade de injeção e agitação do agitador mecânico (variáveis do sistema BIA).

Nos dois primeiros conjuntos avaliados (PA/CA e DI/CA) utilizou-se solução aquosa de tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 4,7) como eletrólito suporte e o sistema BIA 1 (seção 2.4.3). Na determinação dos três antioxidantes (TBHQ/BHA/BHT) foi utilizado um eletrólito suporte composto por solução contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl e KCl (pH = 1,0) em meio de 30/70 ou 50/50 % (v/v) de etanol/água, respectivamente. Neste caso, devido à presença de etanol no eletrólito, as medidas eletroquímicas foram realizadas empregando a célula BIA 2 (seção 2.4.3), devido à sua maior resistência na presença do meio orgânico (etanol).

## ***RESULTADOS E DISCUSSÕES***

### **3.1. Estudos de caracterização do eletrodo compósito modificado com AP**

Em alguns trabalhos encontrados na literatura [94-96, 134, 135, 165] foi observado que o desempenho final dos sensores (e biosensores) baseados em AP depende drasticamente de alguns fatores, como: procedimento de modificação da superfície do material condutor com AP, dimensões das partículas de AP, quantidade relativa do modificador, tipo de substrato utilizado e pré-tratamento do eletrodo.

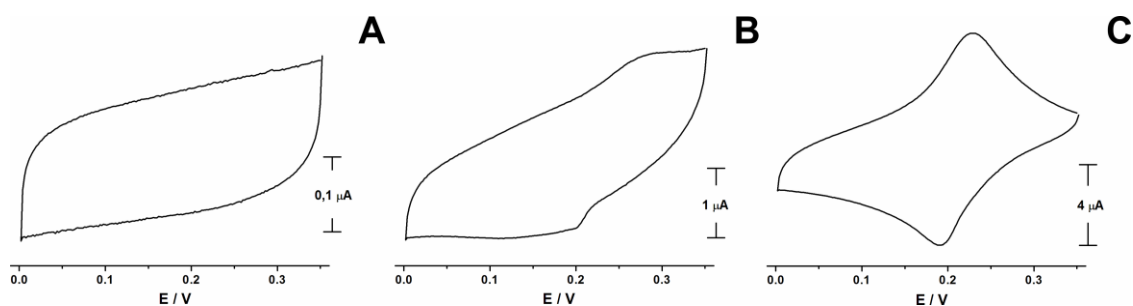
Em posse destas informações, três procedimentos de modificação encontrados na literatura (P1, P2 e P3) foram avaliados, de modo a verificar o comportamento dos eletrodos modificados e então adotar o protocolo mais adequado na construção dos eletrodos compósitos seletivos a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nos experimentos de voltametria cíclica, informações puderam ser obtidas a respeito da resistência ôhmica, excesso superficial ( $\Gamma$ ), reprodutibilidade inter-eletrodo, dentre outras. Além disto, o comportamento de cada material também foi investigado na presença do analito peróxido de hidrogênio, através dos experimentos por amperometria. Os resultados e discussões destas caracterizações serão detalhados nos próximos itens (3.1.1 a 3.1.4).

#### **3.1.1. Síntese de partículas de AP para modificação no corpo do compósito (pAP<sub>1</sub>/pAP<sub>2</sub>)**

Nesta seção foram comparados os dois eletrodos compósitos modificados com partículas de AP no corpo do eletrodo. Um destes eletrodos contém partículas de AP sintetizadas pelo procedimento P<sub>1</sub> (pAP<sub>1</sub>;  $\varnothing < 37 \mu\text{m}$ ; AP sintetizado separadamente) e o outro que contém partículas obtidas por P<sub>2</sub> (pAP<sub>2</sub>; AP sintetizado na presença de grafite). Para maiores detalhes, olhar seção 2.3. Na Figura 14 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos em meio de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> para os eletrodos compósitos sem (A) e com (B = pAP<sub>1</sub>; C = pAP<sub>2</sub>) a inserção de partículas de AP.

Conforme ilustrado na Figura 14, nos eletrodos compósitos modificados com partículas de AP (14B e 14C) é possível notar a presença do modificador FeHCF, devido aos picos de oxidação do Fe(II) em aproximadamente +0,25 V e de redução do Fe(III) em +0,20 V, característicos da conversão em azul da Prússia (AP) e branco da Prússia

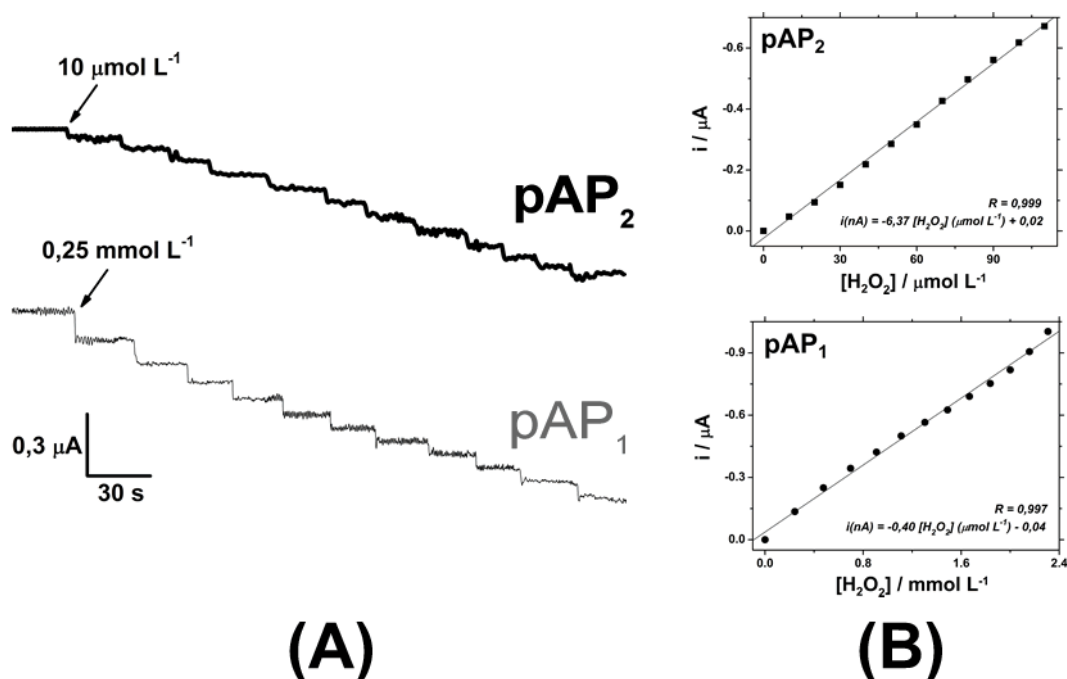
(BP), respectivamente. Estes picos não estão presentes no eletrodo compósito não modificado (14A). No entanto, os voltamogramas referentes ao eletrodo compósito modificado com pAP<sub>1</sub> (14B) apresentaram  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  quatro vezes menos intensas do que o eletrodo contendo pAP<sub>2</sub> (14C). Além disto, este voltamograma (14B) também apresenta maior resistência ôhmica. Voltamogramas cíclicos (não apresentados) de um eletrodo preparado com pAP<sub>1</sub> (> 37  $\mu\text{m}$ ) apresentaram perfis mais resistivos ( $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  não são observados). De acordo com a literatura [94], esta menor resistência é observada no eletrodo contendo pAP<sub>2</sub> devido à maior conectividade das partículas de AP com as do grafite, devido à adsorção física promovida durante a síntese.



**Figura 14.** Voltamogramas cíclicos obtidos em soluções de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> com eletrodo compósito não modificado (A) e compósito contendo 2,15 % (m/m) de pAP<sub>1</sub> (B) e de pAP<sub>2</sub> (C). Velocidade de varredura: 20 mV s<sup>-1</sup>. A proporção (m/m) foi calculada em relação à quantidade de grafite na mistura.

O comportamento dos eletrodos pAP<sub>1</sub> e pAP<sub>2</sub> na presença do analito peróxido de hidrogênio também foi verificado. Os experimentos por amperometria com a adição de alíquotas de solução padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> numa célula sob agitação constante (agitador magnético) são apresentados na Figura 15.

Conforme pode ser observado (Figura 15), o eletrodo compósito contendo pAP<sub>1</sub> possui uma sensibilidade 16 vezes inferior à sensibilidade do compósito pAP<sub>2</sub>. Esta diferença pode ser atribuída a uma menor quantidade de AP disponível na superfície do eletrodo compósito em pAP<sub>1</sub>. De fato, o excesso superficial ( $\Gamma$ ) calculado nos eletrodos compósitos contendo pAP<sub>1</sub> e pAP<sub>2</sub> foi de 2,0 e 7,7 (nmol cm<sup>-2</sup>), respectivamente. O excesso superficial ( $\Gamma$ ) é uma grandeza que fornece uma estimativa da quantidade de algum modificador existente na superfície do ET por unidade de área a partir dos resultados de um voltamograma cíclico.



**Figura 15.** (A) Amperogramas obtidos com dois eletrodos compósitos contendo partículas de AP no corpo do eletrodo (pAP<sub>1</sub> e pAP<sub>2</sub>) com a adição sucessiva de alíquotas de solução padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em célula eletroquímica sob agitação constante (agitação magnética); (B) Respektivas curvas de calibração. Eletrólito: KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

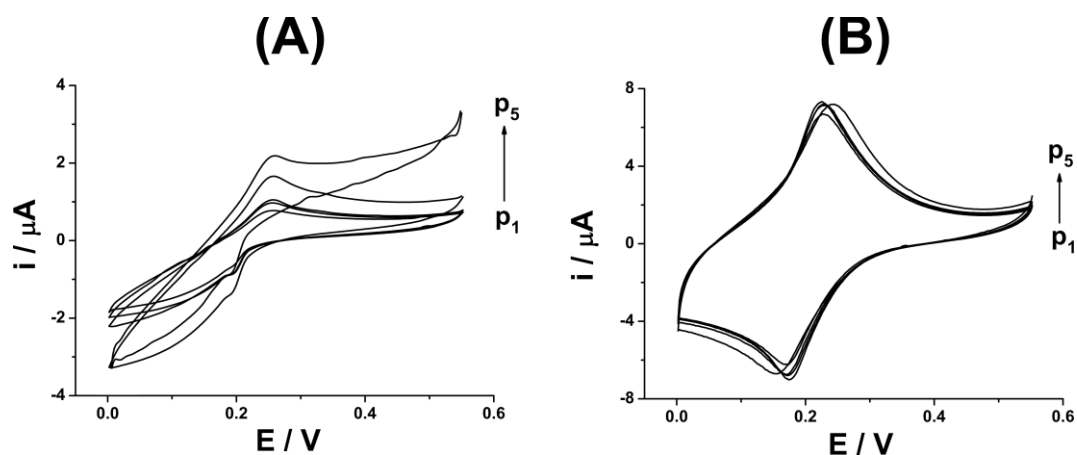
De acordo com a literatura [166], a eq. 5 pode ser utilizada para o cálculo de  $\Gamma$ :

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (5)$$

Nesta equação, “Q” é a carga elétrica, “n” é o número de elétrons envolvidos no par redox, “F” é a constante de Faraday e “A” é a área do eletrodo. No caso destes eletrodos, a carga (Q) é obtida pela integral do pico catódico dos voltamogramas cíclicos dos eletrodos contendo AP (Figura 14B ou 14C) multiplicada pelo inverso da velocidade de varredura. As constantes desta equação são  $n = 4$ ,  $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$  e  $A = 0,0201 \text{ cm}^2$  (área de um ET de diâmetro igual a 1,6 mm).

Outra caracterização foi realizada para verificar a distribuição das partículas de AP na superfície do ET. Neste estudo, voltamogramas cíclicos foram realizados em meio de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> com os eletrodos contendo pAP<sub>1</sub> e pAP<sub>2</sub> submetidos a suaves polimentos com a lixa d’água de fina granulação (rugosidade = 2000). Após cada suave polimento dos eletrodos, um novo voltamograma cíclico foi adquirido (Figura 16).

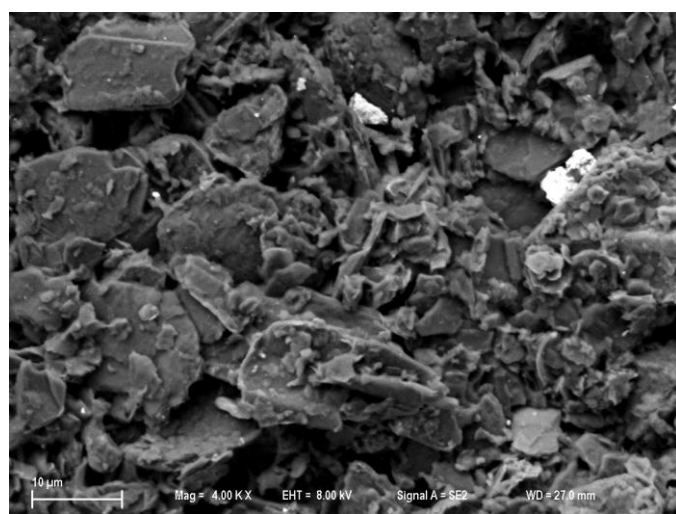




**Figura 16.** Voltamogramas obtidos em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> entre cinco suaves polímeros (P<sub>1</sub>-P<sub>5</sub>) para os compósitos contendo pAP<sub>1</sub> (A) e pAP<sub>2</sub> (B). Vel. varredura: 20 mV s<sup>-1</sup>.

Conforme visualizado, o eletrodo contendo pAP<sub>2</sub> (B) apresentou uma menor variação na quantidade de AP presente (em contato com a solução) na superfície do eletrodo ( $\Gamma$ ) entre os diversos polímeros (DPR = 1,6 %; n = 5) do que o eletrodo contendo pAP<sub>1</sub> (A; DPR = 11,9 %; n=5). Este resultado indica que as pAP<sub>2</sub> estão mais homogeneamente distribuídas no corpo do eletrodo do que as pAP<sub>1</sub>.

A Figura 17 apresenta uma micrografia eletrônica de varredura da superfície de um eletrodo compósito modificado com 2,15 % de pAP<sub>2</sub>. Conforme apresentado, as partículas de pAP<sub>2</sub> possuem dimensões que variam de 0,2  $\mu$ m até 2  $\mu$ m. Já as partículas de pAP<sub>1</sub> possuem maiores dimensões (dimensões de até 37  $\mu$ m).



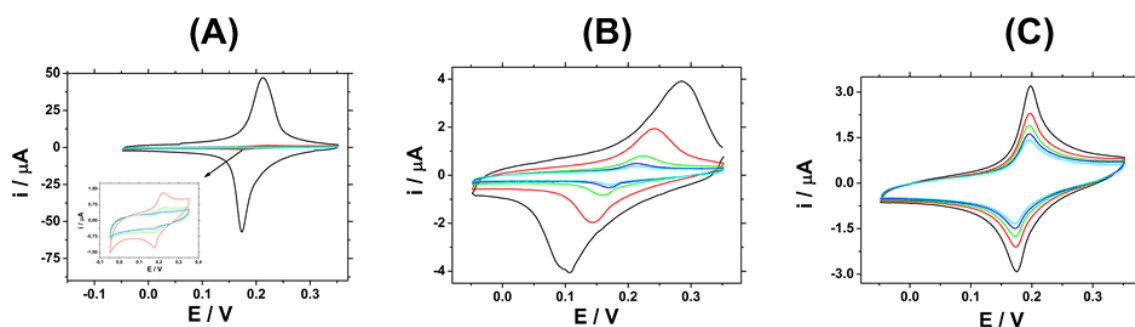
**Figura 17.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de baixa resolução obtida da superfície de um eletrodo compósito de grafite contendo 2,15 % de pAP<sub>2</sub>.

Resumidamente, os eletrodos compósitos de grafite contendo as partículas de AP obtidas pelo procedimento 2 (pAP<sub>2</sub>) apresentaram um melhor desempenho, devido a um menor efeito de resistência ôhmica, maior sensibilidade à detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e uma distribuição mais uniforme das partículas de AP no eletrodo.

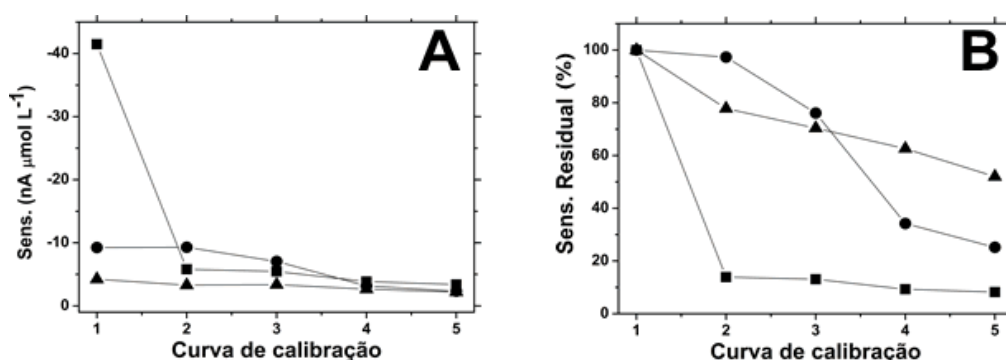
### **3.1.2. Partículas de AP presentes no ET (pAP<sub>2</sub>) versus filme de AP eletrodepositado**

Os primeiros trabalhos envolvendo AP na determinação eletrocatalítica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> empregavam filmes de AP eletrodepositados em eletrodo de carbono vítreo [167]. Porém, o filme de AP apresentava sérias limitações, principalmente devido à baixa estabilidade operacional em soluções levemente ácidas, neutras e básicas [168]. Esta limitação foi contornada através do recobrimento do filme de AP com filmes de polímeros protetores (p.ex., Nafion<sup>®</sup>, polianilina, acetato de celulose) [136, 169, 170]. Posteriormente foi descoberto que em meio neutro, a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo AP gera ânions hidroxila (OH<sup>-</sup>). Experimentalmente verificou-se uma melhora na estabilidade do filme em meios tamponados [171], devido à neutralização dos ânions OH<sup>-</sup> gerados. Segundo de Mattos *et. al.* [92], em condições de fluxo (sistemas FIA), a estabilidade operacional pode ser aumentada controlando-se as condições de eletrodeposição (concentração dos reagentes e tempo de deposição) e de ativação do filme de AP (tempo, temperatura e eletrólito suporte).

Neste trabalho, o desempenho do eletrodo compósito contendo partículas de AP obtidas pela síntese química (pAP<sub>2</sub>) no corpo do eletrodo foi avaliado frente ao eletrodo contendo filme de AP eletrodepositado na superfície de carbono vítreo (CV/AP) e de eletrodo compósito de grafite não modificado (C/AP). Cada ET foi testado por amperometria mediante a elaboração de cinco curvas de calibração sucessivas para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Alíquotas de solução padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 µmol L<sup>-1</sup>) foram sucessivamente adicionadas em célula eletroquímica sob agitação (agitador magnético). Anteriormente a cada curva de calibração, foi registrado um voltamograma cíclico de cada eletrodo em eletrólito composto por KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Estes voltamogramas cíclicos e as sensibilidades obtidas em cada curva de calibração são apresentados nas Figura 18 e 19A, respectivamente.



**Figura 18.** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> para os eletrodos CV/AP (A), C/AP (B) e pAP<sub>2</sub> (C) antes da obtenção da curva de calibração 1 (—), 2 (—), 3 (—), 4 (—) e 5 (—). Velocidade de varredura: 50 mV s<sup>-1</sup>.



**Figura 19.** (A) Sensibilidades e (B) sensibilidades residuais\* calculadas de cinco curvas de calibração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtidas com os eletrodos CV/AP(■), C/AP(●) e pAP<sub>2</sub>(▲). Curvas de calibração: amperogramas obtidos para injeções sucessivas de 10 μmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> numa célula contendo KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> sob agitação mecânica. \*Sens. residual = 100 x (Sens. curva<sub>n</sub> / Sens. curva<sub>1</sub>).

Como pode ser observado na Figura 18, as áreas dos voltamogramas (e consequentemente  $\Gamma$ ) diminuem em função das sucessivas curvas de calibração para peróxido, o que indica um consumo (saída) do AP da superfície dos eletrodos. Esta dissolução provoca a gradativa diminuição da sensibilidade dos eletrodos submetidos a repetidas injeções de peróxido (Figura 19A). Porém, este consumo é bem menos pronunciado nos eletrodos contendo partículas de AP no corpo do eletrodo (▲) do que os eletrodos com filmes de AP depositados em sua superfície (■ e ●). Conforme mostrado na Figura 19B, o eletrodo pAP<sub>2</sub> mantém 52 % do sinal analítico inicial após ser submetido a cinco curvas de calibração com soluções padrão de peróxido. Já os

eletrodos CV/AP e C/AP mantêm, respectivamente, apenas 8 e 25 % do sinal inicial. Na literatura, o aumento da estabilidade operacional de eletrodos contendo partículas de AP no corpo do eletrodo em meios neutros e básicos já havia sido descrita para outros materiais compósitos (p.ex. pasta de carbono [94, 165] e eletrodos impressos [95]).

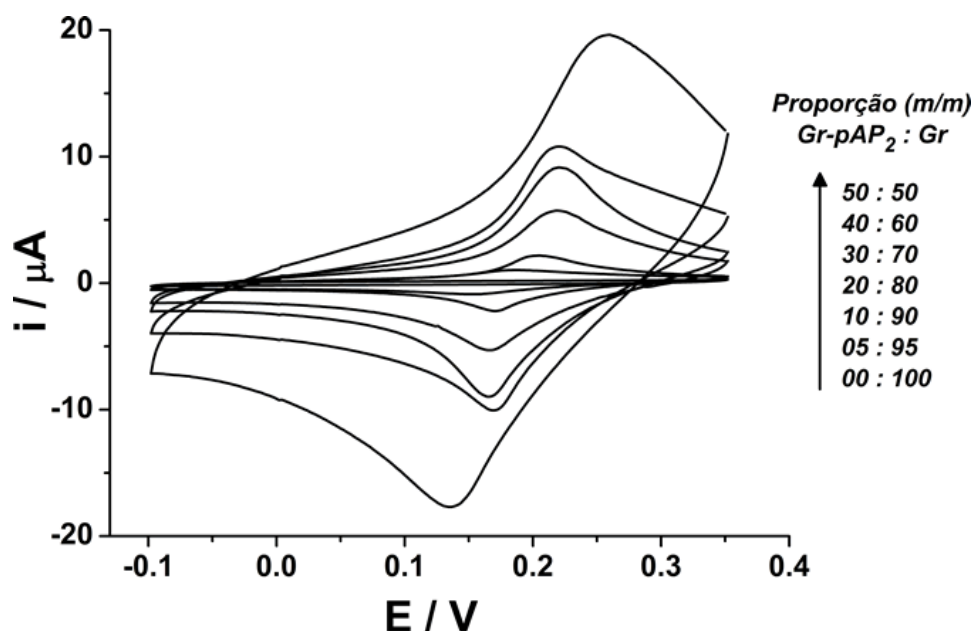
### 3.1.3. Otimizações do compósito fluido modificado com pAP<sub>2</sub>

Conforme verificado, o compósito contendo partículas de AP sintetizadas na presença de grafite (pAP<sub>2</sub>) no corpo do eletrodo apresentou o melhor desempenho dentre os três procedimentos avaliados. Visando a obtenção de um sensor mais eficiente na detecção peróxido de hidrogênio, a otimização da quantidade relativa destas partículas no eletrodo compósito foi investigada. Para isso, na etapa de preparação do compósito fluido, diferentes porções do grafite puro (Gr) foram substituídas por grafite contendo AP (Gr-pAP<sub>2</sub>). A Figura 20 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> com eletrodos contendo diferentes frações de Gr-pAP<sub>2</sub>. A Tabela 3 apresenta os parâmetros voltamétricos obtidos a partir dos experimentos da Figura 20.

Conforme apresentado (Figura 20), em todas as proporções contendo o modificador é possível notar a presença de AP no eletrodo (picos de formação de AP e BP em 0,20 V e 0,15 V, respectivamente). No material não modificado (proporção 00 : 100), estes picos não estão presentes. Conforme mostrado na Figura 20 e Tabela 3, um aumento nos valores de  $\Delta I_p$  ocorre em eletrodos com proporções maiores de Gr-pAP<sub>2</sub>, o que é consequência de uma maior quantidade de AP no corpo do eletrodo.

De acordo com a Tabela 3, quanto maior a quantidade de GAP presente no eletrodo, maiores são as separações dos potenciais de pico anódico e catódico ( $\Delta E_p$ ). Este aumento na  $\Delta E_p$  é causado por um efeito resistivo devido à presença de AP. Estas limitações identificadas em sensores contendo altas frações de AP são semelhantes aos reportados na literatura em outros compósitos [94, 95, 165]. De acordo com estes trabalhos, as partículas de grafite modificadas com AP são menos condutoras do que as de grafite puro, logo a resistência aumenta com o aumento da porcentagem de Gr-pAP<sub>2</sub>. Estes eletrodos contendo AP foram também testados em função da resposta a

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por amperometria com a aplicação de um potencial constante de 0,0 V. As curvas de calibração obtidas nestes experimentos são apresentadas na Figura 21.



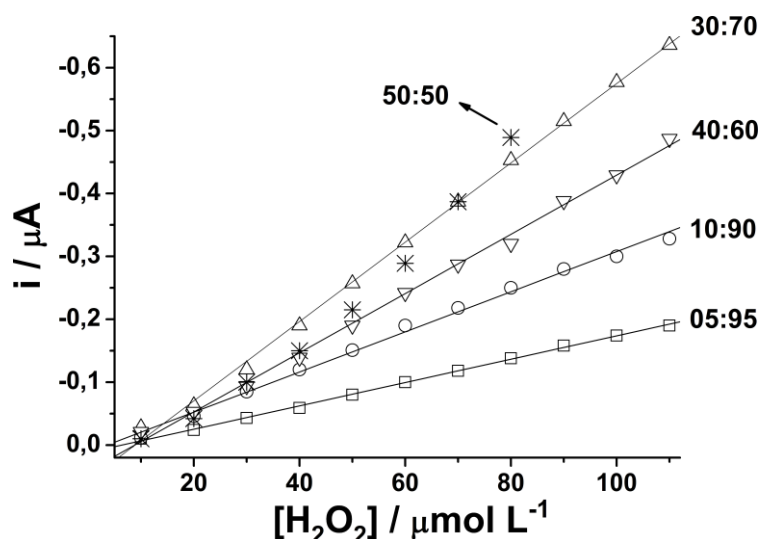
**Figura 20.** Voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> com os eletrodos compósitos contendo diferentes proporções de Gr-pAP<sub>2</sub> : Gr. Vel. varredura: 20 mV s<sup>-1</sup>.

**Tabela 3.** Parâmetros voltamétricos dos eletrodos compósitos contendo diferentes proporções de grafite modificado com AP (Gr-pAP<sub>2</sub>) e grafite puro (Gr)

	Proporções Gr-pAP <sub>2</sub> : Gr					
	5:95	10:90	20:80	30:70	40:60	50:50
E <sub>pc</sub> (mV)	154	170	168	166	170	136
E <sub>pa</sub> (mV)	186	206	218	220	230	260
ΔE <sub>p</sub> (mV)	32	36	50	54	60	124
I <sub>pc</sub> (μA)	-0,88	-2,21	-5,30	-8,98	-10,07	-17,70
I <sub>pa</sub> (μA)	1,03	2,18	5,73	9,15	10,80	19,64
ΔI <sub>p</sub> (μA)	1,92	4,39	11,03	18,13	20,87	37,34
I <sub>pa</sub> / I <sub>pc</sub>	1,17	0,99	1,08	1,02	1,07	1,11
Q (μC) <sup>1</sup>	0,18	0,30	0,88	1,34	1,82	3,63
Γ (nmol cm <sup>-2</sup> ) <sup>2</sup>	1,16	1,93	5,67	8,64	11,73	23,40

<sup>1</sup> Cargas obtidas pelas integrais de pico catódico dos voltamogramas da figura 20.

<sup>2</sup>  $\Gamma = Q / nFA$ ; Q: carga (C); n: número de elétrons envolvidos no par redox (4); F: constante de Faraday (96.485 C mol<sup>-1</sup>); A: área geométrica do eletrodo com  $\varnothing = 1,6$  mm (0,0201 cm<sup>2</sup>).

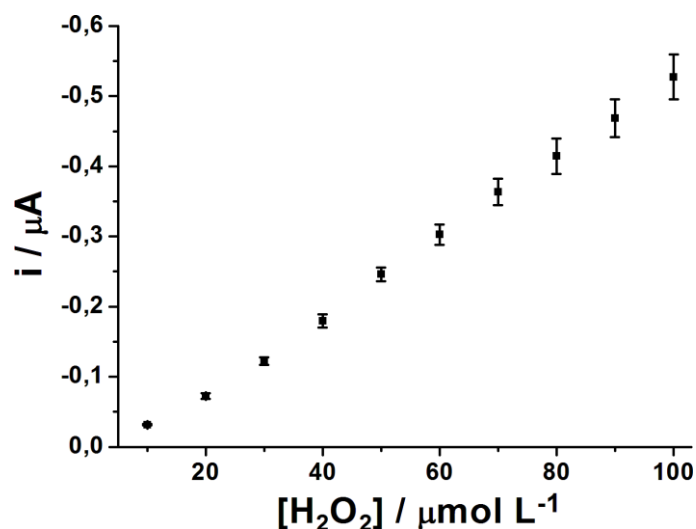


**Figura 21.** Curvas de calibração obtidas para eletrodos construídos em diferentes proporções de Gr-pAP<sub>2</sub>:Gr para injeções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; E<sub>ap.</sub>: 0,0 V; Eletrólito: KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Conforme apresentado na Figura 21, foi verificado que a intensidade de resposta dos eletrodos de composição 05:95, 10:90, 20:80 e 30:70 (proporção de Gr-pAP<sub>2</sub>:Gr) é proporcional ao aumento da quantidade de AP na superfície do eletrodo. Em proporções de Gr-pAP<sub>2</sub> maiores (40:60 e 50:50), o efeito de queda ôhmica prevalece sobre o excesso de AP na superfície do eletrodo, deixando o eletrodo mais resistivo (Figura 20 e Tabela 1), mais instável e com menor razão sinal/ruído (resultados não apresentados). Assim, o eletrodo de composição intermediária (30:70 em Gr-pAP<sub>2</sub>: Gr) apresentou o melhor desempenho considerando simultaneamente características como resistência à transferência eletrônica, sensibilidade e estabilidade. Nesta proporção, o teor calculado de AP no eletrodo compósito é de 2,15% (m/m).

A homogeneidade do compósito fluido preparado e a reprodutibilidade na construção dos eletrodos modificados também foram verificadas. Neste estudo, cinco eletrodos na composição otimizada (30:70) foram construídos a partir do mesmo compósito fluido e posteriormente submetidos ao mesmo procedimento experimental (obtenção de curvas de calibração por amperometria e soluções contendo concentrações crescentes de peróxido). Conforme apresentado (Figura 22), o baixo DPR calculado ( $\approx 5\%$ ) entre as 5 curvas de calibração obtidas demonstram uma ótima reprodutibilidade inter-eletrodos, o que pode ser atribuído a alta homogeneidade do compósito fluido empregado e ao procedimento de construção dos eletrodos. A

distribuição uniforme das partículas de AP se deve, provavelmente, à agitação magnética utilizada na preparação do compósito fluído.



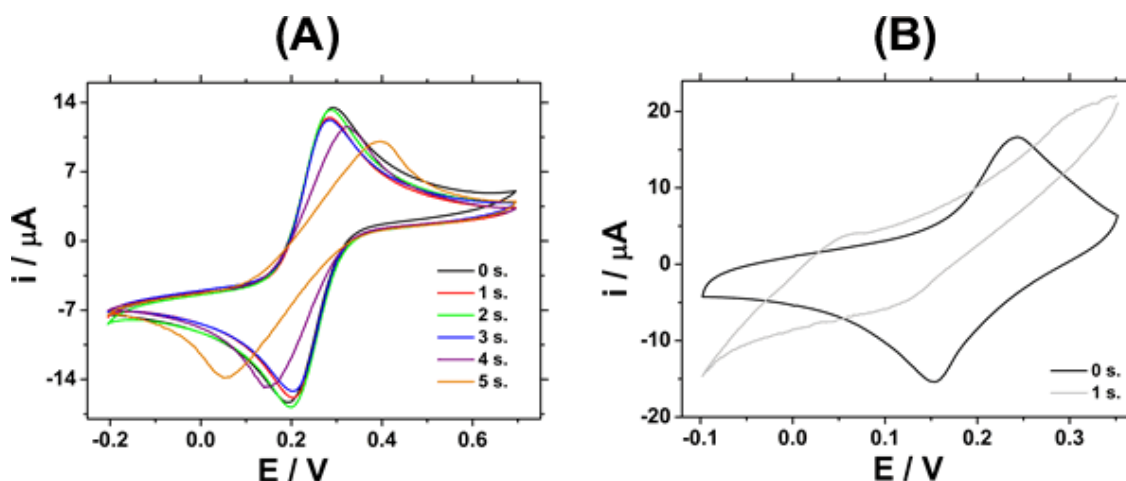
**Figura 22.** Curva de calibração média ( $\pm$ DP) de cinco eletrodos distintos de composição 30:70 (Gr-pAP<sub>2</sub>: Gr). Amperogramas obtidos nas mesmas condições da Figura 15.

#### 3.1.4. Durabilidade do compósito fluído

Uma das vantagens de se empregar compósitos fluidos na construção de eletrodos compósitos rígidos é a possibilidade do armazenamento (estocagem) do material por um longo período, desde que o frasco esteja hermeticamente fechado, para impedir a volatilização do solvente. Então, um estudo foi realizado para verificar a durabilidade dos compósitos fluidos preparados em laboratório. Nesta investigação, preparou-se um compósito fluído e após 24 h de agitação da mistura foi construído um eletrodo compósito em suporte de ponteira (Figura 8a). Posteriormente, este mesmo compósito fluído foi armazenado em frasco fechado e a cada semana seguinte um novo eletrodo foi construído a partir deste material fluído. Este procedimento foi realizado tanto para o compósito fluído não modificado quanto para o modificado com AP). Os voltamogramas obtidos para cada eletrodo estão apresentados na Figura 23.

A partir dos voltamogramas obtidos na Figura 23 conclui-se que o compósito fluído não modificado pode ser estocado por até três semanas, pois os eletrodos construídos neste intervalo de estocagem apresentaram praticamente o mesmo sinal analítico. A partir da terceira semana, os eletrodos passam a ter sinais mais resistentes,

provavelmente devido a uma polimerização entre a resina epóxi e o endurecedor dentro do frasco (“in situ”). No entanto, para o compósito fluído modificado com AP, a estocagem não é indicada, pois o voltamograma obtido com o eletrodo construído com o compósito modificado armazenado por uma semana apresentou picos anômalos ou resistivos, devido à provável decomposição do modificador.



**Figura 23.** Voltamogramas cíclicos obtidos para (A) eletrodo compósito não modificado construído logo após a preparação do compósito fluído (0 s.) e construídos no decorrer de cinco semanas de estocagem (primeira semana: 1s, quinta semana: 5s) na presença de  $K_3Fe(CN)_6$  5 mmol  $L^{-1}$ ; (B) Eletrodo contendo pAP<sub>2</sub> no corpo do eletrodo em meio de eletrólito suporte. Eletrólito: KCl 0,5 mol  $L^{-1}$  (A) e KCl 0,1 mol  $L^{-1}$  (B).

Em outra abordagem, foi realizado um estudo para verificar o tempo de vida útil do eletrodo compósito (compósito fluído após inserção na ponteira, cura e polimento do eletrodo). Neste, foi observado que tanto os eletrodos não modificados e modificados com AP permanecem funcionais por um período superior a seis meses (tempo avaliado), desde que o eletrodo compósito seja utilizado no intervalo da sua faixa de trabalho e não submetidos a condições de fluxo. Especificamente nos compósitos modificados, foi verificado que a atividade catalítica permanece praticamente constante neste período, desde que a renovação da superfície seja efetuada com suave polimento (lixa d’água de granulação 1200 ou 2000) antes das medidas eletroquímicas, pois o compósito atua como um reservatório de AP.

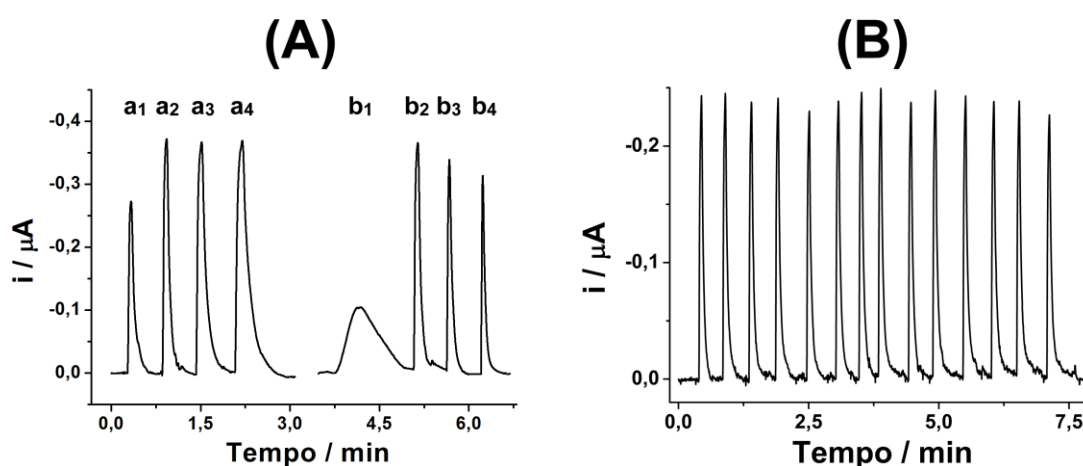


## 3.2. Aplicações dos eletrodos compósitos modificados com azul da Prússia

### 3.2.1. Sensor “3 em 1” adaptado ao sistema FIA

#### 3.2.1.1. Otimizações no sistema FIA

Previamente às determinações de peróxido de hidrogênio em amostras reais, foi necessário otimizar as condições do sistema FIA, para obter as melhores condições de sensibilidade e frequência analítica. A Figura 24 apresenta os picos obtidos quando soluções padrão de peróxido de hidrogênio foram injetadas no sistema FIA em diferentes vazões e volumes. Nestes estudos, o percurso analítico foi de 20 cm ( $\varnothing$  interno = 1,0 mm). Em percursos analíticos maiores ( $\approx$  40 cm), os picos transientes referentes às correntes de redução do peróxido foram pouco intensos e largos, devido aos efeitos de dispersão mais intensos nesta condição (resultados não apresentados).



**Figura 24.** Amperogramas obtidos com o sistema FIA para: (A) injeções de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em função de: (a) volume injetado ( $a_1 = 65$ ;  $a_2 = 100$ ;  $a_3 = 165$ ;  $a_4 = 230 \mu\text{L}$ ); (b) vazão ( $b_1 = 0,4$ ;  $b_2 = 1,0$ ;  $b_3 = 2,0$  e  $b_4 = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ); (B) injeções de padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  (volume injetado:  $100 \mu\text{L}$ ; vazão:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ). Eletrólito:  $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Potencial aplicado:  $-0,1 \text{ V}$  (vs. EPR de composto de prata).

Como pode ser visto na Figura 24A, a injeção de volumes superiores a  $100 \mu\text{L}$  ( $a_2$ ) não gera aumento no sinal amperométrico, somente alargamento do pico e, conseqüentemente, uma menor frequência analítica. Em relação à vazão, observa-se

uma corrente de pico máxima em  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Vazões inferiores fornecem picos pouco intensos e largos, devido a uma maior dispersão da zona da amostra na tubulação do sistema FIA. No entanto, vazões superiores resultam em picos estreitos e menores, que se deve, respectivamente, a uma reduzida dispersão da amostra e a limitação cinética do mediador AP (redução eletrocatalítica do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em menor extensão). Logo, o volume injetado de  $100 \text{ }\mu\text{L}$  a uma vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  fornece a melhor resposta em relação à frequência analítica ( $\approx 100$  injeções por hora) e sensibilidade. Estas condições foram adotadas nos experimentos subsequentes.

Nestas condições, um estudo de repetibilidade do sistema FIA foi realizado mediante injeções sucessivas de solução padrão contendo  $30 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  de peróxido. O amperograma obtido é apresentado na Figura 24B. O DPR calculado neste estudo foi de  $0,83 \%$  ( $n = 14$ ), indicando que o sistema FIA apresenta ótima precisão quando o sensor “3 em 1” é usado na detecção.

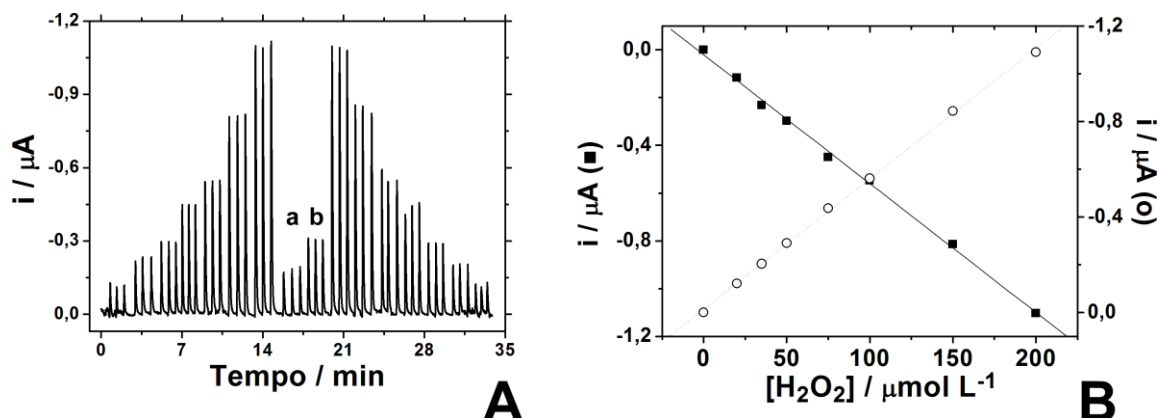
### **3.2.1.2. Determinação de peróxido de hidrogênio em antisséptico bucal**

O desempenho do método FIA empregando o eletrodo de compósito modificado (“3 em 1”) na detecção foi avaliado na quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em amostras de antisséptico bucal. A Figura 25 apresenta o amperograma e as respectivas curvas de calibração obtidas com a injeção de soluções padrões contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  no sentido crescente e decrescente de concentração e duas amostras de antisséptico bucal. Todas as soluções (amostras e padrões) foram previamente diluídas no eletrólito suporte utilizado como solução carregadora do sistema FIA (TPH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Conforme apresentado (Figura 25B), as curvas analíticas obtidas no sentido crescente e decrescente foram lineares no intervalo de concentração avaliado (entre  $10$  e  $200 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Além disto, as duas curvas de calibração apresentaram ótimos coeficientes de correlação ( $R$ ) e valores de sensibilidade (inclinações das curvas) semelhantes (Tabela 4), indicando que o ET de compósito modificado com AP não apresenta efeitos de memória.

Os resultados obtidos na determinação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas duas amostras de antisséptico bucal usando o método proposto (FIA com detecção amperométrica) e o

método padrão (titulação iodométrica) são apresentados na Tabela 5. Segundo o teste t pareado ( $t_{\text{exp}} = 3,28$  vs  $t_{\text{tab}} = 4,30$ ), os resultados obtidos em relação ao teor de peróxido nas amostras entre o método proposto e o método iodométrico apresentaram boa concordância a um nível de confiança de 95% ( $n = 3$ ).



**Figura 25.** (A) Amperograma obtido para injeções ( $n=3$ ) de soluções padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no sentido crescente de concentrações (20, 35, 50, 75, 100, 150 e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), duas amostras de antisséptico bucal (a e b) e destes padrões no sentido decrescente. (B) respectivas curvas de calibração para o sentido crescente (○) e decrescente (■). Eletrólito: TPH 0,05  $\text{mol L}^{-1}$  e KCl 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 7,2); Potencial: - 0,1 V (vs. EPR de composto de prata); Volume injetado: 100  $\mu\text{L}$ ; Vazão: 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ .

**Tabela 4.** Curvas de calibração e figuras de mérito obtidas na detecção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Curva	Equação da reta de calibração	LD*	LQ*	R
Crescente	$I (\mu\text{A}) = - 0,00546 [\text{H}_2\text{O}_2] (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,01345$	0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,999
Decrescente	$I (\mu\text{A}) = - 0,00540 [\text{H}_2\text{O}_2] (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,02017$	0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,999

**Tabela 5.** Comparação dos resultados obtidos pelo método proposto e por titulação iodométrica na determinação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em amostras de antisséptico bucal.

Amostras	Concentração de $\text{H}_2\text{O}_2$ (%)		
	FIA / Amperometria*	Iodometria*	Erro relativo (%)**
a	1,19 ± 0,04	1,12 ± 0,03	6,1
b	1,94 ± 0,05	1,86 ± 0,04	4,1

\* Média de 3 medidas. \*\* Erro relativo =  $100 \times (\text{valor amperométrico} - \text{valor iodométrico}) / \text{valor iodométrico}$ .

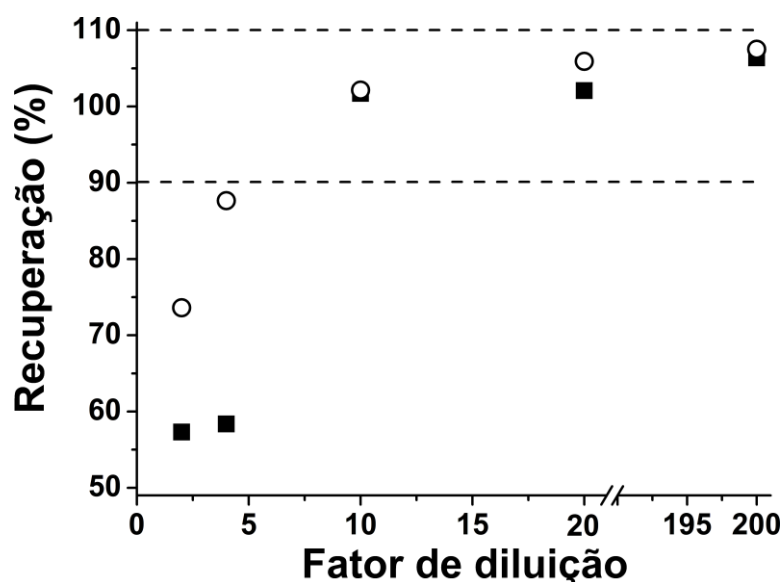
De forma a avaliar a interferência de matriz na determinação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , um estudo de adição e recuperação foi realizado. Neste estudo, as duas amostras de antisséptico bucal foram analisadas antes e após serem fortificadas com três diferentes concentrações de peróxido. Como pode ser observado na Tabela 6, as recuperações ficaram próximas a 100%, evidenciando que não existe uma interferência significativa da matriz da amostra.

**Tabela 6.** Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em amostra de antisséptico bucal empregando o sensor “3 em 1” acoplado ao sistema FIA

Amostras	[ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] adicionado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	[ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] encontrado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
a	0	52,7	--
	50	100,4	97,7
	100	150,1	98,2
	150	194,0	95,7
b	0	83,7	--
	50	138,3	104,0
	100	181,2	98,6
	150	232,8	99,6

### 3.2.1.3. Determinação de peróxido de hidrogênio em leite por FIA

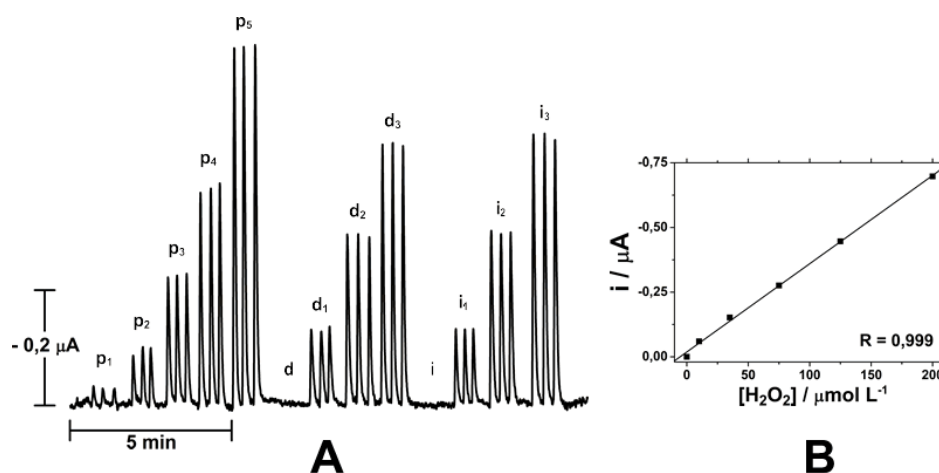
Previamente à determinação de peróxido em leite, foi necessário investigar a diluição de leite no eletrólito suporte (TPH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Este estudo é importante, pois o leite contém altas concentrações de íons potássio e cloreto, que são espécies participantes na compensação de cargas durante a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na superfície de AP [11]. Além disso, esta matriz pode conter alto teor de gorduras e proteínas, acarretando na passivação do ET. Assim, realizou-se um experimento para verificar os sinais das soluções de leite fortificadas com  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em distintas diluições no eletrólito (200, 20, 10, 4 e 2 vezes). Vale ressaltar que em todas as diluições a concentração final do eletrólito suporte foi mantida. Comparando-se as correntes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no eletrólito puro e na presença de leite em distintas diluições, calculou-se as respectivas recuperações. Para ilustrar os resultados deste estudo, um gráfico das recuperações calculadas nas distintas diluições é apresentado na Figura 26.



**Figura 26.** Recuperações calculadas para as amostras de leite desnatado (■) e integral (○) fortificadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  em distintas diluições no eletrólito suporte (TPH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Conforme pode ser observado na Figura 26, o peróxido pode ser determinado com boa exatidão em diluições superiores a dez vezes (recuperação entre 90 e 110 %). Em diluições menores do que esta, as recuperações são menores do que 90 %, pois os sinais no amperograma (não apresentado) são menores do que os esperados. Isto se deve provavelmente a problemas da matriz, como a presença de espécies que contaminem o eletrodo (p. ex. gorduras, proteínas) ou devido à maior quantidade relativa de íons no pacote de amostra (principalmente  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) do que na solução transportadora (TPH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). No entanto, deve ser evitado o uso de diluições muito altas (fatores da ordem de 200 vezes), pois a precisão e a intensidade de corrente diminuem proporcionalmente. Logo, nas medidas posteriores foi adotada a diluição da amostra de dez vezes no eletrólito suporte.

Na Figura 27 são apresentados os amperogramas com injeções de algumas soluções de peróxido e de leite UHT integral e desnatado (puro e fortificado com  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), de forma a quantificar e avaliar a recuperação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o sistema proposto. Como pode ser observado, o peróxido não foi detectado em nenhuma das amostras avaliadas. No entanto, a recuperação do sistema foi bem próxima a 100 %, o que torna o método confiável para quantificar  $\text{H}_2\text{O}_2$  numa amostra que estivesse adulterada.



**Figura 27.** (A) Amperogramas para injeções em triplicata de soluções contendo, respectivamente: padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p<sub>1</sub> a p<sub>5</sub>: 10 a 200 µmol L<sup>-1</sup>), amostras diluídas de leite desnatado (d: sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub> e d<sub>3</sub> com adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações de 50, 100 e 150 µmol L<sup>-1</sup>) e integral (i); (B) curva de calibração. Condições iguais à Figura 25.

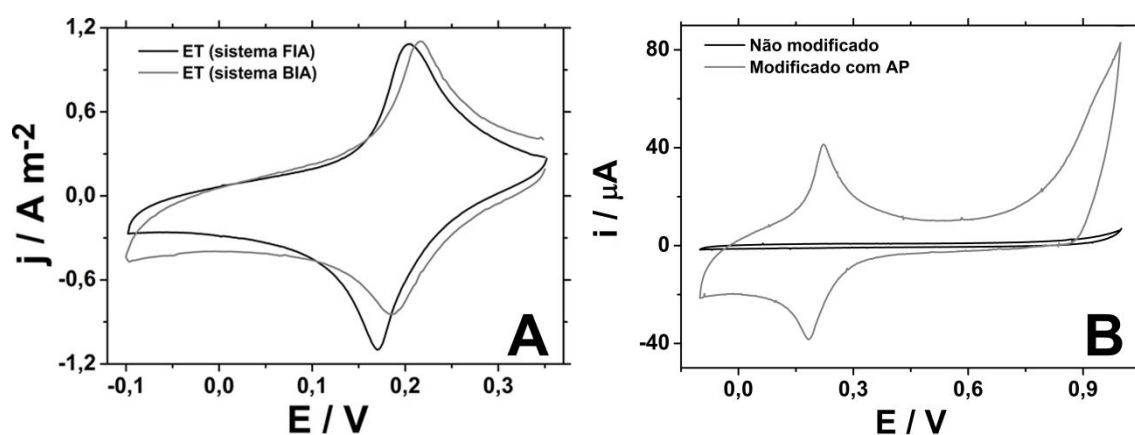
No item 3.1.4 foi concluído que o eletrodo compósito de adesivo epóxi e grafite (modificado ou não com AP) apresenta funcionalidade superior a seis meses sob condições estacionárias. No entanto, em condições de fluxo (sistemas FIA), esta longevidade é drasticamente reduzida para apenas um dia de trabalho. Esta limitação se deve, provavelmente, ao acelerado inchamento do adesivo epóxi (interação entre o polímero e as soluções aquosas). Devido a isto, seria desejável o emprego de um sistema menos agressivo ao eletrodo compósito (tal como um sistema estacionário) e que ao mesmo tempo não perdesse algumas das vantagens dos sistemas FIA (alta frequência analítica, sensibilidade e baixa contaminação do eletrodo). Para alcançar este objetivo, o eletrodo compósito modificado com AP foi adaptado num sistema BIA.

### 3.2.2. Eletrodo compósito modificado em sistema BIA

A proposta de utilizar o ET de compósito em um sistema BIA convencional gerou a necessidade da construção do eletrodo compósito modificado com AP em dimensões maiores, para facilitar sua adaptação na célula BIA. Logo, o material fluido foi imobilizado em um suporte maior (tubo de poliamida, Figura 9). Na Figura 28A são apresentados os voltamogramas cíclicos deste eletrodo e de um eletrodo em suporte

de ponteira de micro-pipeta (usado no sistema FIA), ambos construídos a partir de um compósito fluído contendo 10 % de grafite modificado com AP pelo procedimento 2 (10 % de Gr-pAP<sub>2</sub>). Já na Figura 28B são apresentados os voltamogramas do eletrodo modificado com AP (10 % Gr-pAP<sub>2</sub>) e de um não modificado (100 % de Gr).

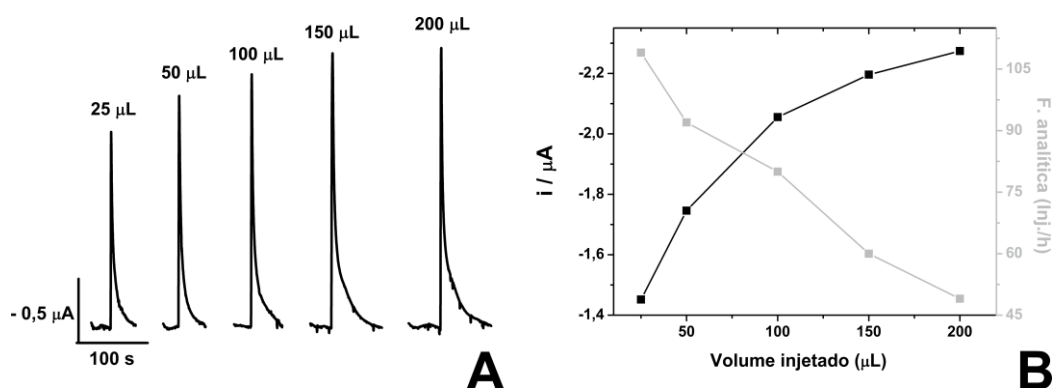
Conforme apresentado na Figura 28A, as densidades de corrente dos voltamogramas obtidos com o eletrodo contendo AP usado em BIA ( $\varnothing = 7,2$  mm) e em FIA ( $\varnothing = 1,6$  mm) são semelhantes, visto que os dois eletrodos foram construídos a partir do mesmo compósito fluído (contendo 10 % de Gr-pAP<sub>2</sub>). Nos voltamogramas da Figura 28B são observadas as mesmas evidências que identificam o AP no compósito, como a presença dos picos redox e aumento da corrente de fundo, conforme discutido na seção 3.1.1. No entanto, nestes voltamogramas cíclicos, registrados numa faixa de potencial maior (-0,1 V a +1,0 V), não foi possível observar o segundo par redox do FeHCF (AP/AmP  $\approx$  +0,9 V, Figura 5). Provavelmente, isto se deve à degradação (oxidação) do adesivo epóxi em potenciais mais positivos que +0,7 V (Figura 28B).



**Figura 28.** Voltamogramas cíclicos comparativos entre: (A) ET modificado com AP utilizado no sistema FIA ( $\varnothing_i = 1,6$  mm;  $A = 0,0201$  cm<sup>2</sup>) e ET modificado com AP usado no sistema BIA ( $\varnothing_i = 7,2$  mm;  $A = 0,4072$  cm<sup>2</sup>); (B) ET compósito (usado em BIA) puro e modificado com AP. Velocidade de varredura: 20 mV s<sup>-1</sup>. Eletrólito: KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Posteriormente, este eletrodo compósito modificado com pAP<sub>2</sub> foi usado nos experimentos empregando o sistema BIA com detecção amperométrica através de injeções de soluções contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O primeiro passo consistiu na avaliação das características do sistema em função do volume injetado de solução. Neste estudo,

distintos volumes de uma solução padrão de peróxido foram injetados na célula BIA em velocidade constante. Os picos obtidos neste estudo e um gráfico apresentando as relações obtidas entre as correntes de pico, frequência analítica e volume injetado são apresentados na Figura 29A e 29B, respectivamente. Conforme apresentado, as correntes obtidas são dependentes do volume injetado, devido à quantidade de moléculas do analito que entram em contato com a superfície do ET. No entanto, a frequência analítica é menor quando o volume injetado é maior, devido ao maior tempo de contato da solução injetada com o eletrodo. De acordo com a Figura 29, nota-se que um volume injetado de 100  $\mu\text{L}$  é possível combinar razoável sensibilidade com frequência analítica adequada (em torno de 80 injeções por hora). Portanto, este volume foi adotado nos experimentos posteriores.

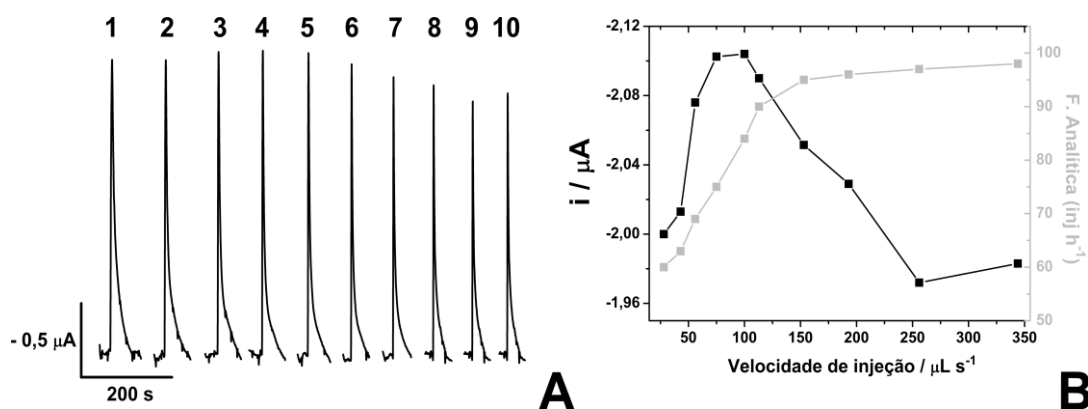


**Figura 29.** (A) Perfil dos picos obtidos para injeções de soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  no sistema BIA em função de distintos volumes injetados (25, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{L}$ ); (B) Dependência da corrente de pico e da frequência analítica em função do volume injetado. Velocidade de dispensa: 156  $\mu\text{L s}^{-1}$ ; Distância eletrodo-ponteira: 2 mm. Potencial aplicado: 0,0 V (vs  $\text{Ag}/\text{AgCl}/_{\text{KCl sat.}}$ ); Eletrólito:  $\text{KCl}$  0,1  $\text{mol L}^{-1}$ .

A micropipeta eletrônica empregada no sistema BIA (Eppendorf® Multipipette Stream) na injeção das amostras oferece dez velocidades de injeção diferentes (níveis 1 até 10). Experimentalmente, foi calculado que estes níveis correspondem, respectivamente, às seguintes velocidades de injeção:  $v_1 = 28$ ;  $v_2 = 43$ ;  $v_3 = 56$ ;  $v_4 = 75$ ;  $v_5 = 100$ ;  $v_6 = 113$ ;  $v_7 = 156$ ;  $v_8 = 193$ ;  $v_9 = 256$  e  $v_{10} = 344$   $\mu\text{L s}^{-1}$ . Então, para investigar as características do sistema em função da velocidade de injeção, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$



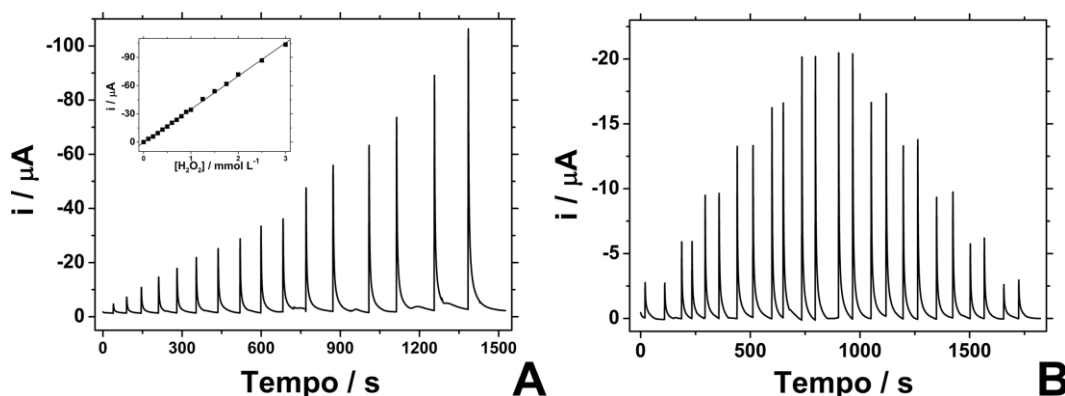
de uma solução de peróxido  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram inseridas na célula BIA nas dez velocidades de injeção disponíveis. O amperograma obtido para estas injeções e a dependência da velocidade de injeção com a frequência analítica são mostrados nas Figuras 30A e 30B, respectivamente. Conforme observado, as correntes de pico correspondentes às velocidades de injeção de  $75$  e  $100 \mu\text{L s}^{-1}$  são um pouco mais intensas do que em outras velocidades. No entanto, as maiores frequências analíticas são obtidas acima de  $100,0 \mu\text{L s}^{-1}$ , pois os picos correspondentes são mais estreitos (Figura 30A). Logo, esta velocidade ( $100,0 \mu\text{L s}^{-1}$ ) foi adotada nos experimentos posteriores, pois nesta condição é possível associar simultaneamente maiores correntes de redução e frequência analítica.



**Figura 30.** (A) Perfil dos picos amperométricos obtidos com injeções de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  em diferentes velocidades de injeção (1 até 10: 28 a  $344 \mu\text{L s}^{-1}$ ); (B) Dependência da corrente de pico e frequência analítica em função das velocidades de injeção. Volume injetado:  $100 \mu\text{L}$ . Demais condições idem à Figura 29.

Posteriormente, foram realizadas injeções de soluções contendo concentrações crescentes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o objetivo de avaliar a faixa linear de resposta (corrente *versus* concentração) empregando o sistema BIA (Figura 31A). A partir deste experimento foi obtida uma curva de calibração linear em um amplo intervalo de concentração ( $0,1$  até  $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e com a seguinte equação de reta:  $i(\mu\text{A}) = -35,20 [\text{H}_2\text{O}_2] (\text{mmol L}^{-1}) + 0,38$  ( $R = 0,994$ ). Além disso, este ET não apresentou efeitos de memória, visto que as inclinações das duas curvas de calibração são semelhantes (injeção de soluções contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  em ordem crescente e decrescente de concentração), conforme pode

ser observado na Figura 31B e nas equações:  $i(\mu\text{A}) = -34,12 [\text{H}_2\text{O}_2] (\text{mmol L}^{-1}) + 0,49$  ( $R = 0,999$ ) (Curva de ida);  $i(\mu\text{A}) = -34,72 [\text{H}_2\text{O}_2] (\text{mmol L}^{-1}) + 0,52$  ( $R = 0,999$ ) (Volta).

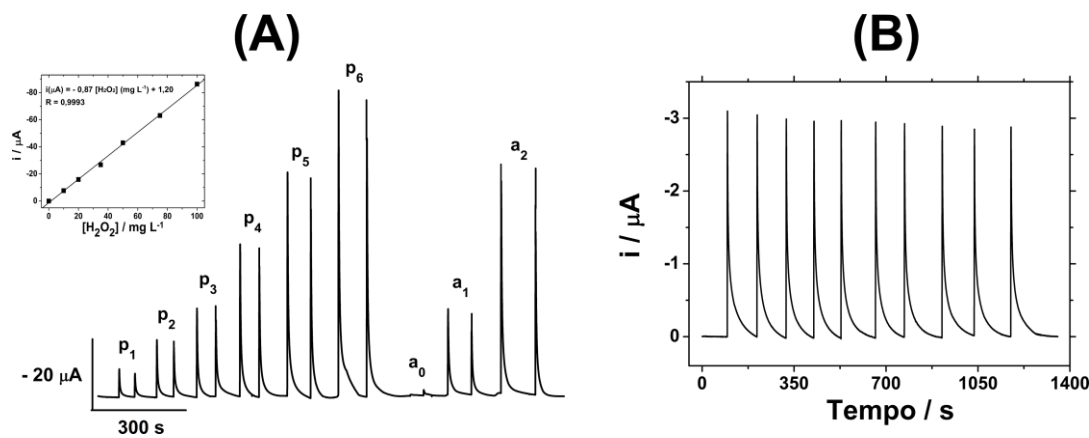


**Figura 31.** Amperogramas obtidos para: (A) injeções de soluções padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 – 3,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e (B) injeções de soluções padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 - 0,6  $\text{mmol L}^{-1}$ ) no sentido crescente e decrescente de concentrações. Velocidade de injeção:  $100 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Volume injetado:  $100 \mu\text{L}$ . TPH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,2).

Finalmente, os estudos de determinação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no leite foram realizados. Na Figura 32 é apresentado o amperograma obtido para injeções de soluções padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de soluções de uma amostra de leite pura e de leite fortificado com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , para quantificar o peróxido no leite e avaliar a recuperação do sistema. Neste caso, as amostras de leite foram previamente diluídas no eletrólito suporte de tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  antes das injeções (mesma condição do sensor “3 em 1” / FIA). Cada amostra de leite foi fortificada na concentração de 300 e  $800 \text{ mg L}^{-1}$ , que são as quantidades normalmente utilizadas em adulterações desta finalidade (função antibacteriana), segundo informações da ANVISA [140]. As recuperações calculadas para  $\text{H}_2\text{O}_2$  em três amostras de leite UHT desnatado e três de leite UHT integral são apresentadas na Tabela 7. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. No entanto, se houvesse adulteração do leite com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o sistema proposto poderia ser empregado com sucesso, visto que as recuperações calculadas na maioria das amostras foram próximas a 100 %.

Quando são consideradas injeções de várias amostras, o sistema também apresentou uma boa estabilidade. As correntes de pico obtidas para dez injeções de

soluções de leite integral (diluído 10 vezes) fortificado com 3,0 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou DPRs de 0,85 % (Figura 32B). Além disto, os sinais não diminuíram durante as injeções, indicando não haver contaminação significativa da superfície do ET.



**Figura 32.** Amperogramas obtidos para (A) injeções em duplicata dos padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p<sub>1</sub> – p<sub>6</sub>: 10 - 100 mg L<sup>-1</sup> ou 0,294 a 2,94 mmol L<sup>-1</sup>), amostra de leite não dopada (a<sub>0</sub>) e dopada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a<sub>1</sub>: 300 mg L<sup>-1</sup> e a<sub>2</sub>: 800 mg L<sup>-1</sup>) e (B) dez injeções de solução de leite dopado com 3,0 mg L<sup>-1</sup>. Fator de diluição = 10. Condições iguais à Figura 31.

**Tabela 7.** Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em leite empregando o método BIA / amperométrico.

Amostra	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] ad. (mg L <sup>-1</sup> )	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] det. (mg L <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	Amostra	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] ad. (mg L <sup>-1</sup> )	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] det. (mg L <sup>-1</sup> )	Rec. (%)
1 <sup>a</sup>	0	0	--	4 <sup>b</sup>	0	0	0
1 <sup>a</sup>	300,0	286,7	95,9	4 <sup>b</sup>	300,0	322,3	107,4
1 <sup>a</sup>	800,0	702,4	87,8	4 <sup>b</sup>	800,0	821,3	102,7
2 <sup>a</sup>	0	0	0	5 <sup>b</sup>	0	0	0
2 <sup>a</sup>	300,0	274,4	91,5	5 <sup>b</sup>	300,0	273,0	91,0
2 <sup>a</sup>	800,0	714,3	89,3	5 <sup>b</sup>	800,0	688,8	86,1
3 <sup>a</sup>	0	0	0	6 <sup>b</sup>	0	0	0
3 <sup>a</sup>	300,0	302,3	100,8	6 <sup>b</sup>	300,0	249,1	83,0
3 <sup>a</sup>	800,0	785	98,1	6 <sup>b</sup>	800,0	696,0	87,0

<sup>a</sup> amostras de leite UHT desnatado; <sup>b</sup> amostras de leite UHT integral;  
[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] ad.: concentração adicionada; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] det.: concentração determinada. Rec. (%): Recuperação.

Por último, é importante considerar algumas vantagens do uso do eletrodo compósito de maior diâmetro (BIA) em relação ao sensor “3 em 1” (FIA):

➤ Elevada estabilidade (robustez): após várias medidas amperométricas de peróxido (acima de 500 injeções), o ET permaneceu praticamente com a mesma

atividade catalítica, devido à manutenção das correntes de pico obtidas no decorrer das injeções de peróxido (queda de corrente menor que 30 %). Além disto, os voltamogramas cíclicos obtidos antes e após as medidas foram semelhantes, indicando a manutenção da integridade do ET (sem o inchamento do polímero). Devido a isto, o mesmo ET compósito modificado com AP foi usado em todos os estudos e análises realizados com o sistema BIA proposto.

- Sensibilidade: Devido ao maior diâmetro do eletrodo compósito usado ( $\varnothing = 7,2$  mm), a sensibilidade foi oito vezes maior do que a do sensor “3 em 1”. As equações obtidas foram:  $i(\mu A) = -0,81 [H_2O_2](mg\ L^{-1}) + 2,68$  e  $i(\mu A) = -0,10 [H_2O_2](mg\ L^{-1}) - 0,03$ .
- Sistema portátil: A célula BIA e os seus componentes podem ser facilmente transportados e utilizados fora do laboratório. Deste modo, este sistema pode ser empregado para análises em campo de maneira mais viável do que um sistema FIA.

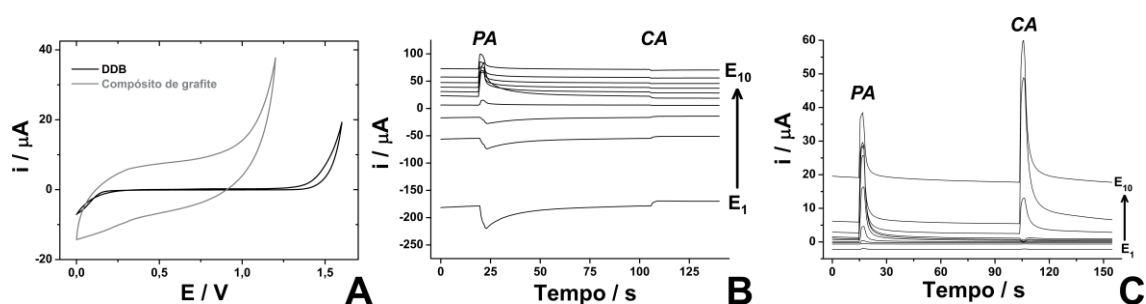
### **3.3. Aplicações do eletrodo de BDD adaptado ao sistema BIA**

#### **3.3.1. Determinações simultâneas com detecção por MPA**

O histórico de determinações simultâneas com detecção por MPA empregando somente um eletrodo de trabalho em sistemas FIA é recente, com o primeiro trabalho publicado em 2001 [125], no qual foi descrito a determinação simultânea de glicose e frutose. Posteriormente, determinações simultâneas de outros analitos em variadas formulações farmacêuticas empregando o sistema FIA-MPA foram propostas pelo nosso grupo de pesquisa [126, 127, 172]. No entanto, estas determinações no sistema BIA com detecção por MPA (BIA-MPA) não haviam sido propostas até o momento. Os primeiros estudos com este enfoque foram realizados com princípios ativos presentes em uma mesma formulação farmacêutica disponível no mercado (compostos modelo): paracetamol (PA) e cafeína (CA).

Para tal estudo, um eletrodo compósito não modificado foi inicialmente avaliado como ET. A Figura 33B apresenta os amperogramas obtidos para injeções de soluções contendo PA ou CA (ambas  $250\ \mu mol\ L^{-1}$ ) no sistema BIA-MPA (aplicação de 10 pulsos de potencial em função do tempo) com este eletrodo em meio de tampão

acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 4,7$ ) [129]. Conforme observado, o PA é oxidado na superfície do eletrodo compósito em potenciais acima de  $+1,0 \text{ V}$  e o respectivo produto de oxidação é reduzido em pulsos de potencial menores que  $+1,0 \text{ V}$ . Já a CA não é eletroativa nestas condições, devido, provavelmente, às elevadas correntes de fundo ( $E_1 \approx -180 \mu\text{A}$  e  $E_{10} \approx 70 \mu\text{A}$ ), consequência de uma menor janela de potencial do ET de compósito (Figura 33A). Então, este experimento foi repetido empregando BDD como ET. Conforme apresentado na Figura 33C, tanto o PA (a partir de  $+1,0 \text{ V}$ ) quanto a CA (a partir de  $+1,4 \text{ V}$ ) apresentaram elevadas correntes de oxidação na superfície do BDD, além de apresentarem reduzidas correntes de fundo ( $E_1 \approx -2 \mu\text{A}$  e  $E_{10} \approx 18 \mu\text{A}$ ) quando comparadas aos do ET compósito. De fato, as correntes de fundo do BDD são menores devido a ampla janela de potencial e às baixas correntes capacitivas (menor resistência ôhmica) apresentadas por este eletrodo (Figura 33A). Devido a estas características, o BDD foi utilizado como ET nos estudos de determinação simultânea no sistema BIA-MPA. Nas próximas seções serão apresentados os resultados e discussões acerca dos conjuntos de analitos avaliados nesta tese: PA/CA, DI/CA e TBHQ/BHA/BHT.

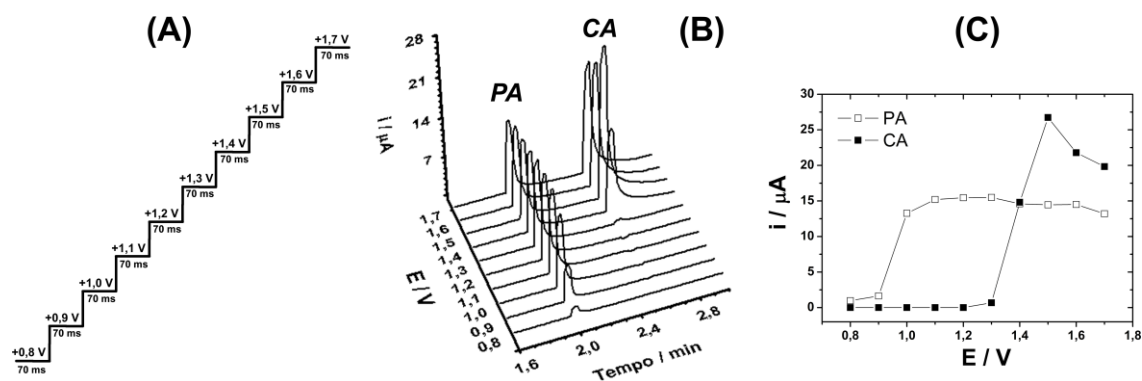


**Figura 33.** Voltamogramas obtidos em meio de TAC  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o eletrodo compósito e BDD (A); Amperogramas para injeções de solução de PA ou CA (ambos  $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) no sistema BIA com o eletrodo compósito (B) ou BDD (C). Condições (B e C):  $E_1 = +0,7 \text{ V}$  e  $E_{10} = +1,6 \text{ V}$  (pulsos aplicados em intervalos de  $0,1 \text{ V}$  de forma contínua e cíclica);  $t_{\text{pulso}}: 70 \text{ ms}$  cada.  $\text{Vol.}_{\text{injetado}}: 300 \mu\text{L}$ ;  $\text{Vel.}_{\text{injeção}}: 75 \mu\text{L s}^{-1}$ .

### 3.3.1.1. Paracetamol (PA) e Cafeína (PA)

O primeiro estudo realizado para determinação simultânea de PA e CA foi direcionado para a investigação do comportamento eletroquímico destes analitos no

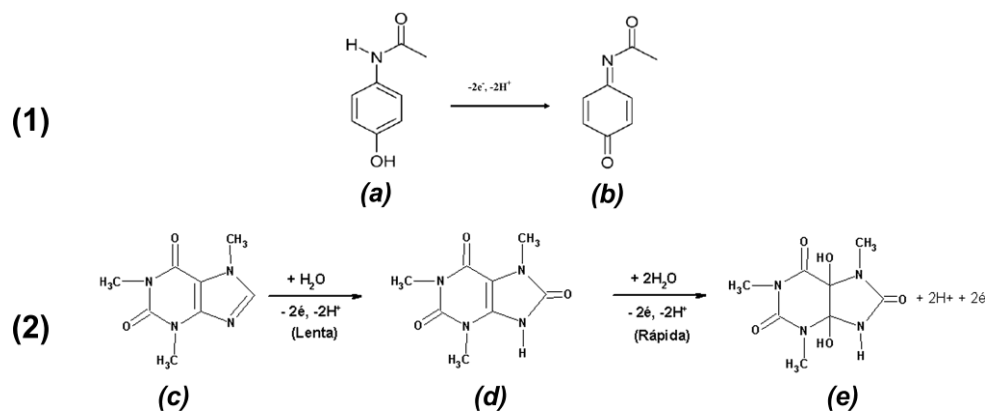
eletrodo de BDD (Fig. 10) em meio de TAC  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 4,7$ ) usando o sistema BIA semelhante ao apresentado na Fig. 11. Então, dez pulsos de potencial foram aplicados sequencial e ciclicamente em função do tempo (Fig. 34A) no eletrodo de trabalho (BDD), enquanto soluções de PA ou CA  $25 \text{ mg L}^{-1}$  foram injetadas no sistema BIA (célula do tipo “wall Jet”). Dessa forma, em uma única injeção foi possível obter dez amperogramas “simultaneamente”, um para cada pulso de potencial aplicado (Figura 34B). A partir dos picos transientes registrados em cada amperograma, foram plotados os voltamogramas hidrodinâmicos de cada analito (Figura 34C). Como observado neste gráfico, os dois analitos são oxidados na superfície do ET. No entanto, o PA é oxidado na superfície do BDD a partir de  $+0,8 \text{ V}$ , atingindo a corrente limite próximo a  $+1,1 \text{ V}$ . Já a CA somente é oxidada em potenciais maiores que  $+1,3 \text{ V}$ , atingindo um máximo de corrente em  $+1,5 \text{ V}$ . Estes resultados são semelhantes aos obtidos em outros dois trabalhos de determinação simultânea destes analitos [116, 129].



**Figura 34.** (A) Esquema da sequência de pulsos de potencial aplicados no ET de BDD (forma cíclica) no estudo do comportamento eletroquímico de PA e CA empregando um sistema BIA; (B) Amperogramas obtidos em função da injeção de solução contendo PA ou CA  $25 \text{ mg L}^{-1}$ ; (C) respectivos voltamogramas hidrodinâmicos. Eletrólito: TAC  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH} 4,7$ ); Volume injetado:  $150 \text{ }\mu\text{L}$ ; Velocidade de injeção:  $56 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ ;  $t_{\text{pulso}}$ :  $70 \text{ ms}$ .

Na literatura foram encontrados os esquemas da eletro-oxidação de PA e CA na superfície de eletrodos de carbono. Segundo Miner *et al.* [173], a oxidação do paracetamol (Fig. 35a) envolve a perda de dois prótons ( $\text{H}^+$ ) e dois elétrons, formando como produto o N-acetil-p-benzoquinonaimina (Figura 35b). Hansen *et al.* [174] propuseram que o mecanismo de eletro-oxidação da cafeína envolve a perda de

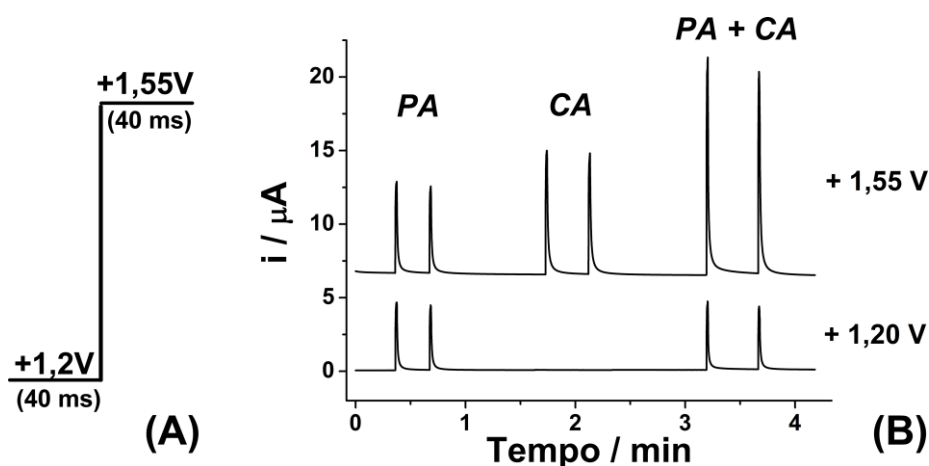
quatro elétrons e quatro prótons. Na primeira etapa, a molécula de cafeína (Fig. 35c) perde dois elétrons e dois prótons  $H^+$  lentamente, formando um ácido úrico substituído com 3 grupos metil (Figura 35d). Em seguida, este composto perde mais dois prótons e dois elétrons originando um análogo 4,5 diol do ácido úrico (Figura 35e), que rapidamente se fragmenta.



**Figura 35.** Esquemas das reações de oxidação do PA [173] (1) e de CA [174] (2). (a) PA ou acetaminofeno; (b) N-acetil-p-benzoquinonaimina; (c) Cafeína; (d) Ácido úrico substituído com três grupos metil; (e) análogo 4,5-diol do ácido úrico substituído.

Baseado nos voltamogramas hidrodinâmicos (Figura 34C), a aplicação de pulsos de potencial entre + 0,9 V e + 1,2 V promovem a detecção de PA sem a interferência da CA e aplicando-se pulsos maiores do que + 1,3 V ao ET, ambos os analitos serão oxidados (PA e CA). No entanto, nesta tese propusemos a determinação simultânea de PA e CA utilizando o sistema BIA-MPA. Na detecção por MPA é possível aplicar de 2 (dois) a 10 (dez) pulsos de potencial (em função do tempo) com o monitoramento da corrente em cada um destes pulsos separadamente, o que permite a obtenção de até 10 amperogramas (programa GPES da Autolab – Metrohm, versão 4.9). Logo, o PA pode ser detectado seletivamente em potenciais no intervalo entre + 0,9 V e + 1,2 V, enquanto que PA e CA podem ser detectados simultaneamente em potenciais mais positivos do que + 1,5 V. A corrente relativa à oxidação da CA pode ser encontrada a partir da subtração das correntes detectadas nos dois pulsos de potencial.

A Figura 36B apresenta os amperogramas obtidos nos pulsos de + 1,2 V e + 1,55 V para injeções em duplicata de três distintas soluções teste, contendo: (1) somente PA 25,0 mg L<sup>-1</sup>, (2) somente CA 25,0 mg L<sup>-1</sup> e (3) PA e CA 25,0 mg L<sup>-1</sup> cada.



**Figura 36.** (A) Sequência de pulsos de potencial aplicados no ET ("wave form"); (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos após injeções (em duplicata) de soluções contendo PA 25 mg L<sup>-1</sup> ou CA 25 mg L<sup>-1</sup> e mistura de PA e CA na mesma concentração. Eletrólito: TAC 0,1 mol L<sup>-1</sup>; velocidade de injeção: 156 μL s<sup>-1</sup>; volume injetado: 100 μL.

Como pode ser observado, somente PA é oxidado em + 1,2 V, pois a corrente média observada nas injeções de PA ou PA + CA no pulso de + 1,2 V é praticamente a mesma (4,51 e 4,52 μA, respectivamente), além de não existir uma corrente detectável em + 1,2 V na injeção de solução contendo somente CA. No entanto, a corrente total observada no potencial de + 1,55 V para as injeções da solução mista de PA e CA (14,26 μA) corresponde à soma das correntes adquiridas na injeção de cada composto individualmente (6,08 μA para PA e 8,20 μA para CA). É importante ressaltar que a corrente de oxidação da solução contendo somente PA (Figura 36B) não é exatamente igual nos dois pulsos de potencial aplicados. A corrente de oxidação no pulso + 1,55 V (6,08 μA) é maior do que a corrente detectada em + 1,2 V (4,51 μA). Então, uma simples subtração das correntes detectadas nos dois pulsos de potencial ( $i_{+1,55\text{ V}} - i_{+1,2\text{ V}}$ ) não fornece a corrente relativa à oxidação da CA. No entanto, este problema pode ser contornado através do uso de um fator de correção (FC), que é obtido pelo cálculo da razão da corrente de PA obtida em + 1,55 V pela corrente de PA em + 1,2 V mediante a injeção de solução contendo somente PA. Assim, o sinal relativo a CA pode ser obtido pela subtração das correntes em +1,55 V pela corrente de PA em + 1,20 V (corrente de PA em + 1,20 V ajustado pelo FC). As equações 6 e 7 são usadas no cálculo das correntes de CA e no cálculo do fator de correção, respectivamente.



$$i_{CA} = i_{+I,55V} - (i_{+I,20V} \cdot FC) \quad (6)$$

$$FC = i_{PA+1,55V} / i_{PA+1,20V} \quad (7)$$

Logo, adquirindo-se dois amperogramas em pulsos de potencial adequados e recorrendo a simples ferramentas matemáticas (equações de primeiro grau) é possível discriminar as correntes de dois analitos presentes numa mesma solução, o que é indispensável em determinações simultâneas realizadas por BIA-MPA.

### 3.3.1.1.1. Otimizações no sistema BIA-MPA

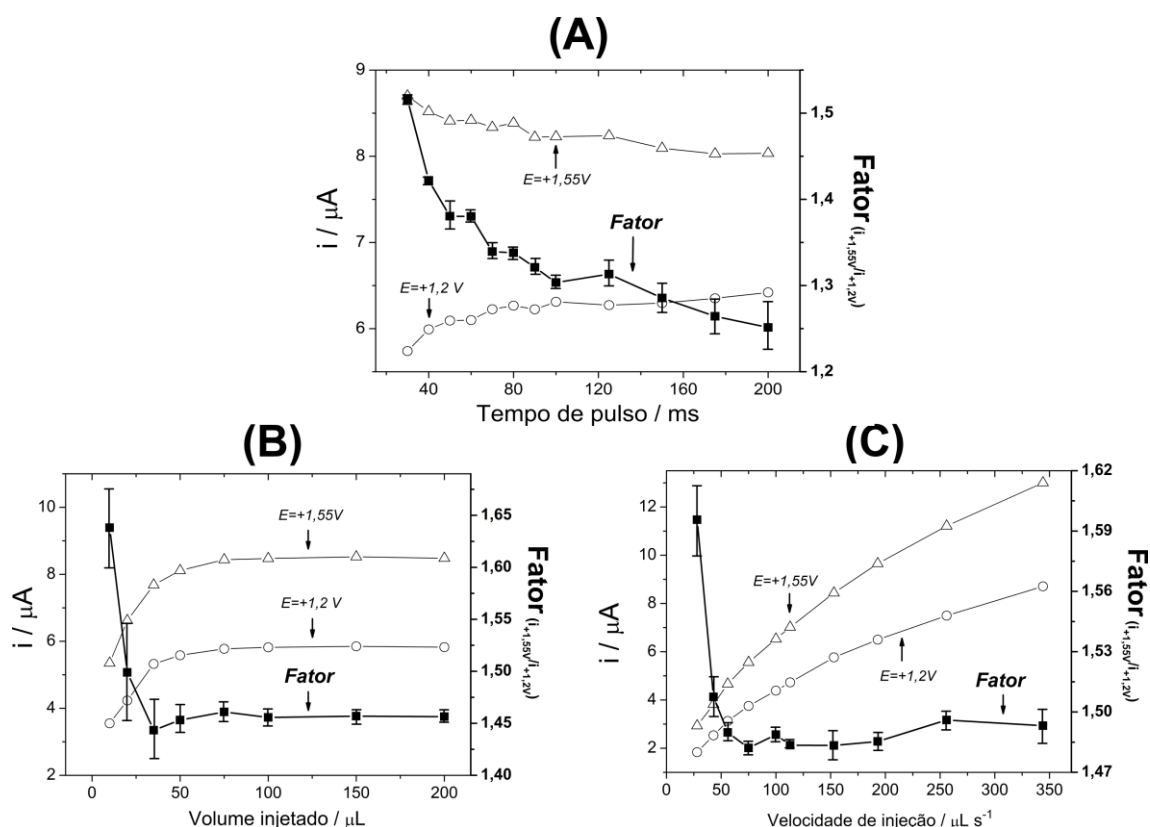
De forma a obter adequado desempenho (maior sensibilidade, frequência analítica e reprodutibilidade), é importante otimizar as condições do sistema BIA-MPA. Primeiramente, injeções de soluções de PA 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram realizadas no sistema BIA com ponteira da micropipeta a diferentes distâncias da superfície do ET (2, 3, 4 e 5 mm). Foi observado que o aumento da distância causou uma diminuição gradual da corrente e da reprodutibilidade do sistema, devido, provavelmente, ao aumento da dispersão da zona de amostra [2, 32]. Além disto, em distâncias menores que 2 mm existe um decaimento do sinal, devido a efeitos de retorno da amostra injetada [30, 32]. Logo, todas as medidas seguintes foram realizadas com uma distância entre a ponteira da pipeta eletrônica e o ET de aproximadamente 2 mm.

Posteriormente, foram estudadas as variações na corrente de oxidação de PA e o fator de correção (FC) em função do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais, volume e velocidade de injeção no sistema BIA-MPA. A Figura 37A apresenta os resultados obtidos em função da variação no tempo de aplicação dos pulsos de potencial aplicados ao ET.

A corrente detectada em uma medida amperométrica é a soma da corrente capacitiva,  $I_c$  (originada na dupla camada elétrica quando um pulso de potencial é aplicado) e da corrente faradaica,  $I_f$  (devido ao processo de transferência de carga no eletrodo). Entretanto, em medidas de análise por injeção em fluxo (FIA) ou em batelada (BIA) com detecção amperométrica pulsada, a  $I_c$  é monitorada constantemente durante a aplicação dos pulsos de potencial, e a  $I_f$  é observada

somente no momento da passagem da alíquota de solução que contém a espécie eletroativa na superfície do eletrodo. Uma condição que deve ser observada é a concentração do eletrólito suporte, a qual deve ser relativamente constante em todas as soluções (padrões e amostras) e pelo menos 50 vezes superior a concentração do analito. Conforme apresentado (Figura 37A), com o aumento nos tempos de aplicação dos pulsos de potenciais, as  $i_F$  de oxidação em +1,2 V e +1,55 V se mantiveram relativamente constantes. Segundo a literatura [27], este fenômeno ocorre quando a reposição da espécie eletroativa na superfície do eletrodo é suficientemente rápida ( $156 \mu\text{L s}^{-1}$  ou  $9,4 \text{ mL min}^{-1}$ ) para evitar a polarização por concentração. Apesar da pequena variação na corrente detectada em ambos os pulsos de potenciais, o FC apresentou uma variação um pouco maior (de 1,5 a 1,25), pois a corrente em + 1,20 V apresentou pequeno aumento e a corrente em + 1,55 V, pequeno decréscimo em função do aumento no tempo de aplicação dos pulsos de potencial. As variações observadas neste estudo (corrente e fator) são evitadas mantendo-se os tempos de aplicação dos pulsos de potenciais constantes durante uma análise. Além disto, as variações (FC) do fator foram maiores nos tempos de pulso mais elevados.

Na Figura 37B e 37C são apresentados os resultados obtidos no sistema BIA (corrente de oxidação e FC) em função do volume e velocidade de injeção, respectivamente. Conforme a Figura 37B, a corrente de oxidação do PA aumenta em ambos os pulsos de potencial (+1,2V e +1,55V) até um volume injetado de  $75 \mu\text{L}$ . No entanto, em volumes injetados maiores que  $75 \mu\text{L}$ , as correntes nos dois pulsos de potencial se tornam relativamente constantes (logo o fator também atinge um valor constante). Então, empregando volumes de injeção acima de  $75 \mu\text{L}$ , o sistema atinge o patamar de corrente ( $i_{\text{MAX}}$ ) que corresponde à corrente limite ( $i_L$ ) observada em sistemas hidrodinâmicos. Ainda na Figura 37B é possível notar melhora na reprodutibilidade (diminuição dos DPs) quando aumenta-se o volume injetado, devido ao aumento do número pontos de corrente adquiridos em  $i_{\text{MAX}}$ . No entanto, num volume injetado alto a frequência analítica do sistema torna-se menor, devido ao aumento do período de injeção e consequente alargamento do pico. Logo, num volume injetado de  $100 \mu\text{L}$  é possível combinar sensibilidade, reprodutibilidade e frequência analítica.

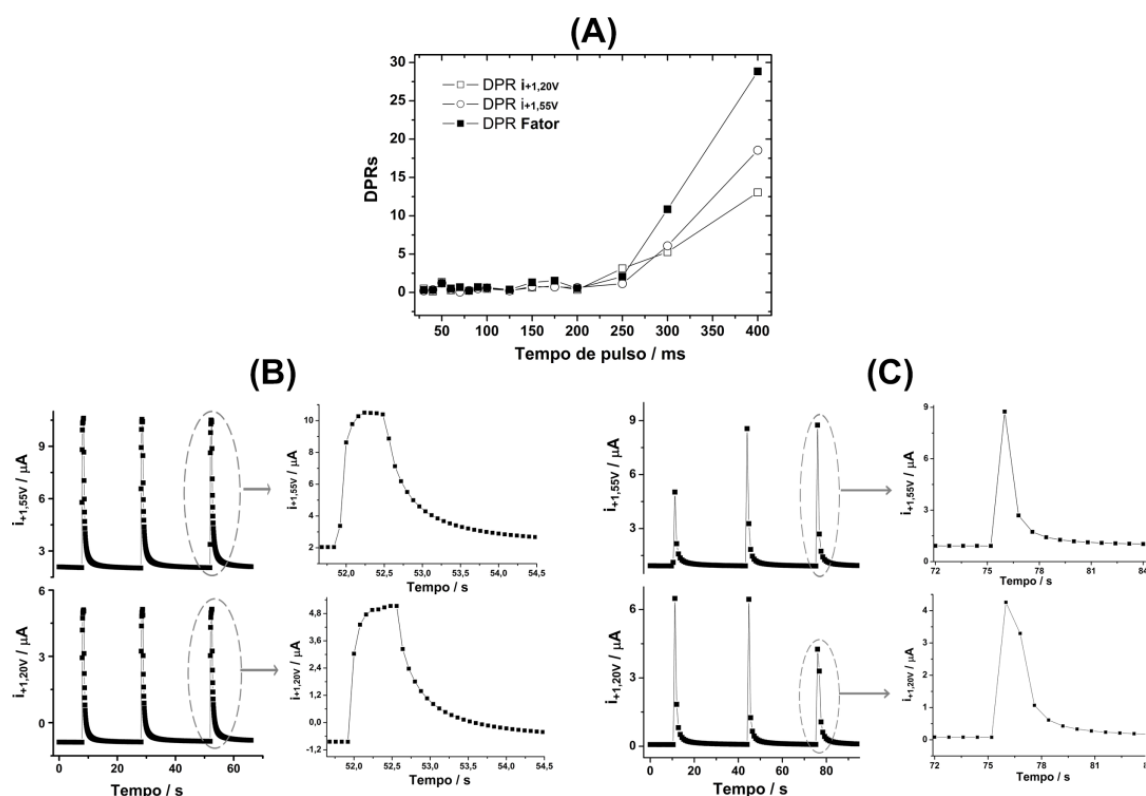


**Figura 37.** Sinais de corrente médios ( $n=3$ ) para injeções de solução de PA  $50 \mu mol L^{-1}$  e dos respectivos fatores ( $i_{E2}/i_{E1}$ ) com DPs em função de: (A) tempo de aplicação dos pulsos de potencial; (B) volume injetado e (C) velocidade de injeção. Condições: Volume injetado:  $100 \mu L$  (A e C); Velocidade de injeção:  $156 \mu L s^{-1}$  (A e B); Pulsos:  $E_1 = +1,2V$  e  $E_2 = +1,55 V$  (A, B e C);  $T_{pulso}$ :  $40 ms$  (B e C). Eletrólito: TAC  $0,1 mol L^{-1}$ .

Na Figura 37C é possível observar um aumento nas correntes de oxidação do PA monitoradas nos dois pulsos de potencial ( $+1,2V$  e  $+1,55V$ ) com o incremento na velocidade de injeção. Este resultado pode ser explicado pelo aumento da taxa de transporte de massa por unidade de tempo da solução para a superfície do eletrodo de trabalho. Como consequência, diminui-se a espessura da camada de difusão (estagnada) de Nernst e um maior sinal amperométrico é detectado [175]. Este sinal deveria alcançar um valor máximo constante ( $i_{+1,2V}$  e  $i_{+1,55V}$ ). No entanto tal fato não foi observado, provavelmente, devido à elevada área do eletrodo de trabalho ( $22,9 mm^2$ ). No entanto, a reprodutibilidade do sistema é levemente reduzida quando foram empregadas as duas maiores velocidades de injeção ( $256$  e  $344 \mu L s^{-1}$ ). Por exemplo, o DPR das correntes de oxidação de PA ( $n = 3$  injeções) foi de  $0,3 \%$  a  $56 \mu L s^{-1}$  e de  $0,8 \%$

a  $344 \mu\text{L s}^{-1}$ . Como as correntes nos dois pulsos de potencial ( $i_{+1,20\text{V}}$  e  $i_{+1,55\text{V}}$ ) aumentaram proporcionalmente (de 56 a  $344 \mu\text{L s}^{-1}$ ), o fator de correção manteve um valor praticamente constante de  $1,485 (\pm 0,004)$  neste intervalo de velocidade ( $1,485 \pm 0,004$ ). A velocidade de injeção de  $156 \mu\text{L s}^{-1}$  foi selecionada para as determinações simultâneas de PA/CA e DI/CA. Nesta velocidade, a análise é rápida e o DPR em estudo de repetibilidade é baixo.

Outro ponto que deve ser considerado é o número de vezes que a corrente é adquirida (leitura de corrente) pelo programa que controla o potenciostato durante o tempo que um pico transiente é gerado numa injeção de amostra ou solução padrão no sistema BIA. Empregando o programa GPES 4.9 que controla o potenciostato microAutolab III, somente uma aquisição de corrente é realizada durante a aplicação de um pulso de potencial (próximo do final do pulso). Assim, em tempos de pulso maiores (volume injetado:  $100 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $156 \mu\text{L s}^{-1}$ ) pode haver perda de reprodutibilidade na resposta do sistema BIA com detecção amperométrica pulsada devido à baixa quantidade de pontos adquiridos na região do pico onde a corrente é máxima. A Figura 38A apresenta os DPR para três injeções de solução contendo PA em função da variação no tempo de aplicação do pulso de potencial em cada amperograma (em + 1,20 e + 1,55 V). Neste caso é possível notar que em tempos de pulso maiores que 125 ms, os DPRs das correntes são elevados. Consequentemente os DP dos fatores neste intervalo também são maiores em maiores (Figura 38A e e 37A).



**Figura 38.** (A) DPR ( $n = 3$ ) das correntes monitoradas no sistema BIA-MPA (em +1,20 V e +1,55 V) e do fator ( $FC = i_{+1,55V}/i_{+1,20V}$ ) para três injeções de solução de PA  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e os respectivos amperogramas adquiridos empregando tempos de pulso de (B) 40 ms e (C) 400 ms. Volume injetado:  $100 \mu\text{L}$ ; Velocidade de injeção:  $156 \mu\text{L s}^{-1}$ .

Conforme pode ser observado na Figura 38C, quando se usa um tempo de pulso de potencial de 400 ms (em +1,2V e +1,55V), o número de vezes que a corrente é adquirida durante um procedimento de injeção é pequeno (somente uma leitura no ápice do pico). Neste caso, existe uma probabilidade considerável de que não haja leitura de corrente no momento exato em que a corrente detectada é máxima. Assim, a repetibilidade do método pode ficar comprometida devido à lentidão na leitura da corrente, pois um ponto é adquirido em cada amperograma a cada 800 ms. Quando tempos de pulso menores são usados, tal como 40 ms (Figura 38B), um número maior de leituras de correntes são possíveis durante a passagem da alíquota da solução padrão ou amostra sobre a superfície do ET (uma leitura em cada amperograma a cada 80 ms), o que é favorável para a obtenção de uma melhor repetibilidade. Concluindo, quando o tempo total de aplicação dos pulsos de potencial empregando MPA for muito elevado, as respostas obtidas podem não corresponder ao transporte de massa

predominante no momento da injeção, pois a leitura da corrente tende a ser mais lenta do que a passagem da alíquota injetada pelo ET. O tempo de contato da solução amostra ou padrão com o eletrodo de trabalho pode ser controlado pelo volume e velocidade de injeção.

Como consequência do comportamento de cada variável discutida acima, as condições utilizadas (otimizadas) na determinação simultânea de PA e CA foram as seguintes: pulsos de potencial aplicados: +1,20V (40 ms) e +1,55V (40 ms); volume injetado: 100  $\mu\text{L}$  e velocidade de injeção: 156  $\mu\text{L s}^{-1}$ .

#### **3.3.1.1.2. Aplicações em formulações farmacêuticas**

Conforme exposto anteriormente, na determinação simultânea de PA e CA empregando BIA-MPA, a seguinte escada (sequência) de potenciais foi alternadamente (“constantemente”) aplicada em função do tempo:

- (1) + 1,20 V (40 ms): oxidação e determinação de PA sem a interferência da CA;
- (2) +1,55 V (40 ms): oxidação de ambos, com a quantificação da CA sem a interferência do PA pela subtração de  $i_{+1,55\text{V}}$  de  $i_{+1,2\text{V}}$  (ajustada pelo fator de correção - FC).

No entanto, alguns requisitos devem ser observados para a obtenção de resultados confiáveis em determinações simultâneas empregando MPA e somente um eletrodo de trabalho, como:

##### **(1) Manutenção das condições do sistema BIA-MPA durante o experimento:**

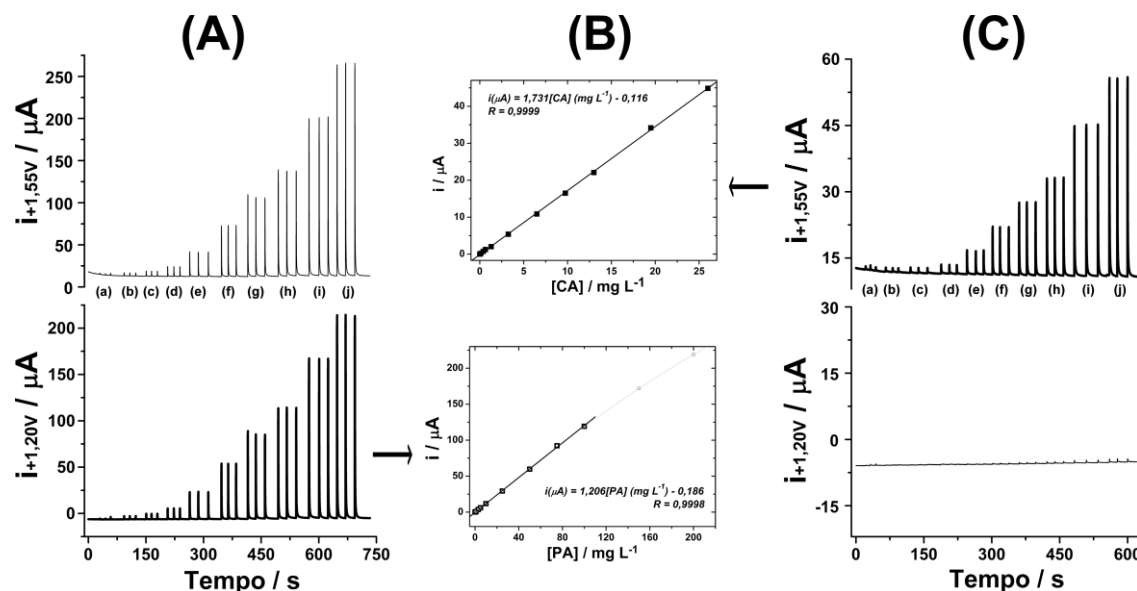
Obviamente, os parâmetros do sistema BIA-MPA (velocidade de injeção, volume injetado, tempo e sequência dos pulsos de potencial) devem ser mantidos constantes durante a análise, pois conforme discutido anteriormente, as respostas do sistema (sensibilidade, frequência analítica, precisão) são influenciadas por estes parâmetros.

##### **(2) Relação linear entre a concentração dos analitos e suas respectivas correntes de oxidação:**

Tanto em determinações simultâneas como em qualquer análise química, a resposta do sistema deve ter uma relação linear com a concentração do analito. Portanto, antes da injeção de soluções padrão contendo as espécies de interesse, esta faixa de concentração deve ser estabelecida com cada analito individualmente.

**(3) Seleção de uma faixa de concentração onde o FC seja constante:** O fator (FC =  $i_{PA+1,55V}/i_{PA+1,20V}$ ) deve possuir as menores variações possíveis no intervalo de concentração da curva de calibração empregada. Esta precaução deve ser tomada visto que o sinal de corrente de oxidação da CA é uma subtração de um valor que depende do FC ( $i_{CA} = i_{+1,55V} - (i_{+1,20V} \times FC)$ ). Portanto, se o fator não possuir um valor relativamente constante (mínimas variações) neste intervalo de concentração, a precisão da resposta obtida para CA fica comprometida.

Na Figura 39A são apresentados os amperogramas obtidos (em  $E_1 = +1,20$  V e  $E_2 = +1,55$  V) para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de PA (1,0 até 200,0 mg L<sup>-1</sup>). A curva de calibração construída a partir das correntes de pico do amperograma em +1,20 V (sinais para a detecção de PA) é apresentada na Fig. 39B.



**Figura 39.** (A) Amperogramas obtidos ( $E_1 = +1,20$  V e  $E_2 = +1,55V$ ) para injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes de PA: 1,0 mg L<sup>-1</sup> (a) a 200,0 mg L<sup>-1</sup> (j); (C) Amperogramas obtidos para injeções de soluções contendo CA entre 0,1 mg L<sup>-1</sup> (a) e 26,0 mg L<sup>-1</sup> (j); (B) Curvas de calibração calculadas a partir das correntes de pico dos amperogramas de A ( $i_{+1,20V}$ ) e C ( $i_{+1,55V}$ ). Condições do sistema BIA: tempo de pulso: 40 ms; volume injetado: 100  $\mu$ L; velocidade de injeção: 156  $\mu$ L s<sup>-1</sup>.

Conforme apresentado, a curva de calibração foi linear nas concentrações entre 1,0 e 100 mg L<sup>-1</sup>. Além disto, o fator obtido apresentou um valor praticamente

constante neste intervalo ( $1,03 \pm 0,01$ ). Do mesmo modo, dois amperogramas foram obtidos a partir da injeção de soluções contendo CA em concentrações entre  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e  $26,0 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 39C). Nesta, nota-se correntes de pico consideráveis somente em  $E_2 = +1,55\text{V}$ , visto que a CA somente apresenta correntes de oxidação em pulsos de potencial acima de  $+1,3\text{V}$  (Figura 31C). A curva de calibração obtida a partir destes resultados é linear em todo o intervalo de concentração avaliado (Figura 39B).

Vale ressaltar que as concentrações de PA e de CA injetadas no sistema BIA-MPA foram planejadas de acordo com a razão da concentração entre PA e CA encontrada em formulações farmacêuticas disponibilizadas no mercado (7,7 vezes mais PA do que CA em m/m, segundo a bula do medicamento).

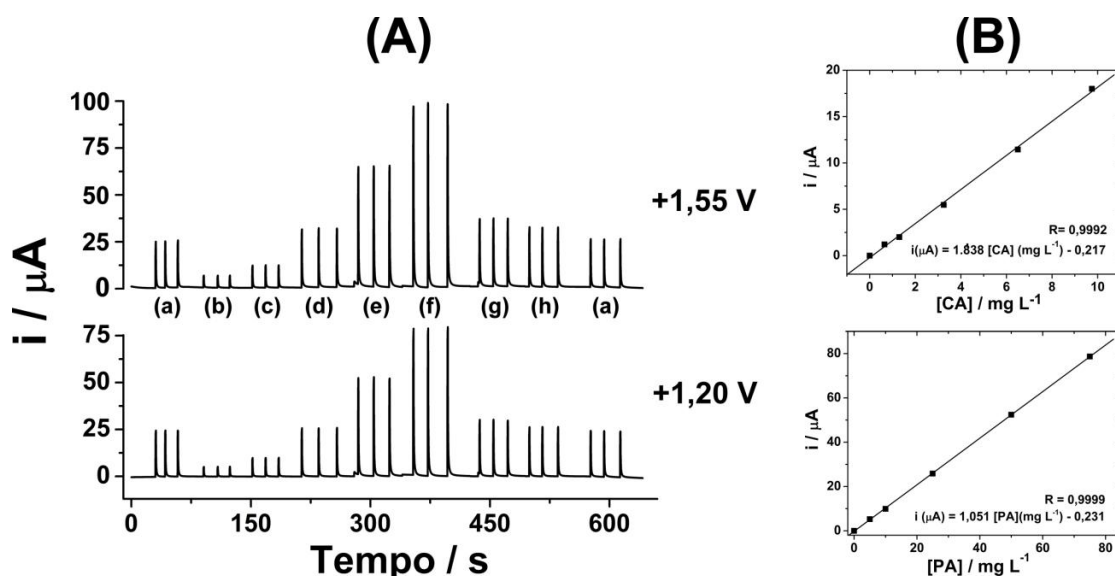
#### **(4) Manutenção do fator durante um percurso de injeções dos padrões e amostras:**

Esta condição é essencial, pois o mesmo FC será utilizado na obtenção das correntes de oxidação da CA em todas as soluções injetadas no sistema (padrões e amostras). Portanto, se o fator variar no decorrer da análise (devido à contaminação do ET, por exemplo), o erro no cálculo da concentração de CA será proporcional a esta variação. Experimentalmente, o fator é monitorado através da injeção de uma solução que contém apenas o analito que oxida nos dois pulsos de potencial (PA), no início e no final do experimento. É importante ressaltar que a espécie empregada na obtenção do FC deve ser injetada pelo menos uma vez em cada análise. Em experimentos realizados em diferentes dias foi verificado que o fator pode apresentar alterações. Por exemplo, trabalhando-se nas mesmas condições experimentais, o FC (PA) apresentou um valor médio de 1,485 em um dia e 1,027 em outro. Provavelmente, estas mudanças ocorrem devido a alterações na superfície do eletrodo de filme de BDD, decorrentes de pequenas diferenças no procedimento de limpeza e ativação.

A Figura 40A apresenta os amperogramas obtidos em  $+1,20 \text{ V}$  e  $+1,55 \text{ V}$  (com as correntes da linha base normalizadas até zero) para injeções em triplicata de cinco soluções padrão contendo misturas de PA e CA em diferentes concentrações (todos na razão  $[\text{PA}]/[\text{CA}] \approx 7,7$ ) e duas formulações farmacêuticas diluídas em eletrólito suporte. As soluções contendo somente PA (a, Fig. 40A) foram injetadas para o cálculo do FC no início ( $\text{FC}_i$ ) e no final das injeções ( $\text{FC}_f$ ). Respectivamente, estes FCs tiveram os valores



de 1,011 ( $\pm 0,006$ ) e 1,049 ( $\pm 0,005$ ), portanto sem alterações significativas no decorrer da curva.



**Figura 40.** (A) Amperogramas obtidos por BIA-MPA após injeções em triplicata de duas soluções de PA (a: 25 mg L<sup>-1</sup>), cinco misturas de PA (b – f: 5,0 até 75,0 mg L<sup>-1</sup>) e CA (b – f: 0,7 até 9,8 mg L<sup>-1</sup>) e duas formulações farmacêuticas (g e h); (B) Respectivas curvas de calibração obtidas para PA e CA. Demais condições iguais à Figura 39.

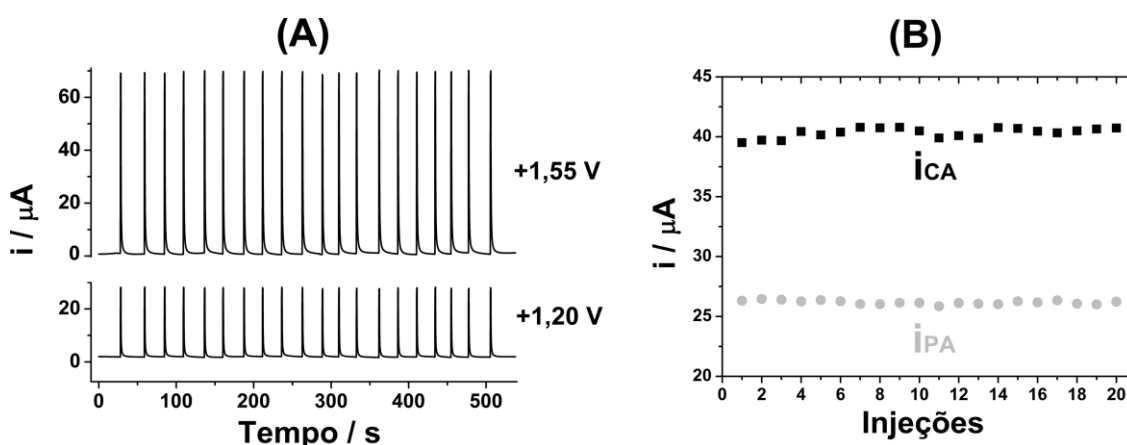
Conforme apresentado na Figura 40B, as curvas de calibração obtidas a partir das correntes de oxidação de PA e CA apresentaram boa linearidade ( $R = 0,999$ ) e as seguintes equações de reta, respectivamente:  $i(\mu A) = 1,051 [PA] (mg L^{-1}) - 0,231$  e  $i(\mu A) = 1,838 [CA] (mg L^{-1}) - 0,217$ . Os LD e LQ foram calculados em 0,26 e 0,35 mg L<sup>-1</sup> para PA e em 0,14 e 0,19 mg L<sup>-1</sup> para CA, respectivamente. Nestas condições, a frequência analítica foi calculada em aproximadamente 160 injeções por hora. As concentrações de PA e CA calculadas por BIA-MPA em formulação farmacêutica analisada, bem como os valores que constam na bula são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Resultados da análise simultânea de PA e CA em medicamento por BIA-MPA

Analitos	Fator	Valor rotulado (mg)	Valor BIA/MPA (mg)	Erro (%) <sup>d</sup>
PA/CA <sup>a</sup>	1,011	500,0 / 65,0	478,2 / 58,6	- 4,4 / - 9,8
PA/CA <sup>b</sup>	1,011	500 / 65	483,7 / 58,3	- 3,3 / - 10,3

<sup>a</sup> comprimido dissolvido diretamente no eletrólito e <sup>b</sup> triturados previamente à dissolução. <sup>c</sup> Tempo de pulso: 40 ms; <sup>d</sup> Erro (%) = 100 (valor BIA-MPA - valor rotulado / valor rotulado).

Finalmente, a precisão do sistema BIA-MPA foi avaliada em análises realizadas no mesmo dia (intra-dias) e em dias diferentes (inter-dias). No mesmo dia, foram comparadas as correntes de oxidação de PA e CA obtidas em injeções sucessivas de solução contendo mistura de PA e CA. Conforme mostrado (Figura 41), o sistema apresentou excelente repetibilidade nas injeções devido aos baixíssimos DPR calculados ( $\text{DPR}_{\text{PA}} = 0,14 \%$ ;  $\text{DPR}_{\text{CA}} = 0,23 \%$ ;  $\text{DPR}_{\text{FC}} = 0,20 \%$ ;  $n=20$ ), caracterizando uma precisão adequada para a determinação simultânea de PA e CA em formulações farmacêuticas. Na avaliação da precisão entre dias, foram usados os valores de sensibilidades obtidas para PA e CA em três distintos dias de análise. Comparando-se os três valores, não foram notadas diferenças significativas ( $\text{DPR}_{\text{PA}} = 5,1 \%$ ,  $\text{DPR}_{\text{CA}} = 1,9 \%$ ;  $n = 3$ ). Logo, mantendo-se as condições do sistema BIA-MPA constantes, bem como os procedimentos de ativação do ET é possível obter resultados reprodutíveis em diferentes dias de análise.

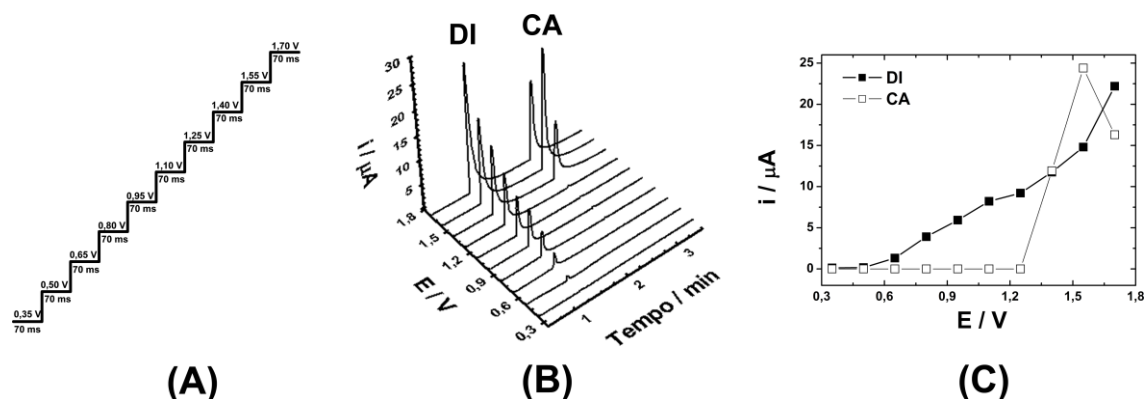


**Figura 41.** (A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas ( $n = 20$ ) de solução mista contendo PA e CA ( $25 \text{ mg L}^{-1}$  cada) no sistema BIA-MPA e (B) respectivas correntes de oxidação de PA e CA. Demais condições iguais à Figura 39.

### 3.3.1.2. Dipirona (DI) e Cafeína (CA)

Os estudos para a determinação simultânea de DI e CA em formulações farmacêuticas empregando BIA-MPA foram realizados do mesmo modo aos efetuados para PA e CA. Na Figura 42B são apresentados os amperogramas obtidos usando o

sistema BIA-MPA com a aplicação de dez pulsos de potencial em meio de tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e injeção de solução contendo DI ou CA.

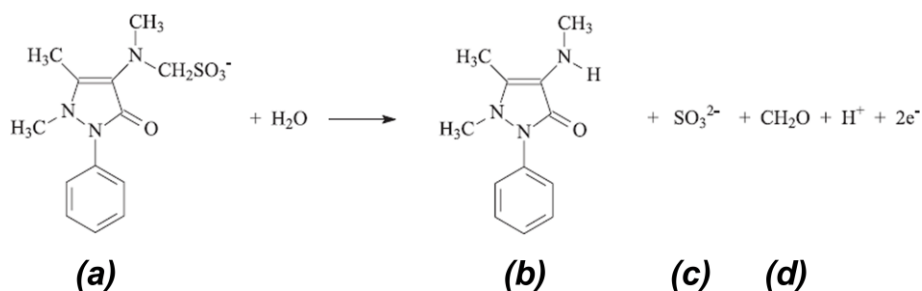


**Figura 42.** (A) Esquema da sequência de pulsos de potencial aplicados no ET de BDD (forma cíclica) para o estudo do comportamento eletroquímico de DI e CA; (B) Amperogramas obtidos com a injeção de solução contendo DI ou CA (25 mg L<sup>-1</sup>) e (C) respectivos voltamogramas hidrodinâmicos. Demais parâmetros idem aos da Fig. 34.

Na Figura 42C são apresentados os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos pela plotagem das correntes de oxidação obtidas em cada pulso de potencial (Figura 42B) para injeções de solução contendo DI ou CA. Conforme pode ser observado, o mecanismo de oxidação da DI envolve mais de uma etapa. Inicialmente existe um aumento da corrente de oxidação em potencial próximo a + 0,40 V alcançando um máximo (patamar) em +1,10 V. No entanto, em potenciais maiores que +1,10 V ocorre um novo aumento de corrente até +1,70 V, sem alcançar um valor máximo no intervalo de pulsos de potencial aplicados (+0,35 V até +1,70 V).

Este comportamento eletroquímico da oxidação de DI na superfície de eletrodos não modificados já havia sido relatado anteriormente na literatura [127, 176]. De acordo com Teixeira *et al.* [176], a DI é submetida a quatro processos de oxidação na superfície do ET, sendo o primeiro relativo à oxidação do grupo metanossulfato (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) presente na sua estrutura. Nesta reação existe a liberação de dois elétrons, um íon H<sup>+</sup>, uma molécula de formaldeído e um ânion sulfito. Os mecanismos relativos às outras oxidações da dipirona não foram reportados na literatura até o momento. As equações para as reações de oxidação de DI na superfície

do ET são apresentadas na Figura 43. As reações de oxidação de CA já foram discutidas na Figura 35 deste trabalho.



**Figura 43.** Esquema do mecanismo de oxidação da dipirona segundo Teixeira *et al.* [176] (a) Ânion da dipirona (forma reduzida); (b) Dpirona (forma oxidada); (c) Ânion sulfito; (d) formaldeído.

De acordo com o comportamento eletroquímico de cada analito na superfície do ET (BDD) em meio de TAC  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , é possível utilizar a seguinte sequência de pulsos de potencial (por MPA) na determinação simultânea de DI e CA, conforme apresentado na Figura 44:

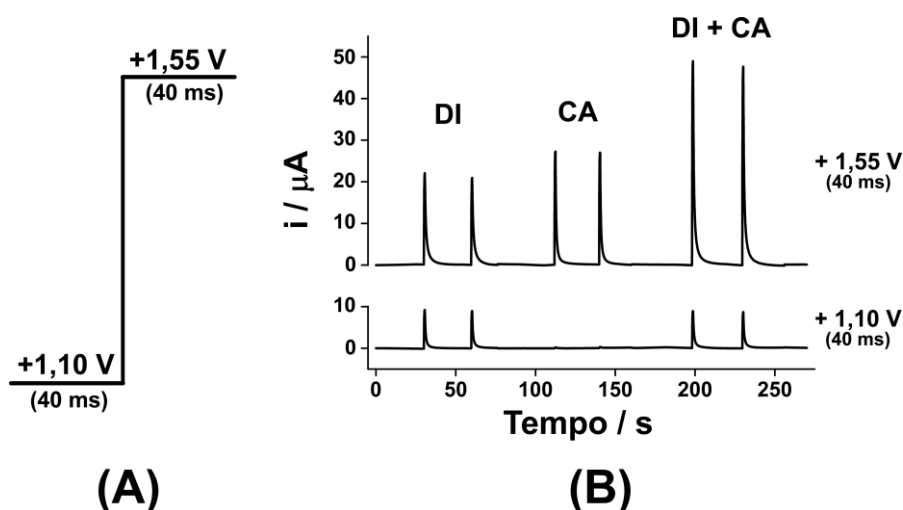
- (1) + 1,10 V (40 ms): oxidação e determinação de DI, sem a interferência de CA;
- (2) + 1,55 V (40 ms): oxidação DI e CA, com a determinação de CA através da Equação 8 e o uso de um fator de correção (FC, Eq. 9) calculado com as correntes detectadas na injeção de solução contendo somente DI.

$$i_{CA} = i_{+1,55V} - (i_{+1,10V} \times FC) \quad (8)$$

$$FC = i_{DI+1,55V} / i_{DI+1,10V} \quad (9)$$

A Figura 44 apresenta os amperogramas obtidos nos pulsos de potencial de +1,10 V e +1,55 V para injeções em duplicata de três soluções teste de composições diferentes: (1) somente  $25 \text{ mg L}^{-1}$  DI; (2) somente  $25 \text{ mg L}^{-1}$  CA e (3) mistura de DI + CA ( $25 \text{ mg L}^{-1}$  cada). Conforme apresentado, somente DI é oxidada em +1,10 V, visto que as correntes neste potencial são de  $9,1 \text{ } \mu\text{A}$  e  $8,9 \text{ } \mu\text{A}$  nas injeções da solução contendo somente DI e mistura de DI + CA, respectivamente. No pulso de potencial de +1,55 V, DI e CA são oxidadas simultaneamente, pois a corrente neste pulso de potencial na

injeção da solução contendo mistura de DI e CA (48,7  $\mu\text{A}$ ) corresponde à soma das correntes adquiridas para cada composto individualmente (21,5  $\mu\text{A}$  para DI + 27,0  $\mu\text{A}$  para CA).

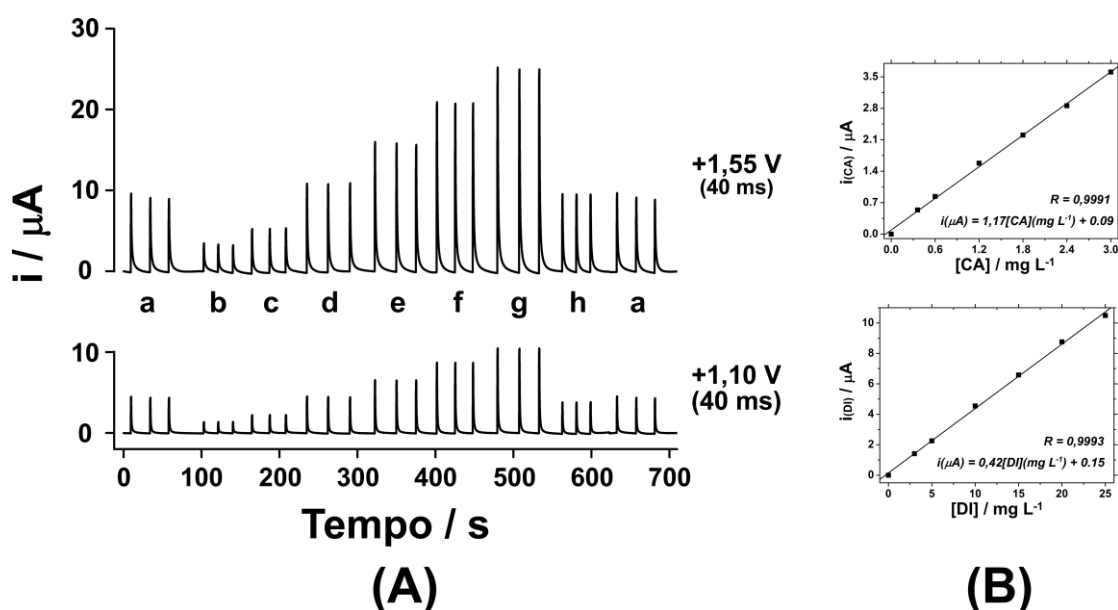


**Figura 44.** (A) Sequência de pulsos de potencial aplicados ao ET de BDD; (B) Respostas obtidas por BIA-MPA após injeções (em duplicata) de soluções contendo 25 mg L<sup>-1</sup> de DI ou 25 mg L<sup>-1</sup> de CA ou mistura de ambos na mesma concentração cada (25 mg L<sup>-1</sup>). Demais condições: idem à Figura 36.

Na Figura 44 observa-se também que a corrente de oxidação da DI obtida em +1,55 V é aproximadamente o dobro da corrente de oxidação da DI obtida em +1,10 V, o que está de acordo com o comportamento eletroquímico da DI no sistema BIA-MPA apresentado na Figura 42C. Logo, na determinação simultânea de DI e CA, o fator apresenta um valor sempre próximo a 2 ( $FC = i_{DI+1,55V}/i_{DI+1,10V}$ ). É importante enfatizar que o valor do fator foi constante (DPR = 1,6 %) na faixa linear investigada para DI (5,0 até 50,0 mg L<sup>-1</sup>) empregando as condições otimizadas do sistema BIA-MPA (Velocidade de injeção: 156  $\mu\text{L s}^{-1}$ , volume injetado: 100  $\mu\text{L}$ ).

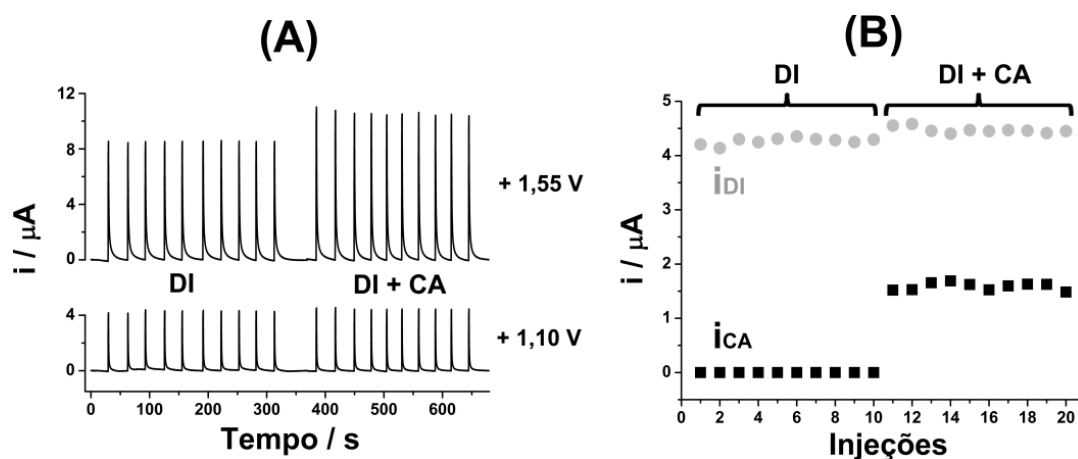
Para demonstrar a potencialidade do sistema BIA-MPA na determinação simultânea de DI e CA, a Figura 45A mostra os amperogramas obtidos em + 1,10 V e + 1,55 V para injeções em triplicata de soluções padrão contendo concentrações crescentes de DI e CA e de uma solução de uma amostra (comprimido dissolvido no eletrólito). As concentrações de DI e CA em cada solução padrão foram selecionadas de acordo com a relação existente entre estes compostos em formulações farmacêuticas comerciais (250 mg de DI e 30 mg de CA).

Conforme apresentado, as curvas obtidas para DI e CA apresentaram boa linearidade nas respectivas faixas de concentração avaliadas ( $R = 0,999$ ). Os LDs foram calculados em  $0,26 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,04 \text{ mg L}^{-1}$  para DI e CA, respectivamente. O fator, que foi calculado pela razão das correntes de oxidação detectadas na injeção de solução contendo somente DI (a – Fig. 45A), apresentou valor praticamente constante no início (2,07) e no final da análise (2,08). As concentrações calculadas por BIA-MPA ( $n=3$ ) foram  $225 \text{ mg} (\pm 11)$  e  $30 \text{ mg} (\pm 2)$ , o que corresponde às recuperações de 90 e 100 %, respectivamente.



**Figura 45.** (A) BIA-MPA obtidos após injeções (em triplicata) de duas soluções de DI (a:  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), seis soluções de misturas de DI (b–g:  $3,0$  até  $25,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e CA (b–g:  $0,36$  até  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e uma formulação farmacêutica (h); (B) respectivas curvas de calibração obtidas para DI e CA. Condições iguais às da Figura 39.

A Figura 46 apresenta os resultados obtidos para injeções sucessivas ( $n = 10$ ) no sistema BIA-MPA de solução contendo somente DI ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e de solução contendo ambos os compostos (DI + CA;  $10,0$  e  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente).



**Figura 46.** (A) Amperogramas obtidos para dez injeções de solução padrão contendo DI 10,0 mg L<sup>-1</sup> e dez injeções de solução padrão contendo simultaneamente DI + CA (10,0 + 1,2 mg L<sup>-1</sup>); (B) Respectivas correntes de oxidação obtidas para DI ( $i_{+1,10V}$ ) e CA ( $i_{+1,55V} - FC \times i_{+1,10V}$ ). Demais condições iguais à Figura 39.

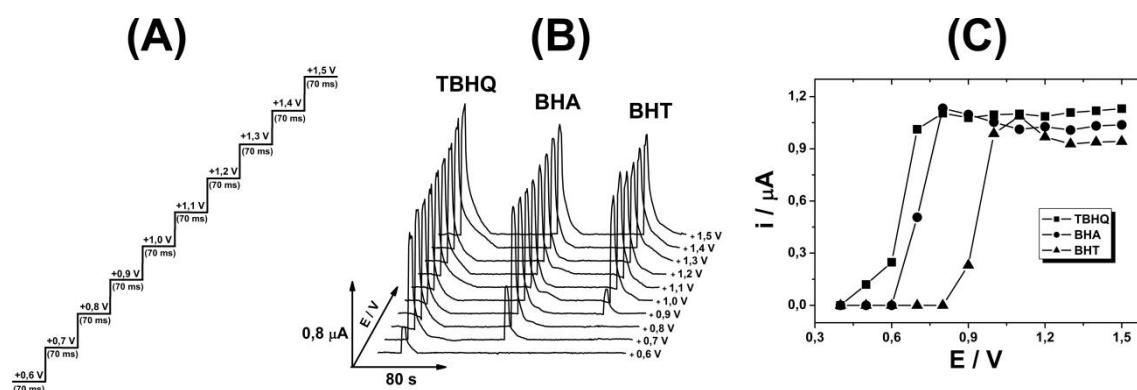
A partir dos resultados apresentados na Fig. 46, os seguintes desvios padrões relativos foram calculados:  $DPR_{DI} = 0,40 \%$ ;  $DPR_{CA} = 1,37 \%$ ;  $DPR_{FATOR} = 0,47 \%$ . Estes resultados demonstram que o método proposto (BIA-MPA) apresenta adequada precisão, seletividade e sensibilidade para a determinação simultânea de DI e CA em formulações farmacêuticas.

### 3.3.1.3. TBHQ, BHA e BHT

No início dos estudos de determinação simultânea de TBHQ, BHA e BHT por BIA-MPA, algumas condições experimentais adotadas foram obtidas a partir de trabalhos publicados anteriormente [48, 106, 128, 160]. Primeiramente, nas determinações de TBHQ, BHA e BHT (individualmente ou simultaneamente) é necessário um eletrólito que contenha em sua composição um solvente orgânico (etanol), devido à baixa solubilidade destes antioxidantes fenólicos em meio aquoso. Em dois trabalhos publicados por Medeiros *et al.* [106, 128], foi utilizado um eletrólito composto por etanol/solução de KNO<sub>3</sub> 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 1,5) na proporção de 30/70 % (v/v) na determinação de BHA e BHT em maionese. Em outros trabalhos, Tormin *et al.* empregaram como eletrólito uma mistura de etanol/HClO<sub>4(aq.)</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> 75/25 (v/v) na determinação de TBHQ [160] e de etanol/HClO<sub>4(aq.)</sub> 50/50 (v/v) na determinação de

BHA [48], ambos em biodiesel. Vale ressaltar que nestes trabalhos foi empregado um eletrodo de filme de BDD pré-tratado catodicamente.

Logo, os estudos iniciais na investigação do comportamento eletroquímico de TBHQ, BHA e BHT foram realizados em solução contendo 30 % de etanol (v/v). Inicialmente, experimentos por SWV foram realizados para a verificação dos sinais obtidos para cada antioxidante em quatro eletrólitos suportes diferentes: TAC, tampão Britton–Robinson, KCl + HCl e NaOH (todos na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e preparados em meio de 30/70 % de etanol/água). Através dos voltamogramas obtidos (não apresentados), foi observado que o eletrólito composto por KCl e HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  apresentou melhor sensibilidade para o BHT e melhor separação do potencial de pico entre TBHQ e BHA. Na Figura 47C são apresentados os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para TBHQ, BHA e BHT neste meio por BIA-MPA.



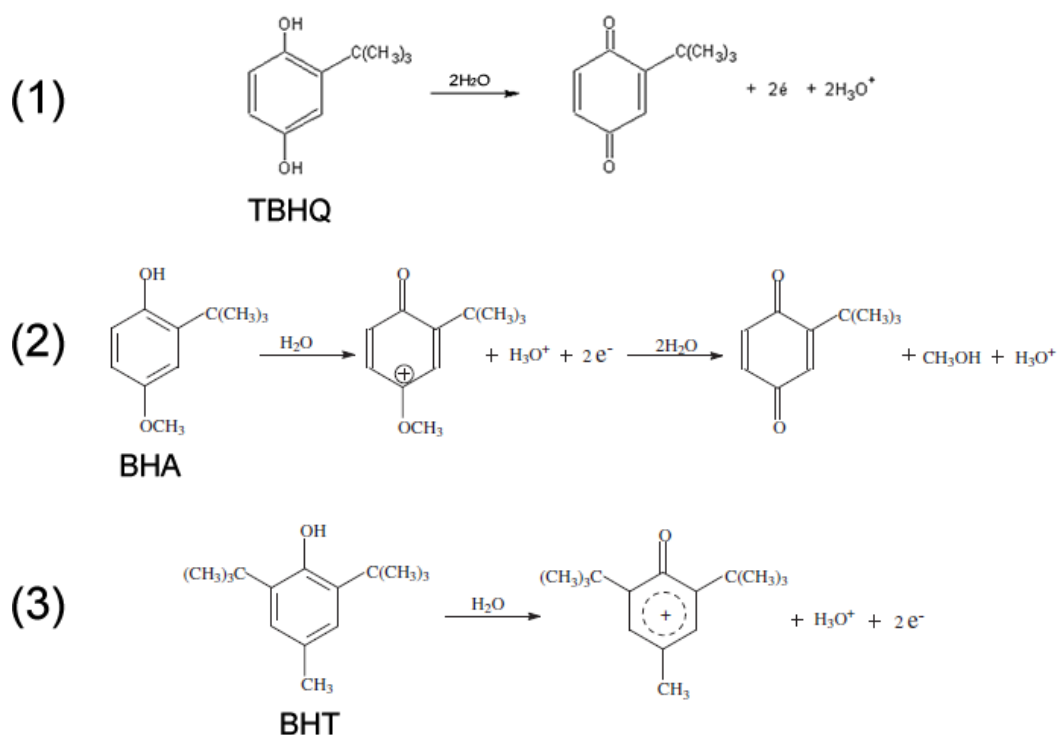
**Figura 47.** (A) Esquema da sequência de pulsos de potencial empregados no estudo do comportamento eletroquímico de TBHQ, BHA e BHT usando o sistema BIA; (B) Amperogramas obtidos na injeção de solução contendo TBHQ ou BHA ou BHT ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); (C) Voltamogramas hidrodinâmicos. Vol.<sub>injetado</sub>:  $200 \mu\text{L}$ ; Vel.<sub>injeção</sub>:  $56 \mu\text{L s}^{-1}$ . Eletrólito: KCl + HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em 30/70 % de etanol/água, respectivamente.

Conforme observado, cada composto é oxidado na janela de potencial estudada. O TBHQ foi oxidado em todo o intervalo de potencial avaliado (+0,6 a +1,5 V; Figura 47A), atingindo uma corrente máxima ou limite ( $i_L$ ) em +0,7 V. Já o BHA e o BHT somente são oxidados em potenciais mais elevados, apresentando  $i_L$  em potenciais acima de +0,8 V e +1,0 V, respectivamente. Este comportamento eletroquímico apresentado por cada antioxidante ( $E_{p_{\text{TBHQ}}} < E_{p_{\text{BHA}}} < E_{p_{\text{BHT}}}$ ) já havia sido descrito na

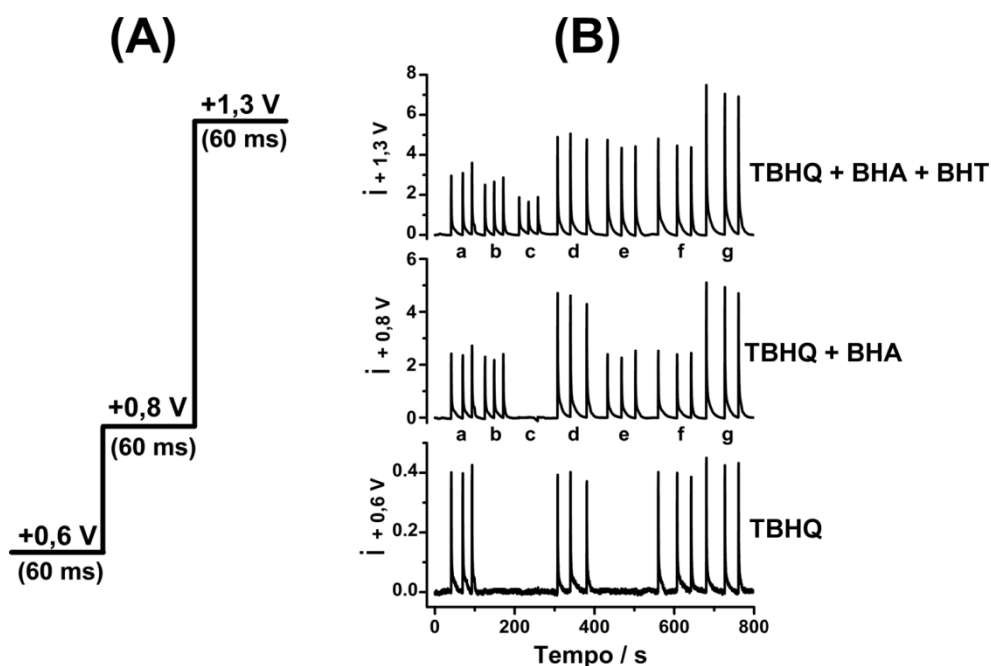


literatura [48, 106, 128, 160]. De acordo com Ceballos *et al.* [177] e de La Fuente *et al.* [178], o mecanismo de oxidação destes antioxidantes fenólicos ocorre num processo envolvendo dois elétrons (Figura 48).

De acordo com a Figura 47C, é possível notar uma menor separação entre os potenciais de pico do TBHQ e do BHA ( $\approx 100$  mV) do que na separação dos potenciais de pico entre o BHA e BHT ( $\approx 200$  mV). Logo, para não haver interferência do sinal gerado (corrente de oxidação) por um analito sobre o de outro na determinação simultânea dos três antioxidantes fenólicos empregando BIA-MPA, é necessário selecionar três pulsos de potencial onde exista uma seletividade adequada para cada espécie. Baseado no comportamento eletroquímico apresentado por cada analito (Figura 47C), um experimento BIA-MPA foi realizado com injeções de soluções padrão contendo TBHQ, BHA e BHT (individualmente ou misturas destes), com aplicação da seguinte sequência de pulsos de potencial ao ET de BDD: + 0,6 V, + 0,8 V e + 1,3 V por 60 ms cada. Os amperogramas de múltiplos pulsos obtidos neste experimento são apresentados na Figura 49.



**Figura 48.** Esquemas das reações de oxidação eletroquímica do TBHQ [178], BHA [178] e BHT [177].



**Figura 49.** (A) Sequência de pulsos de potencial aplicados ao ET de BDD no sistema BIA; (B) Amperogramas obtidos após injeções (em triplicata) de soluções contendo: (a) TBHQ, (b) BHA, (c) BHT, (d) TBHQ + BHA, (e) BHA + BHT, (f) TBHQ + BHT, e (g) TBHQ + BHA + BHT. Condições:  $[TBHQ] = [BHA] = [BHT] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; Eletrólito: KCl + HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (30/70 % de etanol/água); Demais condições iguais à Figura 39.

Os resultados apresentados na Figura 49 nos permitem concluir que:

- (1) + 0,6 V / 60ms: oxidação do TBHQ sem a interferência de BHA e BHT;
- (2) + 0,8 V / 60ms: oxidação simultânea de TBHQ e BHA, sem a interferência de BHT;
- (3) +1,3 V / 60ms: oxidação simultânea dos três antioxidantes (TBHQ, BHA e BHT).

No entanto, tal como nas duas determinações simultâneas anteriores (PA/CA e DI/CA), para discriminar as correntes relativas de cada espécie é necessário o emprego de equações matemáticas, devido à oxidação de mais de um antioxidante nos pulsos de potencial de + 0,8 V e + 1,3 V (na injeção de soluções contendo dois ou três antioxidantes). Além disto, os fatores de correção (FC) devem ser incluídos nas equações para corrigir diferenças nas correntes de um dado analito nos pulsos de potencial empregados. Assim como nos estudos anteriores, o valor a ser usado como FC é obtido mediante a injeção de solução contendo somente o analito presente na amostra que é oxidado em mais de um pulso de potencial. Quando são injetadas soluções contendo misturas de TBHQ, BHA e BHT (binárias ou ternárias) no sistema

BIA-MPA, as correntes de oxidação relacionadas com a oxidação de cada antioxidante (TBHQ, BHA e BHT) individualmente são obtidas através das equações 10, 11 e 12, respectivamente. Três fatores (FC) são utilizados nestas três equações:  $FC_1 = i_{TBHQ+0,9V} / i_{TBHQ+0,6V}$ ;  $FC_2 = i_{TBHQ+1,3V} / i_{TBHQ+0,6V}$ ;  $FC_3 = i_{BHA+1,3V} / i_{BHA+0,8V}$ .

$$i_{TBHQ} = i_{+0,6V} \quad (10)$$

$$\begin{aligned} i_{BHA} &= i_{+0,8V} - i_{TBHQ+0,8V} \\ i_{BHA} &= i_{+0,8V} - (i_{+0,6V} \times FC_1) \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} i_{BHT} &= i_{+1,3V} - i_{TBHQ+1,3V} - i_{BHA+1,3V} \\ i_{BHT} &= i_{+1,3V} - (i_{+0,6V} \times FC_2) - (i_{BHA+0,8V} \times FC_3) \end{aligned} \quad (12)$$

### 3.3.1.3.1. Otimizações

Conforme apresentado na Figura 49, utilizando a sequência de pulsos de potencial de + 0,6 V, + 0,8 V e + 1,3 V em conjunto com as equações 10, 11 e 12 (e os respectivos FCs) é possível diferenciar as correntes de oxidação de cada antioxidante. No entanto, as correntes detectadas para TBHQ, BHA e BHT apresentam características singulares devido a este esquema de detecção, como por exemplo:

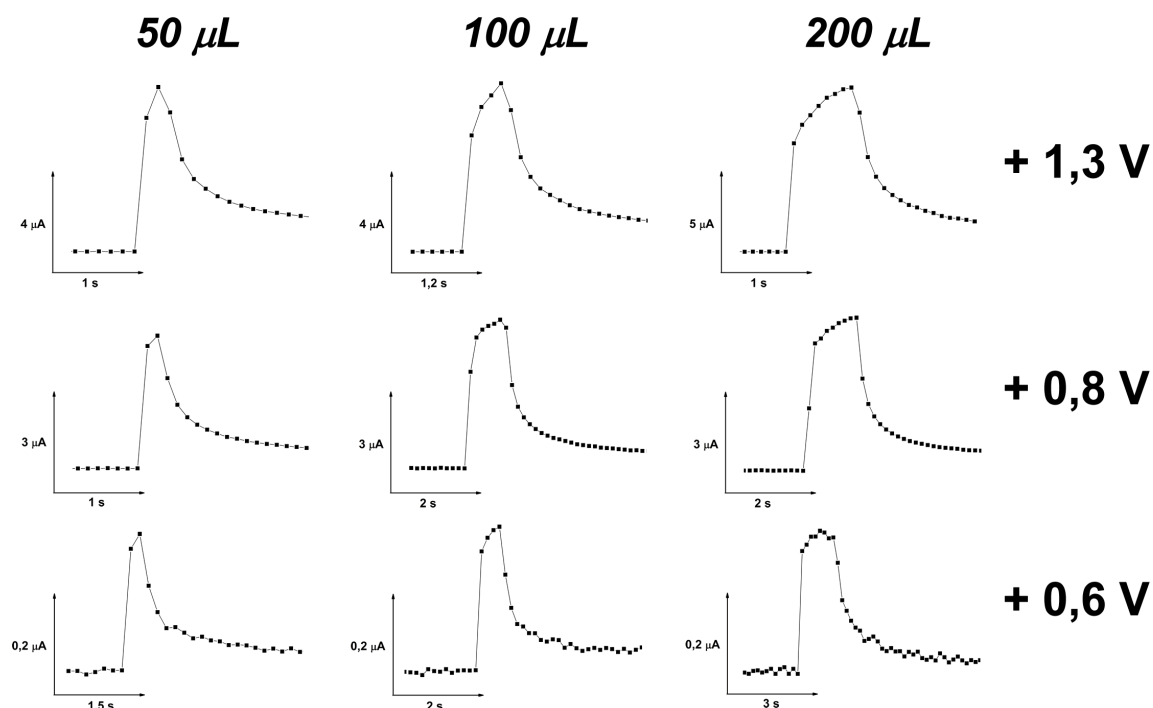
- (1)  $i_{TBHQ}$ : apresenta baixa intensidade em função do pulso de potencial empregado (+0,6 V), o qual não se situa na região onde a corrente é máxima ( $i_L$ ). Caso fosse aplicado um pulso de potencial mais positivo (entre + 0,7 V e + 0,8 V), o BHA também seria oxidado e geraria uma interferência;
- (2)  $i_{BHA}$ : corrente é obtida através de uma subtração (Equação 11), logo tendo uma tendência de apresentar variações maiores (comparando com  $i_{TBHQ}$ );
- (3)  $i_{BHT}$ : corrente obtida através de duas subtrações (Equação 12), podendo apresentar as maiores variações (em relação à  $i_{TBHQ}$  e  $i_{BHA}$ ).

Logo, é necessário otimizar as condições experimentais de forma que o sistema BIA-MPA apresente sensibilidade para TBHQ e precisão adequada para BHA e TBHQ na determinação simultânea destes três antioxidantes.

Conforme apresentado na Figura 38, nos experimentos por MPA, quanto maior o número de pontos de leitura de corrente adquiridos na região do pico onde a corrente é máxima ( $i_{MAX}$ ), melhor é a precisão do sistema (menores DPR). Logo, nas duas determinações simultâneas anteriores (PA/CA e DI/CA) foi utilizado um baixo tempo de pulso de potencial (40 ms). No entanto, aplicando-se três pulsos de potencial (+ 0,6 V, + 0,8 V e + 1,3 V) com tempos de pulso de 40 ms ou 30 ms, o software GPES 4.9.007 passa a apresentar lentidão na aquisição dos dados (não plota os resultados na tela em tempo real, além de não responder prontamente aos comandos realizados via “mouse”). Devido a esta limitação, passou-se a utilizar um tempo de pulso de potencial de 50 ms. Porém, a 50 ms, o número de pontos adquiridos (leitura de corrente) em  $i_{MAX}$  é menor do que empregando 40 ms, comprometendo a precisão do sistema. Então, para adequar a precisão do sistema BIA-MPA (principalmente para  $i_{BHA}$  e  $i_{BHT}$ ) com o tempo de aplicação do pulso de potencial a 50 ms, foi necessário utilizar um maior volume de injeção (200  $\mu$ L). Conforme apresentado na Figura 50, o número de pontos adquiridos na região de  $i_{MAX}$  em cada pulso de potencial (amperograma) é maior num volume injetado de 200  $\mu$ L (maior volume injetado mantendo a velocidade de injeção constante = maior tempo de injeção = maior número de leituras de corrente por pico transiente). Este comportamento pode ser observado através dos DPRs ( $n = 3$ ) calculados com as correntes detectadas no pulso de potencial de 1,3 V em função do volume injetado ( $DPR_{50\mu L} = 4,6 \%$ ;  $DPR_{100\mu L} = 1,6 \%$ ;  $DPR_{200\mu L} = 1,2 \%$ ).

Nas primeiras injeções dos antioxidantes no sistema BIA-MPA, foi verificado que os picos destes analitos eram mais largos (maior tempo necessário para retorno do sinal à linha base) do que os picos dos fármacos estudados anteriormente (PA, DI e CA), devido, provavelmente, à velocidade de difusão mais lenta destes analitos (TBHQ, BHA e BHT). Deste modo, a frequência analítica do sistema BIA-MPA para a determinação simultânea dos antioxidantes seria mais baixa. De forma a diminuir a largura dos picos, foi então inserido no sistema BIA um agitador mecânico (Figuras 12 e

13). No entanto, além do aumento da frequência analítica, também foi necessário estudar com maior ênfase o efeito de outros parâmetros do sistema BIA-MPA (sensibilidade do TBHQ e precisões para BHA e BHT).



**Figura 50.** Amperogramas obtidos para injeções de solução padrão contendo TBHQ, BHA e BHT ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  cada) em função do volume injetado (50, 100 e  $200 \mu\text{L}$ ). Eletrólito: KCl + HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (30/70 % de etanol/água); Velocidade de injeção:  $156 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Tempo de pulso: 50 ms.

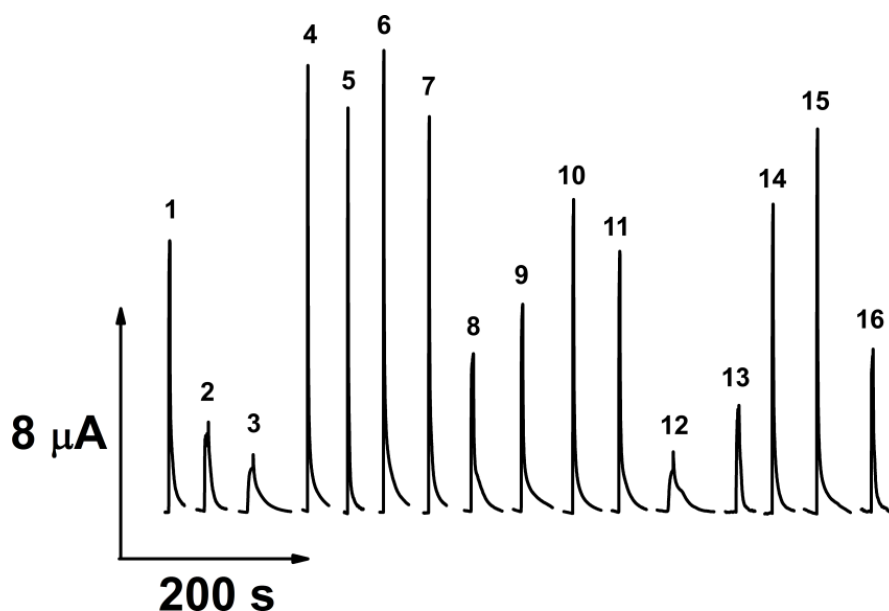
Com o objetivo de avaliar várias características do sistema simultaneamente (sensibilidade, frequência analítica e precisão), dezesseis experimentos foram realizados em diferentes condições (variação da velocidade de injeção e de agitação) do sistema BIA-MPA. Em cada condição foram efetuadas cinco injeções de solução de mistura equimolar de TBHQ, BHA e BHT ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com um volume injetado constante de  $200 \mu\text{L}$ . As condições usadas cada experimento BIA-MPA são apresentadas na Tabela 9. Os formatos dos picos nos respectivos amperogramas obtidos (em + 1,3 V) em cada condição avaliada são apresentados na Figura 51.

**Tabela 9.** Condições dos experimentos para as otimizações das variáveis do sistema BIA-MPA para a determinação simultânea de TBHQ, BHA e BHT.

Experimento	Variáveis		Variáveis escaladas	
	Velocidade de injeção (28 a 344 $\mu\text{L s}^{-1}$ )	Agitação (0 a 4000 rpm)	Velocidade de injeção (-1,0 a + 1,0) <sup>1</sup>	Agitação (-1,0 a 1,0) <sup>2</sup>
1	156	2700	- 0,21	+ 0,35
2	43	4000	- 0,91	+ 1,00
3	28	0	- 1,00	- 1,00
4	344	0	+ 1,00	- 1,00
5	344	4000	+ 1,00	+ 1,00
6	344	1400	+ 1,00	- 0,30
7	256	2200	+ 0,44	+ 0,10
8	75	1760	- 0,70	-0,12
9	113	1400	- 0,46	- 0,30
10	193	0	+ 0,04	- 1,00
11	156	1760	- 0,21	-0,12
12	28	1400	- 1,00	- 0,30
13	56	2600	- 0,82	+ 0,30
14	193	2600	+ 0,04	+ 0,30
15	256	1200	+ 0,44	- 0,40
16	100	2700	- 0,54	+ 0,35

<sup>1</sup> Equação para o cálculo:  $X_{v.inj.} = (V. Inj. - 186) / 158$ .

<sup>2</sup> Equação para o cálculo:  $X_{Agitação} = (Agitação - 2000) / 2000$ .



**Figura 51.** Perfil dos picos amperométricos obtidos na injeção de solução equimolar de TBHQ, BHA e BHT ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em distintas condições do sistema BIA-MPA (Tabela 7). Picos relativos aos amperogramas adquiridos em + 1,3 V. Volume injetado: 200  $\mu\text{L}$ .

Conforme apresentado na Figura 51, as formas do pico (altura e largura) são extremamente dependentes da velocidade de injeção e da intensidade da agitação utilizada na célula BIA. No entanto, para facilitar a compreensão dos efeitos das condições experimentais nas particularidades desejadas na determinação simultânea (sensibilidade para o TBHQ e precisão para BHA e BHT), cada parâmetro foi avaliado separadamente.

Para isto, foi obtida uma superfície de resposta para cada característica (corrente, frequência analítica, ruído e DPR). Estas superfícies (e as respectivas equações matemáticas) foram geradas pelo software Statistica 7, com base nos sinais dos amperogramas adquiridos nos 16 experimentos realizados por BIA-MPA (Tabela 7).

Os dados de entrada inseridos no software para a geração das superfícies de resposta foram:

- a) **eixo x:** valores escalados de velocidade de injeção;
- b) **eixo y:** valores escalados de agitação;
- c) **eixo z:** resposta obtida (ruído, corrente, DPR ou frequência analítica).

Nestes casos, foi necessário inserir variáveis escaladas para não haver interferência da grandeza de uma variável nas respostas do sistema. Por exemplo, os valores da grandeza velocidade de injeção (28 a 344  $\mu\text{L s}^{-1}$ ) são bem menores do que os valores da agitação do eletrólito (0 a 4000 rpm).

Uma expressão matemática geral para a obtenção de uma variável escalada qualquer é apresentada na equação 13 [179]. As variáveis escaladas de velocidade de injeção e agitação, bem como as equações matemáticas utilizadas na obtenção das mesmas são apresentadas na Tabela 9.

$$X_n = \frac{X_{real} - X_{médio}}{\frac{\Delta X}{2}} \quad (13)$$

Onde:

$X_n$  = variável escalada.

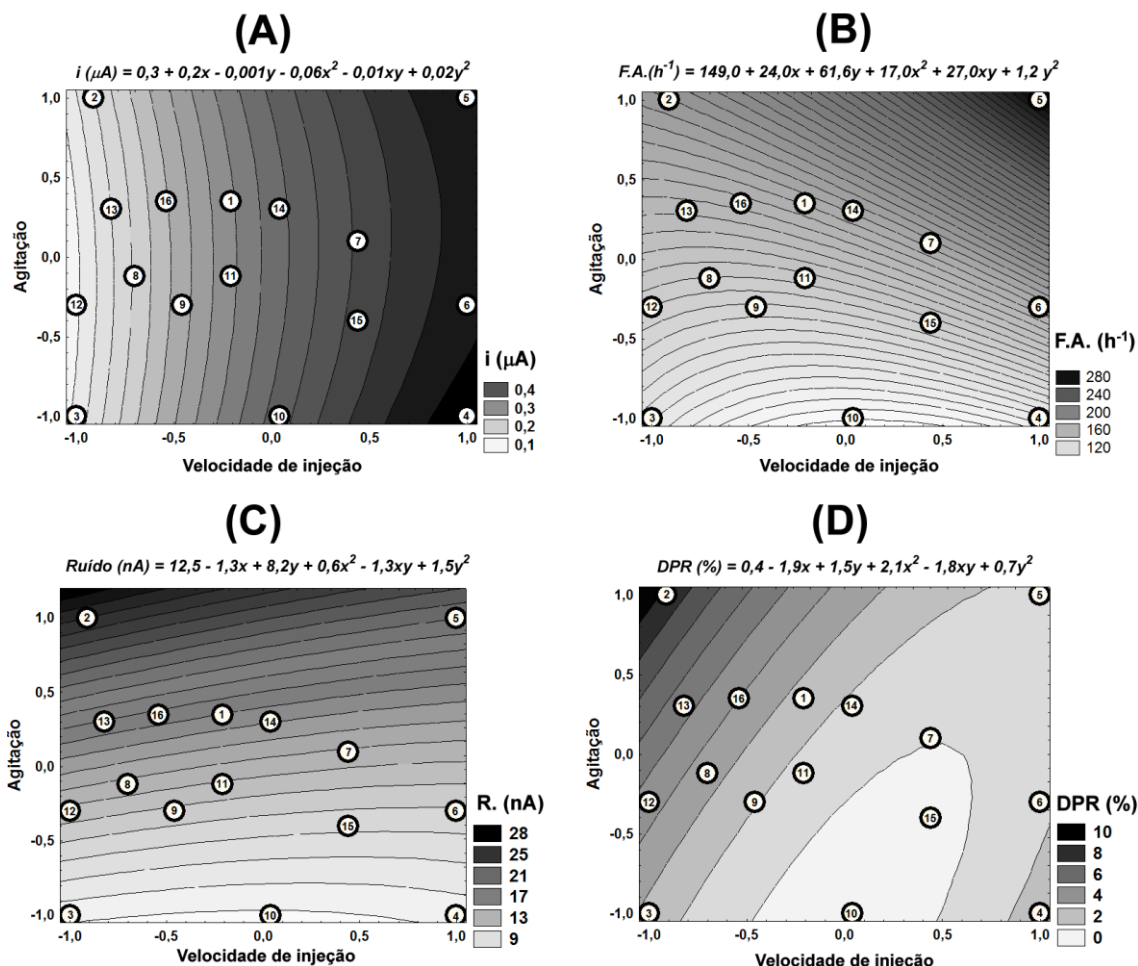
$X_{real}$  = valor real da variável escalada.

$X_{médio}$  = valor médio da amplitude de variação da variável

$\Delta X$  = Diferença entre o valor superior e inferior da variável.

Na Figura 52 são apresentadas as superfícies de resposta geradas para o TBHQ a partir dos resultados (amperogramas) obtidos em distintas condições de velocidade

de injeção e agitação. Cada superfície é relativa a uma resposta do sistema BIA-MPA (corrente, frequência analítica, ruído e DPR). As dezesseis condições experimentais na forma de variáveis escaladas também são representadas nestas superfícies.



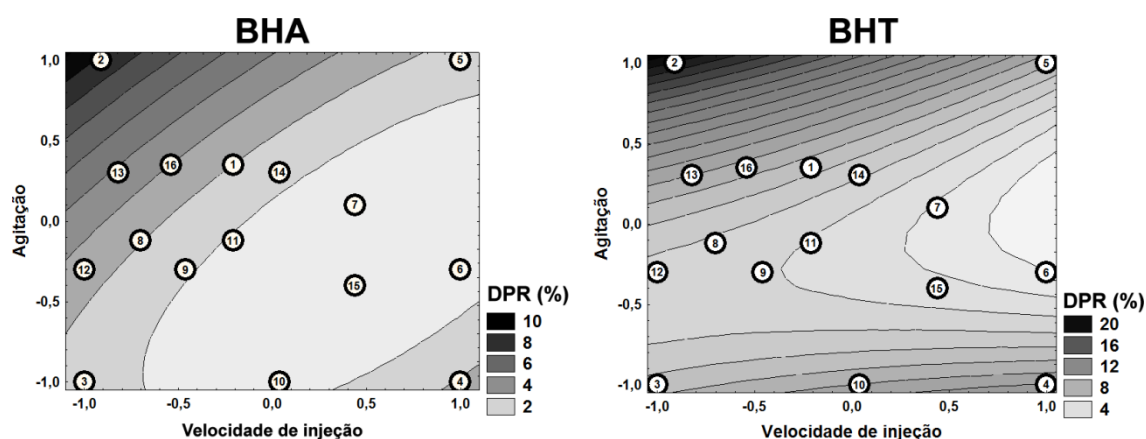
**Figura 52.** Superfícies de resposta e respectivas equações matemáticas (funções quadráticas) para TBHQ geradas a partir dos amperogramas obtidos em distintas condições do sistema BIA-MPA. Respostas: corrente (A), frequência analítica (B), ruído (C) e DPR (D). Volume injetado: 200  $\mu$ L; Tempo de pulso: 50 ms; x e y (nas equações) correspondem às variáveis escaladas de vel. de injeção e agitação, respectivamente.

Conforme apresentado na Figura 52A (e respectivas equações matemáticas geradas), observa-se que as correntes mais intensas de TBHQ (maior sensibilidade) são obtidas quando as injeções são realizadas em altas velocidades. Vale ressaltar que as superfícies geradas para  $i_{BHA}$  e  $i_{BHT}$  (não apresentadas) também apresentaram os mesmos perfis, porém com sinais mais intensos, visto que as correntes de BHA e BHT



são maiores. Além disto, maiores frequências analíticas (Figura 52B) são obtidas empregando maiores velocidades de injeção e/ou de agitação. Já o ruído da linha base possui relação apenas com a velocidade de agitação da célula BIA (Figura 52C). Entretanto, mesmo nas velocidades de agitação maiores, os ruídos (9 a 25 nA) são muito inferiores às correntes (0,1 a 0,4  $\mu\text{A}$ ). Nas Figuras 52D, 53A e 53B são apresentadas as superfícies relativas aos DPR para TBHQ, BHA e BHT, respectivamente. Conforme discutido no início desta seção, os DPR obtidos para o BHT são maiores do que os DPR encontrados para BHA e TBHQ ( $\text{DPR}_{\text{BHT}} > \text{DPR}_{\text{BHA}} > \text{DPR}_{\text{TBHQ}}$ ). Dentre todos os experimentos realizados, as condições 7 e 15 apresentaram os menores DPR para os três analitos. Entretanto, apesar da sensibilidade ser bem parecida nestas duas condições (Figura 52A), a frequência analítica obtida na condição 7 é superior (Figura 52B), devido à maior velocidade de agitação do sistema BIA. Além disto, a partir de outras superfícies de DPR geradas para  $\text{FC}_1$ ,  $\text{FC}_2$  e  $\text{FC}_3$  (não apresentadas), foi observado que baixos DPR dos fatores (FCs) também foram obtidos na condição 7.

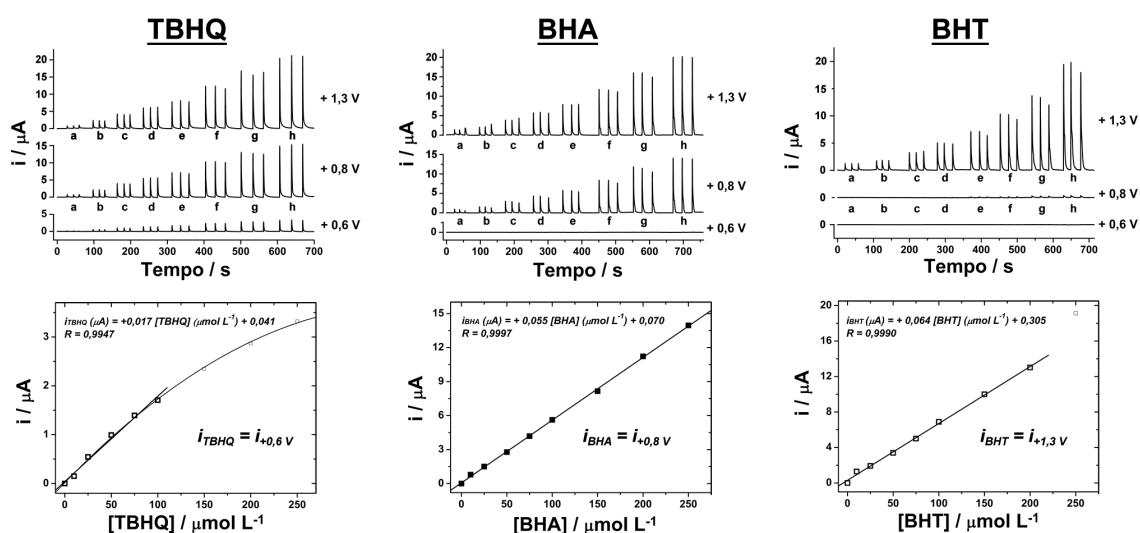
Logo, a condição do sistema BIA-MPA nº 7 oferece sensibilidade adequada para TBHQ e baixos DPR para  $i_{\text{BHA}}$ ,  $i_{\text{BHT}}$  e para os fatores de correção. Esta condição, que corresponde à velocidade de injeção de  $256 \mu\text{L s}^{-1}$  e agitação de 2200 rpm foi adotada nos experimentos subsequentes.



**Figura 53.** Superfícies de resposta para o DPR (funções quadráticas) de BHA e BHT obtidas a partir dos distintos experimentos BIA-MPA da Tabela 7.  $i_{\text{BHA}}$  e  $i_{\text{BHT}}$  obtidas das equações 6 e 7, respectivamente. Demais condições conforme Figura 52.

### 3.3.1.3.2. Aplicações:

Conforme apresentado anteriormente neste trabalho na determinação simultânea dos fármacos (PA/CA, DI/CA), para a obtenção de resultados confiáveis é necessário injetar os padrões de cada antioxidante em uma faixa de concentração onde exista uma relação linear entre concentração e as respectivas correntes de cada analito. Além disto, é indispensável trabalhar em uma faixa de concentração onde os fatores de correção apresentem valores relativamente constantes. Logo, foram injetados no sistema BIA-MPA soluções padrão contendo somente TBHQ, BHA ou BHT em uma faixa de concentração entre  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $250,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 54).

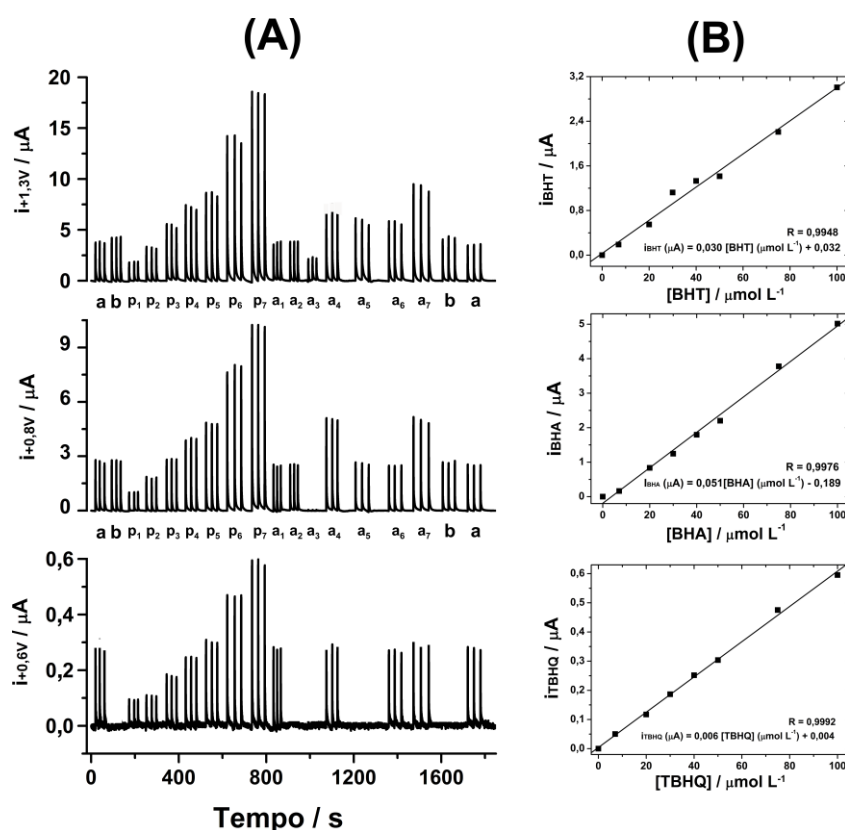


**Figura 54.** Amperogramas e respectivas curvas de calibração obtidas para injeções de soluções contendo TBHQ ou BHA ou BHT em concentrações crescentes (a – g:  $10 - 250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Condições otimizadas: Volume injetado:  $200 \mu\text{L}$ ; tempo de pulso:  $50 \text{ ms}$ ; Velocidade de injeção:  $250 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Agitação:  $2200 \text{ rpm}$ .

Conforme apresentado na Figura 54, as curvas obtidas para o TBHQ, BHA e BHT apresentaram linearidade adequada até  $100$ ,  $250$  e  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. No entanto, os fatores de correção apresentaram maior precisão em concentrações até  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\text{FC}_1 = 4,11 \pm 0,09$ ;  $\text{FC}_2 = 4,37 \pm 0,12$ ;  $\text{FC}_3 = 1,35 \pm 0,02$ ).

Após estas investigações preliminares, foi realizado o experimento para a determinação simultânea dos antioxidantes. Para tal, foram injetadas no sistema BIA-

MPA soluções padrões de composição mista contendo TBHQ + BHA + BHT em concentrações crescentes e equimolares ( $10 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e sete amostras simuladas. Estas amostras foram preparadas através da diluição de padrões previamente dissolvidos em etanol de TBHQ, BHA e BHT. No total foram preparadas sete soluções, sendo três contendo somente um analito (TBHQ ou BHA ou BHT), três contendo misturas de dois analitos (TBHQ + BHA, BHA + BHT, TBHQ + BHT) e uma contendo os três (TBHQ, BHA e BHT). A concentração dos analitos foi de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os amperogramas obtidos neste experimento (+ 0,6 V, + 0,8 V e + 1,3 V) e as respectivas curvas de calibração calculadas para TBHQ, BHA e BHT são apresentados na Figura 55A e 55B, respectivamente.



**Figura 55.** (A) Amperogramas obtidos após injeções em triplicata de duas soluções de TBHQ (a:  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), duas soluções de BHA (b:  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), sete soluções padrão contendo solução mista de TBHQ, BHA e BHT ( $p_1$  a  $p_7$ : 7 a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cada), sete amostras simuladas contendo ( $a_1$ ) TBHQ, ( $a_2$ ) BHA, ( $a_3$ ) BHT, ( $a_4$ ) TBHQ + BHA, ( $a_5$ ) BHA + BHT, ( $a_6$ ) TBHQ + BHT e ( $a_7$ ) TBHQ + BHA + BHT ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  cada); (B) Respectivas curvas de calibração para TBHQ, BHA e BHT. Demais condições: idem à Figura 53.

Antes de injetar os padrões de composição mista, foi injetada uma solução padrão contendo somente TBHQ ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) para o cálculo de  $FC_1$  e  $FC_2$  e de solução padrão contendo somente BHA ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) para o cálculo de  $FC_3$ . Estas soluções foram novamente injetadas ao final do experimento. De acordo com os valores calculados, observa-se que não existem diferenças significativas entre os fatores de correção calculados no início do experimento ( $FC_i$ ) e ao final do mesmo ( $FC_f$ ). Os valores obtidos foram os seguintes:  $FC_{1i} = 8,6$  ( $FC_{1f} = 8,9$ );  $FC_{2i} = 12,4$  ( $FC_{2f} = 12,8$ );  $FC_{3i} = 1,6$  ( $FC_{3f} = 1,6$ ). Além disto, na injeção das soluções padrão e das soluções amostra foi obtida uma seletividade para cada analito (tal como na Figura 49B). As 54 injeções foram efetuadas em aproximadamente 1600 s, o que corresponde a uma frequência analítica de aproximadamente 120 injeções por hora.

Em relação às três curvas de calibração obtidas (Figura 55B), foi encontrada maior sensibilidade para o BHA e menor sensibilidade para o TBHQ, tal como exposto anteriormente (seção 3.3.1.3.1.). Além disto, a curva de calibração do BHT apresentou menor coeficiente de correlação ( $R = 0,995$ ) em relação às curvas de TBHQ ( $R = 0,999$ ) e BHA ( $R = 0,998$ ), devido ao erro maior encontrado na corrente obtida pela subtração das correntes detectadas nos outros pulsos de potenciais (Equação 12). Os limites de detecção e quantificação calculados para TBHQ, BHA e BHT foram respectivamente: 2,30 e 7,67; 0,18 e 0,58; 0,54 e 1,80 ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Os resultados obtidos na determinação de TBHQ, BHA e BHT nas sete amostras simuladas são apresentados na Tabela 10.

Conforme apresentado (Tabela 10), os erros nas concentrações determinadas por BIA-MPA em relação às concentrações presentes nas amostras simuladas foram menores que 10 %. No entanto, nas amostras 5, 6 e 7 os erros encontrados na determinação de BHT foram maiores do que 10 %, provavelmente devido à menor precisão encontrada para este composto por BIA-MPA.

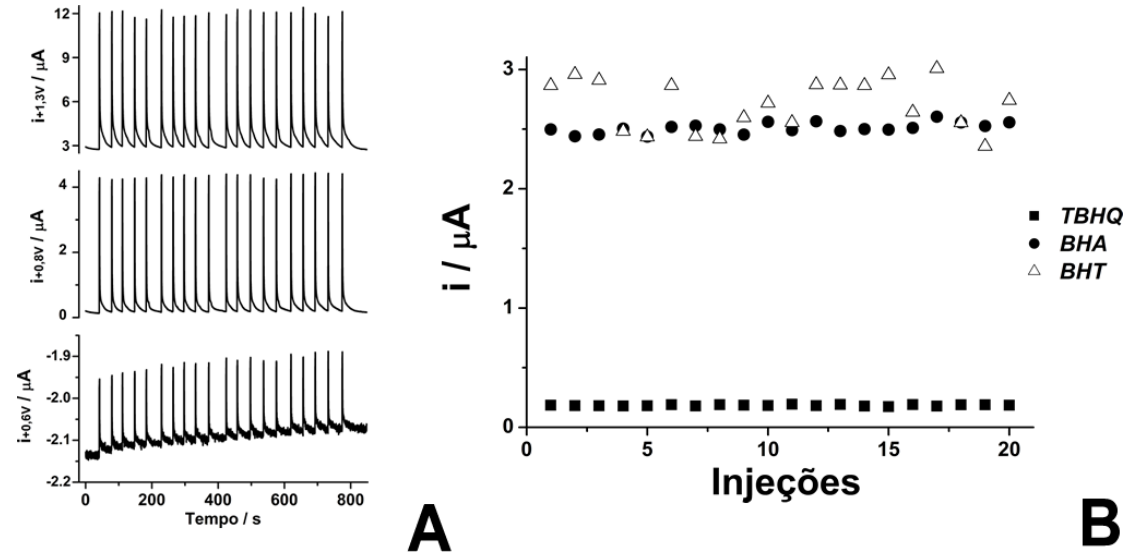
Finalmente, um estudo de repetibilidade do sistema (Figura 56A) foi realizado mediante vinte injeções sucessivas de soluções contendo simultaneamente TBHQ, BHA e BHT ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  cada). Através destes amperogramas, concluiu-se que o sistema BIA-MPA apresenta boa estabilidade em função do tempo devido aos baixos DPR calculados ( $DPR_{TBHQ} = 0,68 \%$ ;  $DPR_{BHA} = 0,99 \%$ ;  $DPR_{BHT} = 1,75 \%$ ;  $n = 20$ ). Conforme

previsto, as variações nas correntes de TBHQ foram menores (menor DPR) e as variações nas correntes de BHT foram maiores (Figura 56B).

**Tabela 10.** Resultados obtidos na determinação simultânea de TBHQ, BHA e BHT em amostras simuladas (antioxidantes dissolvidos em etanol) empregando BIA-MPA.

AM.	Adicionado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )			Recuperado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )			Erro (%) <sup>†</sup>		
	TBHQ	BHA	BHT	TBHQ	BHA	BHT	TBHQ	BHA	BHT
1	50,0	0	0	48,2 $\pm$ 0,5	3,9 $\pm$ 0,1	- 0,8 $\pm$ 3,9	- 3,6	ND	ND
2	0	50,0	0	- 0,7 $\pm$ 0,9	52,9 $\pm$ 0,6	- 2,4 $\pm$ 1,4	ND	5,8	ND
3	0	0	50,0	- 0,7 $\pm$ 1,0	3,7 $\pm$ 0,0	52,7 $\pm$ 1,4	ND	ND	5,4
4	50,0	50,0	0	50,3 $\pm$ 0,8	51,0 $\pm$ 0,3	- 3,8 $\pm$ 4,5	0,6	2,0	ND
5	0	50,0	50,0	- 0,7 $\pm$ 0,6	55,4 $\pm$ 0,4	57,9 $\pm$ 4,4	ND	10,8	15,8
6	50,0	0	50,0	44,9 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 0,6	60,7 $\pm$ 4,9	- 10,8	ND	21,4
7	50,0	50,0	50,0	54,9 $\pm$ 1,0	45,5 $\pm$ 1,2	59,5 $\pm$ 3,7	9,8	- 9,0	19,0

<sup>†</sup> Erro (%) = 100 (valor BIA-MPA – valor tabelado) / valor tabelado; ND: não determinado



**Figura 56.** (A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas ( $n = 20$ ) de solução contendo simultaneamente TBHQ, BHA e BHT ( $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  cada) no sistema BIA-MPA; (B) respectivas correntes de TBHQ, BHA e BHT. Condições: idem à Figura 53.

Após a verificação da eficácia do sistema BIA-MPA na determinação dos três antioxidantes em amostras simuladas, a possibilidade da determinação simultânea de TBHQ, BHA e BHT em amostras de biodiesel foi verificada. Para isto, sete alíquotas de biodiesel de soja (sem aditivos) foram dopadas com um, ou misturas contendo dois ou três antioxidantes (semelhante às amostras simuladas da Figura 55A), cada antioxidante foi adicionado na concentração de  $30,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Para a injeção no sistema BIA-MPA, as amostras dopadas foram previamente diluídas no eletrólito suporte (HCl + KCl em etanol:água; 30:70 - v/v) para obter uma mistura na mesma composição do eletrólito usado na célula BIA (HCl + KCl em etanol:água; 30:70 - v/v). Entretanto, foi observado que nestas condições, as recuperações calculadas para os três antioxidantes foram inferiores a 50 %. Além disto, logo após a injeção da primeira amostra de biodiesel foi observado o surgimento de uma turbidez do eletrólito da célula BIA. Então, como as recuperações calculadas foram baixas, concluímos que a fase oleosa arrasta uma parte dos antioxidantes ao se separar da fase hidroetanólica. Provavelmente, tal efeito ocorre devido à maior solubilidade destes compostos fenólicos em meio não aquoso.

Logo, este mesmo experimento foi repetido utilizando um eletrólito contendo KCl + HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em meio de etanol e água na proporção 50:50 (v/v). Nestas condições, o eletrólito não ficou turvo no momento das injeções das amostras contendo biodiesel. As curvas analíticas obtidas neste experimento, bem como os LD e LQ são dados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Figuras de mérito obtidas na determinação simultânea de TBHQ, BHA e BHT com eletrólito (KCl + HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) na proporção de 50:50 em etanol/água (v/v).

Curva	Equação da reta de calibração	LD	LQ	R
TBHQ*	$I (\mu\text{A}) = 0,0012 [\text{TBHQ}] (\mu\text{mol L}^{-1}) + 0,0018$	$11,1 \mu\text{mol L}^{-1}$	$36,9 \mu\text{mol L}^{-1}$	0,998
BHA*	$I (\mu\text{A}) = 0,0156 [\text{BHA}] (\mu\text{mol L}^{-1}) + 0,1166$	$0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$	$2,8 \mu\text{mol L}^{-1}$	0,993
BHT*	$i (\mu\text{A}) = 0,0743 [\text{BHT}] (\mu\text{mol L}^{-1}) + 0,0423$	$0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$	$0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$	0,992

\*  $i_{\text{TBHQ}}$ ,  $i_{\text{BHA}}$  e  $i_{\text{BHT}}$  calculadas através das equações 10, 11 e 12, respectivamente.  $FC_1 = 37,2$ ;  $FC_2 = 49,1$ ;  $FC_3 = 3,5$ .

Conforme apresentado (Tabela 11), as sensibilidades para TBHQ e BHA foram inferiores (aproximadamente cinco vezes) em relação às obtidas no experimento

realizado com o eletrólito contendo 30 % de etanol (v/v) (Figura 55). No entanto, a sensibilidade para o BHT foi superior quando comparado ao experimento anterior. Os fatores de correção calculados neste experimento ( $FC_1 = 37,2$ ;  $FC_2 = 49,1$ ;  $FC_3 = 3,5$ ) foram bem diferentes em relação aos calculados anteriormente ( $FC_1 = 8,6$ ;  $FC_2 = 12,4$ ;  $FC_3 = 1,6$ ). Provavelmente, a presença de uma maior quantidade de etanol na mistura do eletrólito provoca um deslocamento dos potenciais de pico. Deste modo, estudos mais conclusivos devem ser realizados nesta nova condição (etanol 50 %).

Apesar do aumento da proporção de etanol alterar significativamente as características do sistema BIA-MPA, as recuperações obtidas para TBHQ e BHA foram próximas a 100 % (Tabela 12). No entanto, para o BHT as recuperações apresentaram valores inferiores a 50 %. Para contornar esta limitação encontrada na determinação do BHT em biodiesel, outras estratégias devem ser avaliadas. Dentre estas, pretende-se estudar outros solventes orgânicos menos polares (acetonitrila, isopropanol, etc.). Além disto, deve ser avaliado outro protocolo de dopagem da amostra de biodiesel, tal como descrito por Domingos *et. al.* [155]. Segundo os autores, os antioxidantes devem ser adicionados na forma sólida em porções de 100 g da amostra original seguida de intensa agitação da mistura, sendo que a soma das concentrações dos três antioxidantes não deve exceder o valor de  $8000 \text{ mg kg}^{-1}$ .

**Tabela 12.** Recuperações obtidas para TBHQ, BHA e BHT em amostras de biodiesel dopadas com estes analitos empregando o sistema BIA-MPA proposto.

Am.	Adicionado ( $\text{mmol L}^{-1}$ )			Recuperado ( $\text{mmol L}^{-1}$ )			Recuperação (%) <sup>*</sup>		
	TBHQ	BHA	BHT	TBHQ	BHA	BHT	TBHQ	BHA	BHT
1	30,0	0	0	$26,6 \pm 0,6$	0	0	88,7	ND	ND
2	0	30,0	0	0	$28,6 \pm 1,9$	0	ND	95,3	ND
3	0	0	30,0	0	0	$10,5 \pm 1,0$	ND	ND	35,0
4	30,0	30,0	0	$34,8 \pm 1,0$	$26,7 \pm 2,7$	0	116,0	89,0	ND
5	0	30,0	30,0	0	$28,4 \pm 4,2$	$11,0 \pm 1,9$	ND	94,7	36,7
6	30,0	0	30,0	$33,2 \pm 1,3$	0	$12,7 \pm 1,8$	110,7	ND	42,3
7	30,0	30,0	30,0	$34,1 \pm 1,2$	$25,0 \pm 3,2$	$13,6 \pm 2,5$	113,7	83,3	45,3

<sup>\*</sup> Recuperação (%) = (concentração obtida por BIA-MPA x 100) / concentração adicionada; ND: não determinado.

# ***CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS***



A presente tese demonstrou a potencialidade das técnicas FIA e BIA acopladas à detecção amperométrica no desenvolvimento de métodos de análise de rotina, com potencialidade de aplicação em distintos setores industriais (alimentício, farmacêutico e de biocombustíveis). De maneira geral, os resultados obtidos com os dois sistemas apresentaram alta frequência analítica, baixo custo relativo e reduzido consumo de reagentes e amostras (consequentemente uma menor geração de resíduos). No entanto, as metodologias desenvolvidas com o sistema BIA apresentaram maior simplicidade e robustez (desnecessidade de tubos, bombas e válvulas), além de fácil adaptação para realizar análises em ambientes fora do laboratório (“on-site analyses”).

Os eletrodos compósitos modificados com azul da Prússia, utilizados no sistema FIA (sensor “3 em 1” montado em ponteira de micropipeta,  $\varnothing = 1,6$  mm) e no sistema BIA (montado em um tubo de poliamida,  $\varnothing = 7,2$  mm), apresentaram sensibilidade adequada para a determinação de peróxido de hidrogênio em antisséptico bucal e em leite UHT desnatado e integral, desde que as amostras sejam diluídas no mínimo dez vezes no eletrólito suporte (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>). Deste modo, as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encontradas nas duas amostras de antisséptico bucal foram bastante próximas ao método padrão (iodometria). Já nas seis amostras de leite testadas não foi detectado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Comparando-se o desempenho dos dois eletrodos modificados, foi verificado que o sensor adaptado ao sistema BIA apresentou maior sensibilidade (maior área do eletrodo de trabalho) e maior estabilidade deste eletrodo compósito, devido à ausência de fluxo deste sistema.

Após avaliar três distintos procedimentos de modificação do compósito fluído condutor preparado em laboratório (grafite / ciclohexanona / adesivo epóxi / AP), foi verificado que quando é utilizado o protocolo onde o grafite modificado com AP é adicionado (até 30 % m/m) na preparação da mistura fluída sob agitação, é possível obter eletrodos com elevada sensibilidade para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, baixa resistência ôhmica e homogeneidade do modificador em todo o corpo do eletrodo. Além disto, estes sensores construídos são robustos e tem a capacidade de rápida regeneração da superfície após polimento em fina lixa (granulação 1200 ou 2000) na presença de água.

O eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) pré-tratado catodicamente apresentou elevada estabilidade e sensibilidade, baixo ruído e reduzidas correntes de

fundo quando comparado ao eletrodo de compósito de grafite (não modificado). Deste modo, este foi adaptado a um sistema BIA empregando a detecção por amperometria de múltiplos pulsos (BIA-MPA) para a determinação simultânea de pares de fármacos em duas formulações farmacêuticas (PA/CA e DI/CA) e de três antioxidantes adicionados em biodiesel (TBHQ/BHA/BHT).

Na determinação simultânea de PA e CA em medicamentos por BIA-MPA foram aplicados os pulsos de potencial de + 1,2 V e +1,55 V (40 ms cada) de forma sequencial no eletrodo de DDB. No primeiro pulso foi possível a detecção somente de PA e no segundo foram detectados ambos PA e CA. Através da subtração da corrente total neste pulso pela corrente de PA em + 1,2 V (e o uso de um fator de correção) foi possível obter a corrente de CA. Os pulsos de potencial foram escolhidos de acordo com os comportamentos eletroquímicos apresentados por estes analitos no eletrodo de BDD em meio de tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Na determinação simultânea de DI e CA a mesma estratégia foi adotada, porém aplicando os pulsos de + 1,1 V e + 1,55 V. Deste modo, as concentrações obtidas de cada fármaco ficaram próximas aos valores indicados na bula dos medicamentos (erros < 10 %).

Para a determinação simultânea de TBHQ, BHA e BHT por BIA-MPA, além do emprego de simples equações matemáticas, foi necessária uma prévia otimização dos pulsos de potencial no eletrodo de BDD em meio de solução hidroetanólica contendo 30 % de etanol em volume (+0,6V/+0,8V/+1,3V, 60 ms cada) e das condições do sistema BIA (volume injetado, velocidade de injeção e de agitação da célula) devido às características apresentadas por este sistema BIA (baixa sensibilidade para TBHQ e baixa precisão para BHA e BHT). Este sistema apresentou uma alta frequência analítica (120 h<sup>-1</sup>), sendo que a cada injeção, três espécies são detectadas simultaneamente, o que até então é inédito empregando um sistema BIA e somente um eletrodo de trabalho. Na amostra de biodiesel foi observado que as recuperações de TBHQ e BHA foram próximas a 100 % em um meio contendo 50 % de etanol no eletrólito. Entretanto, as recuperações de BHT ainda foram baixas (< 50 %) utilizando esta porcentagem de etanol. Futuramente as mudanças promovidas pelo aumento na proporção de etanol no eletrólito (50 % ou mais) devem ser melhor investigadas. Além disto, outros protocolos de dopagem do biodiesel podem ser avaliados.

***REFERÊNCIAS***  
***BIBLIOGRÁFICAS***

- [1] Ruzicka, J., and Hansen, E. H., Flow injection analyses 1. New concept of fast continuous-flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, **1975**, 78, (1), 145-157.
- [2] Wang, J., and Taha, Z., Batch Injection Analysis. *Analytical Chemistry*, **1991**, 63, (10), 1053-1056.
- [3] Brett, C.M.A., and Brett, A. M. O., Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications, 1<sup>a</sup> ed., Oxford, New York, **1993**, p. 427.
- [4] dos Santos, W. T. P., Gimenes, D.T., Richter, E.M., Angnes, L., Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações. *Química Nova*, **2011**, 34, (10), 1753-1761.
- [5] Zoski, C.G., Handbook of Electrochemistry, 1<sup>a</sup> ed., Elsevier, Amsterdam, **2007**, p. 892.
- [6] Cespedes, F., Martinez-Fabregas, E., Alegret, S., New materials for electrochemical sensing - Rigid conducting composites. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **1996**, 15, (7), 296-304.
- [7] Ramirez-Garcia, S., Cespedes, F., Alegret, S., Development of conducting composite materials for electrochemical sensing in organic media. *Electroanalysis*. **2001**, 13, (7), 529-535.
- [8] da Silva, R. A. B., de Almeida, E. G. N., Rabelo, A.C., da Silva, A.T.C., Ferreira, L. F., Richter, E. M., Three Electrode Electrochemical Microfluidic Cell: Construction and Characterization. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2009**, 20, (7), 1235-1241.
- [9] da Silva, R. A. B., Rabelo, A. C., Munoz, R. A. A., Richter, E.M., Three-electrode-integrated sensor into a micropipette Tip. *Electroanalysis*, **2010**, 22, (19), 2167.
- [10] Pereira, A. C., Santos, A. S., Kubota, L. T., Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*. **2002**, 25, (6), 1012-1021.
- [11] Koncki, R., Chemical sensors and biosensors based on Prussian blues. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2002**, 32, (1), 79-96.
- [12] Calatayud, J. M. Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals, 1<sup>a</sup> ed., Taylor & Francis, London, **2003**, p. 394.
- [13] Matos, R. C., Gutz, I. G. R., Angnes, L., Fontenele, R. S., Pedrotti, J. J., Propulsor pneumático versátil e isento de pulsação para sistemas de análise em fluxo. *Química Nova*, **2001**, 24, (6), 795-798.
- [14] dos Santos, W. T. P., Ceolin, M. P., de Albuquerque, Y. D. T., Richter, E. M. Uso da pressão gerada por uma coluna de água para controle da vazão em sistemas de análise por injeção em fluxo. *Química Nova*, **2007**, 30, (7), 1754-1758.
- [15] Beinrohr, E., Tschopel, P., Tolg, G., Nemeth, M., Flow-through anodic-stripping coulometry and anodic-stripping coulometry with collection for the simultaneous absolute determination of Cu, Pb, Cd and Zn. *Analytica Chimica Acta*, **1993**, 273, (1-2), 13-25.
- [16] Hulsman, M., Bos, M., Vander Linden, W. E., Automated injection of slurry samples in flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, **1996**, 324, (1), 13-19.
- [17] Bergamin, H., Zagatto, E. A. G., Krug, F. J., Reis B., F., Merging zones in flow injection analysis - Double proportional injector and reagent consumption. *Analitica Chimica Acta*, **1978**, 101, (1), 17-23.
- [18] Trojanowicz, M., Szewczynska, M., Wcislo, M., Electroanalytical flow measurements - Recent advances. *Electroanalysis*, **2003**, 15, (5-6), 347-365.

- [19] Chailapakul, O., Ngamukot, P., Yoosamran, A., Siangproh, W., Wangfuengkanagul, N. Recent electrochemical and optical sensors in flow-based analysis. *Sensors*, **2006**, 6, (10), 1383-1410.
- [20] Felix, F. S., and Angnes, L., Fast and Accurate Analysis of Drugs Using Amperometry Associated With Flow Injection Analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2010**, 99, (12), 4784-4804.
- [21] Gimenes, D.T., de Freitas, J. M., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., Flow-Injection Amperometric Method for Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis*, **2011**, 23, (11), 2521-2525.
- [22] Gimenes, D. T., dos Santos, W. T. P., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., Internal standard in flow injection analysis with amperometric detection. *Electrochemistry Communications*. **2010**, 12, (2), 216-218.
- [23] Ranger, C. B., Flow-injection analysis - principles techniques applications design. *Analytical Chemistry*, **1981**, 53, (1), 20A-32A.
- [24] Betteridge, D., Flow injection analysis. *Analytical Chemistry*, **1978**, 50, (9), A832-840.
- [25] dos Reis, B. F., Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. *Química Nova*. **1996**, 19, (1), 51-58.
- [26] Castro, M. D. L., and Cases, M. V., Simultaneous determinations in Flow Injection Analysis: A Review. *Analyst*, **1984**, 109, 413-419.
- [27] Trojanowicz, M. Flow injection analysis - Instrumentation and Applications, 1<sup>a</sup> ed., *World Scientific Publishing*, **1999**, p. 480.
- [28] Wang, J., Chen, L., Angnes, L., Tian, B. M., Computerized pipettes with programmable dispensation for batch injection-analysis. *Analytica Chimica Acta*, **1992**, 267, (1), 171-177.
- [29] Brett, C. M. A., Brett, A. M. O., Mitoseriu, L. C., Amperometric and voltammetric detection in batch injection-analysis. *Analytical Chemistry*, **1994**, 66, (19), 3145-3150.
- [30] 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*, **1995**, 7, (3), 225-229.
- [31] Wang, J., Injection-analysis from flow-injection analysis to batch-injection analysis. *Microchemical Journal*, **1992**, 45, (2), 219-224.
- [32] Quintino, M. S. M., and Angnes, L., Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. *Electroanalysis*, **2004**, 16, (7), 513-523.
- [33] Mohammadi, H., El Rhazi, M., Amine, A., Brett, A. M. O., Brett, C. M. A., Determination of mercury(II) by invertase enzyme inhibition coupled with batch injection analysis. *Analyst*, **2002**, 127, (8), 1088-1093.
- [34] Quintino, M. S. M., Araki, K., Toma, H. E., Angnes, L., Batch injection analysis utilizing modified electrodes with tetraruthenated porphyrin films for acetaminophen quantification. *Electroanalysis*, **2002**, 14, (23), 1629-1634.
- [35] Quintino, M., Winnischofer, H., Nakamura, M., Araki, K., Toma, H. E., Angnes, L., Amperometric sensor for glucose based on electrochemically polymerized tetraruthenated nickel-porphyrin. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 539, (1-2), 215-222.
- [36] Quintino, M. S. M., Winnischofer, H., Araki, K., Toma, H. E., Angnes, L., Cobalt oxide/tetraruthenated cobalt-porphyrin composite for hydrogen peroxide amperometric sensors. *Analyst*, **2005**, 130, (2), 221-226.

- [37] Quintino, M. S. M., Araki, K., Toma, H.E., Angnes, L., Amperometric quantification of sodium metabisulfite in pharmaceutical formulations utilizing tetra-ruthenated porphyrin film modified electrodes and batch injection analysis. *Talanta*, **2006**, 68, (4), 1281-1286.
- [38] Quintino, M. S. M., Araki, K., Toma, H. E., Angnes, L., New hydrazine sensors based on electropolymerized meso-tetra (4-sulphonatephenyl)porphyrinate manganese (III)/silver nanomaterial. *Talanta*, **2008**, 74, (4), 730-735.
- [39] Brett, C. M. A., Fungaro, D. A., Morgado, J. M., Gil, M. H., Novel polymer-modified electrodes for batch injection sensors and application to environmental analysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **1999**, 468, (1), 26-33.
- [40] Wang, J., and Chen, L., Small-volume batch-injection analyzer. *Analyst*, **1994**, 119, (6), 1345-1348.
- [41] Sucman, E., and Bednar, J., Determination of chlorides in meat products with ion-selective electrode using the batch injection technique. *Electroanalysis*, **2003**, 15, (10), 866-871.
- [42] Fernandes, J. C. B., Garcia, C. B., Grandin, L. A., Neto, G. D., Godinho, O. E. S. Determination of acetylsalicylic acid in tablets with salicylate ion selective electrode in a batch injection analysis system. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **1998**, 9, (3), 249-251.
- [43] Vlasov, Y. G., Ermolenko, Y. E., Kolodnikov, V. V., Ipatov, A.V., Almarok, S., A mercury sensor for flow-injection and batch-injection analyses. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **1995**, 24, (1-3), 317-319.
- [44] Diamond, D., Lu, J. M., Chen, Q., Wang, J., Multicomponent batch-injection analysis using an array of ion-selective electrodes. *Analytica Chimica Acta*, **1993**, 281, (3), 629-635.
- [45] De Donato, A., Pedrotti, J. J., Gutz, I. G. R., A batch injection analysis system for ascorbic acid determination using amperometric detection on a sessile mercury drop electrode. *Electroanalysis*, **1999**, 11, (15), 1124-1129.
- [46] Quintana, J. C., Idrissi, L., Palleschi, G., Albertano, P., Amine, A., El Rhazi, M., Moscone, D., Investigation of amperometric detection of phosphate Application in seawater and cyanobacterial biofilm samples. *Talanta*, **2004**, 63, (3), 567-574.
- [47] Pacheco, B. D., Valerio, J., Angnes, L., Pedrotti, J. J. Fast batch injection analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using an array of Pt-modified gold microelectrodes obtained from split electronic chips. *Analytica Chimica Acta*, **2011**, 696, (1-2), 53-58.
- [48] Tormin, T. F., Gimenes, D. T., Richter, E. M., Munoz, R. A. A. Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection. *Talanta*, **2011**, 85, (3), 1274-1278.
- [49] Quintino, M. S. M., Corbo, D., Bertotti, M., Angnes, L. Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions. *Talanta*, **2002**, 58, (5), 943-949.
- [50] Quintino, M. S. M., and Angnes, L. BIA-amperometric quantification of salbutamol in pharmaceutical products. *Talanta*, **2004**, 62, (2), 231-236.
- [51] Quintino, M. S. M., and Angnes, L. Fast BIA-amperometric determination of isoniazid in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 42, (3), 400-404.
- [52] Brett, C. M. A., Morgado, J. M., Development of batch injection analysis for electrochemical measurements of trace metal ions in ecotoxicological test media. *Journal of Applied Toxicology*, **2000**, 20, (6), 477-481.

- [53] Brett, C. M. A., Fungaro, D. A., Modified electrode voltammetric sensors for trace metals in environmental samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2000**, 11, (3), 298-303.
- [54] Fungaro, D. A., and Brett, C. M. A., Eletrodos modificados com polímeros perfluorados e sulfonados: aplicações em análises ambientais. *Química Nova*, **2000**, 23, (6), 805-811.
- [55] Economou, A., and Voulgaropoulos, A., Stripping Voltammetry of Trace Metals at Bismuth-Film Electrodes by Batch-Injection Analysis. *Electroanalysis*. **2011**, 22, (13), 1468-1475.
- [56] de Donato, A., and Gutz, I. G. R., Fast mapping of gunshot residues by batch injection analysis with anodic stripping voltammetry of lead at the hanging mercury drop electrode. *Electroanalysis*. **2005**, 17, (2), 105-112.
- [57] Backofen, U., Hoffmann, W., Matysik, F. M., Capillary batch injection analysis: a novel approach for analyzing nanoliter samples. *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 362, (2-3), 213-220.
- [58] Backofen, U., Matysik, F. M., Hoffmann, W., Ache, H. J. Capillary batch injection analysis and capillary flow injection analysis with electrochemical detection: a comparative study of both methods. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **1998**, 362, (2), 189-193.
- [59] Quintino, M. S. M., Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas. Instituto de Química, São Paulo, USP, **2003**, p. 115.
- [60] Nossol, E., and Zarbin, A. J. G., Carbon paste electrodes made from novel carbonaceous materials: Preparation and electrochemical characterization. *Electrochimica Acta*, **2008**, 54, 582-589.
- [61] Albertus, F., Llerena, A., Alpizar, J., Cerda, V., Luque, M., Rios, A., Valcarcel, M. A., PVC-graphite composite electrode for electroanalytical use: Preparation and some applications. *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 355, (1), 23-32.
- [62] Aguilar, R., Davila, M. M., Elizalde, M. P., Mattusch, J., Wennrich, R., Capability of a carbon-polyvinylchloride composite electrode for the detection of dopamine, ascorbic acid and uric acid. *Electrochimica Acta*, **2004**, 49, (6), 851-859.
- [63] Klatt, L. N., Connell, D. R., Adams, R. E., Honigberg, I. L., Price, J. C. Voltammetric characterization of a graphite-teflon electrode. *Analytical Chemistry*, **1975**, 47, (14), 2470-2472.
- [64] Pena, N., Ruiz, G., Reviejo, A. J., Pingarron, J. M., Graphite-teflon composite bienzyme electrodes for the determination of cholesterol in reversed micelles: Application to food samples. *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, (6), 1190-1195.
- [65] Armentrout, D. N., McLean, J. D., Long, M. W., Trace determination of phenolic-compounds in water by reversed phase liquid-chromatography with electrochemical detection using a carbon-polyethylene tubular anode. *Analytical Chemistry*, **1979**, 51, (7), 1039-1045.
- [66] Park, J., and Shaw, B. R., Electrochemical performance of cross-linked poly(styrene)-co-poly(vinylpyridine) composite electrodes containing carbon-black. *Analytical Chemistry*, **1989**, 61, (8), 848-852.
- [67] Barroso-Fernandez, B., Lee-Alvarez, M. T., Seliskar, C. J., Heineman, W.R., Electrochemical behavior of methyl viologen at graphite electrodes modified with Nafion sol-gel composite. *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 370, (2-3), 221-230.
- [68] Barsan, M. M., Pinto, E. M., Florescu, M., Brett, C. M. A., Development and characterization of a new conducting carbon composite electrode. *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 635, (1), 71-78.

- [69] Wring, S. A., Hart, J. P., Bracey, L., Birch, B. J. Development of screen-printed carbon electrodes chemically modified with cobalt phthalocyanine for electrochemical sensor applications. *Analytica Chimica Acta*, **1990**, 231, (2), 203-212.
- [70] de Oliveira, A. C., dos Santos, S. X., Cavalheiro, E. T. G., Graphite-silicone rubber composite electrode: Preparation and possibilities of analytical application. *Talanta*, **2008**, 74 (4), 1043-1049.
- [71] dos Santos, S. X., Mazo, L. H., Cavalheiro, E. T. G., The Use of a Graphite-Silicone Rubber Composite Electrode in the Determination of Rutin in Pharmaceutical Formulation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2008**, 19, (8), 1600-1606.
- [72] Ramirez-Garcia, S., Alegret, S., Cespedes, F., Forster, R. J., Carbon composite microelectrodes: Charge percolation and electroanalytical performance. *Analytical Chemistry*, **2004**, 76, (3), 503-512.
- [73] Moreno-Baron, L., Merkoci, A., Alegret, S., Graphite-epoxy composite as an alternative material to design mercury free working electrodes for stripping voltammetry. *Electrochimica Acta*, **2003**, 48, (18), 2599-2605.
- [74] Calixto, C. M. F., Cervini, P., Cavalheiro, E. T. G., Eletrodo compósito à base de graphite-araldite®: aplicações didáticas. *Química Nova*, **2008**, 31, (8), 2194-2198.
- [75] Nascimento, V. B., and Angnes, L., Eletrodos fabricados por "silk-screen". *Química Nova*, **1998**, 21, (5), 614-629.
- [76] da Silva, R. A. B., Rabelo, A. C., Bottecchia, O. L., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., Desenvolvimento, caracterização e aplicação eletroanalítica de um compósito fluido de adesivo epóxi, grafite e ciclo-hexanona. *Química Nova*, **2010**, 33, (6), 1398-1402.
- [77] Pumera, M., Merkoci, A., Alegret, S., Microchip capillary electrophoresis-electrochemistry with rigid graphite-epoxy composite detector. *Electroanalysis*, **2006**, 18, (2), 207-210.
- [78] Kirgoz, U. A., Marin, S., Pumera, M., Merkoci, A., Alegret, S., Stripping voltammetry with bismuth modified graphite-epoxy composite electrodes. *Electroanalysis*, **2005**, 17, (10), 881-886.
- [79] Kirgoz, U. A., Odaci, D., Timur, S., Merkoci, A., Alegret, S., Besun, N., Telefoncu, A., A biosensor based on graphite epoxy composite electrode for aspartame and ethanol detection. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 570, (2), 165-169.
- [80] Pividori, M. I., Lermo, A., Bonanni, A., Alegret, S., del Valle, M., Electrochemical immunosensor for the diagnosis of celiac disease. *Analytical Biochemistry*, **2009**, 388, (2), 229-234.
- [81] Pividori, M. I., Merkoci, A., Alegret, S., Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing. *Biosensors and bioelectronics*, **2003**, 19, (5), 473-484.
- [82] Cetó, X., Gutiérrez, J. M., Moreno-Baron, L., Alegret, S., Del Valle, M., Voltammetric Electronic Tongue in the Analysis of Cava Wines. *Electroanalysis*, **2011**, 23, (1), 72-78.
- [83] Calixto, C. M. F., Desenvolvimento e aplicação de eletrodos compósitos a base de grafite e Araldite®. Instituto de Química, São Carlos, UFSCar, **2008**, p. 90.
- [84] de Oliveira, A. C., Desenvolvimento e aplicação de eletrodos compósitos à base de borracha de silicone e grafite. Instituto de Química, São Carlos, UFSCar, **2004**, p. 89.



- [85] de Mattos, I. L., and Gorton, L., Metal-hexacyanoferrate films: A tool in analytical chemistry. *Química Nova*, **2001**, 24, (2), 200-205.
- [86] Ellis, D., Eckhoff, M., Neff, V. D., Electrochromism in the mixed-valence hexacyanides. 1. Voltammetric and spectral studies of the oxidation and reduction of thin films of Prussian blue. *Journal of Physical Chemistry*, **1981**, 85, (9), 1225-1231.
- [87] Itaya, K., Ataka, T., Toshima, S., Spectroelectrochemistry and electrochemical preparation method of Prussian blue modified electrodes. *Journal of American Chemical Society*, **1982**, 104, (18), 4767-4772.
- [88] Garcia-Jareno, J. J., Sanmatias, A., Navarro-Laboulais, J., Vicente, F., The role of potassium and hydrogen ions in the Prussian Blue–Everitt's salt process. *Electrochimica Acta*, **1998**, 44, 395-405.
- [89] Itaya, K., Shoji, N., Uchida, I., Catalysis of the reduction of molecular-oxygen to water at Prussian blue modified electrodes. *Journal of American Chemical Society*, **1984**, 106, (12), 3423-3429.
- [90] Karyakin, A. A., Karyakina, E. E., Gorton, L., The electrocatalytic activity of Prussian blue in hydrogen peroxide reduction studied using a wall-jet electrode with continuous flow. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1998**, 456, (1-2), 97-104.
- [91] Karyakin, A. A., and Karyakina, E. E., Prussian Blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide detection: Application to biosensors. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **1999**, 57, (1-3), 268-273.
- [92] de Mattos, I. L., Gorton, L., Ruzgas, T., Karyakin, A. A., Sensor for hydrogen peroxide based on Prussian Blue modified electrode: Improvement of the operational stability. *Analytical Sciences*, **2000**, 16, (8), 795-798.
- [93] Paixao, T., and Bertotti, M., Fabrication of disposable voltammetric electronic tongues by using Prussian Blue films electrodeposited onto CD-R gold surfaces and recognition of milk adulteration. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2009**, 137, (1), 266-273.
- [94] Moscone, D., D'Ottavi, D., Compagnone, D., Palleschi, G., Amine, A. Construction and analytical characterization of Prussian Blue-based carbon paste electrodes and their assembly as oxidase enzyme sensors. *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, (11), 2529-2535.
- [95] O'Halloran, M. P., Pravda, M., Guilbault, G. G., Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection and for biosensors. *Talanta*, **2001**, 55, (3), 605-611.
- [96] Ricci, F., and Palleschi, G., Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosensors & Bioelectronics*, **2005**, 21, (3), 389-407.
- [97] Gaitan, M., Goncales, V. R., Soler-Illia, G., Barald, L. M., de Torresi, S. I. C., Structure effects of self-assembled Prussian blue confined in highly organized mesoporous TiO<sub>2</sub> on the electrocatalytic properties towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection. *Biosensors & Bioelectronics*, **2011**, 26, (2), 890-893.
- [98] Li, J., Yao, Y. L., Shiu, K. K., Layer-by-layer Assembly of Prussian Blue and Carbon Nanotube Composites with Poly(diallyldimethylammonium chloride) for the Sensitive Detection of Hydrogen Peroxide. *Analytical Sciences*, **2010**, 26, (4), 431-435.
- [99] de Barros, R. D. M., Ribeiro, M. C., An-Sumodjo, P. T., Juliao, M. S. D., Serrano, S. H. P., Ferreira, N. G., Boron-doped CVD diamond films. Part 1. History, production and characterization. *Química Nova*, **2005**, 28, (2), 317-325.

- [100] Poferl, D. J., Gardner, N. C., Angus, J. C., Growth of boron-doped diamond seed crystals by vapor-deposition. *Journal of Applied Physics*, **1973**, 44, (4), 1428-1434.
- [101] Luong, J. H. T., Male, K. B., Glennon, J. D., Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. *Analyst*, **2009**, 134, (11), 1965 - 1979.
- [102] Angus, J. C., Synthetic diamond: emerging CVD science and technology, 1<sup>st</sup> ed., John Wiley & Sons, New York, **1994**, p. 18.
- [103] Popa, E., Notsu, H., Miwa, T., Tryk, D. A., Fujishima, A., Selective electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at anodized diamond thin film electrodes. *Electrochemical Solid State Letters*, **1999**, 2, (1), 49-51.
- [104] Gandini, D., Michaud, P. A., Duo, I., Mahe, E., Haenni, W., Perret, A., Comninellis, C., Electrochemical behavior of synthetic boron-doped diamond thin film anodes. *New Diamond Frontiers Carbon Technologies*, **1999**, 9, (5), 303-316.
- [105] Suffredini, H. B., Pedrosa, V. A., Codognoto, L., Machado, S. A. S., Rocha, R. C., Avaca, L. A., Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. *Electrochimica Acta*, **2004**, 49, (22-23), 4021-4026.
- [106] Medeiros, R. A., Rocha, R. C., Fatibello, O., Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. *Food Chemistry*, **2010**, 123, (3), 886-891.
- [107] Swain, G. M., and Ramesham, R., The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes. *Analytical Chemistry*, **1993**, 65, (4), 345-351.
- [108] Khoshayand, M. R., Abdollahi, H., Shariatpanahi, M., Saadatfard, A., Mohammadi, A., Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by chemometric methods. *Spectrochimica Acta*, **2008**, 70, (3), 491-499.
- [109] Elkady, E. F. Simultaneous spectrophotometric determination of diclofenac potassium and methocarbamol in binary mixture using chemometric techniques and artificial neural networks. *Drug Test and Analysis*, **2010**, 3, (4), 228-233.
- [110] Khoshayand, M. R., Abdollahi, H., Ghaffari, A., Shariatpanahi, M., Farzanegan, H., Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceuticals using chemometric approaches. *Daru*, **2010**, 18, (4), 292-297.
- [111] Khoshayand, M. R., Abdollahi, H., Moeini, A., Shamsaie, A., Ghaffari, A., Abbasian, S., Simultaneous spectrophotometric determination of chlordiazepoxide and clidinium using multivariate calibration techniques. *Drug Test and Analysis*, **2010**, 2, (9), 430-435.
- [112] Awad, M. I., Oritani, T., Ohsaka, T., Simultaneous potentiometric determination of peracetic acid and hydrogen peroxide. *Analytical Chemistry*, **2003**, 75, (11), 2688-2693.
- [113] Sanchez-Moreno, R. A., Gismera, M. J., Sevilla, M. T., Procopio, J. R., Potentiometric Screen-Printed Bisensor for Simultaneous Determination of Chromium(III) and Chromium(VI). *Electroanalysis*, **2011**, 23, (1), 287-294.
- [114] Lourencao, B. C., Medeiros, R. A., Rocha, R. C., Fatibello, O., Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Caffeine in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis*, **2010**, 22, (15), 1717-1723.

- [115] Zen, J. M., and Ting, Y. S., Simultaneous determination of caffeine and acetaminophen in drug formulations by square-wave voltammetry using a chemically modified electrode. *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 342, (2-3), 175-180.
- [116] Lourencao, B. C., Medeiros, R. A., Rocha, R. C., Mazo, L. H., Fatibello, O., Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*, **2009**, 78, (3), 748-752.
- [117] 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*, **2011**, 23, (2), 417-423.
- [118] 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*, **2011**, 655, (2), 97-102.
- [119] Medeiros, R. A., Rocha, R. C., Fatibello, O., Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. *Food Chemistry*, **2010**, 123, (3), 886-891.
- [120] Guo, Q. H., Huang, J. S., Chen, P. Q., Liu, Y., Hou, H. Q., You, T. Y., Simultaneous determination of catechol and hydroquinone using electrospun carbon nanofibers modified electrode. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2012**, 163, (1), 179-185.
- [121] Qi, H. L., and Zhang, C.X., Simultaneous determination of hydroquinone and catechol at a glassy carbon electrode modified with multiwall carbon nanotubes. *Electroanalysis*, **2005**, 17, (10), 832-838.
- [122] Sartori, E. R., and Fatibello, O., Simultaneous Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Sulfite in Beverages Employing a Glassy Carbon Electrode Modified with Carbon Nanotubes within a Poly(Allylamine Hydrochloride) Film. *Electroanalysis*, **2012**, 24, (3), 627-634.
- [123] Vasantha, V. S., and Chen, S. M., Electrocatalysis and simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid using poly(3,4-ethylenedioxy)thiophene film modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2006**, 592, (1), 77-87.
- [124] Trojanowicz, M., Matuszewski, W., Szostek, B., Michalowski, J., Simultaneous determination of nitrite and nitrate in water using flow-injection biamperometry. *Analytica Chimica Acta*, **1992**, 261, (1-2), 391-398.
- [125] Surareungchai, W., Deepunya, W., Tasakorn, P., Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose. *Analytica Chimica Acta*, **2001**, (448), 215.
- [126] dos Santos, W. T. P., de Almeida, E. G. N., Ferreira, H. E. A., Gimenes, D. T., Richter, E. M., Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection. *Electroanalysis*, **2008**, 20, (17), 1878-1883.
- [127] dos Santos, W. T. P., Gimenes, D.T., de Almeida, E. G. N., Eiras, S. P., Albuquerque, Y. D. T., Richter, E. M., Simple Flow Injection Amperometric System for Simultaneous Determination of Dipyrone and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2009**, 20, (7), 1249-1255.
- [128] Medeiros, R. A., Lourencao, B. C., Rocha, R. C., Fatibello, O., Simple Flow Injection Analysis System for Simultaneous Determination of Phenolic Antioxidants with Multiple Pulse Amperometric Detection at a Boron-Doped Diamond Electrode. *Analytical Chemistry*, **2010**, 82, (20), 8658-8663.

- [129] da Silva, W. C., Pereira, P. F., Marra, M. C., Gimenes, D. T., Cunha, R. R., da Silva, R. A. B., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., A simple strategy for simultaneous determination of paracetamol and caffeine using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection. *Electroanalysis*, **2011**, 23, (11), 2764-2770.
- [130] Miranda, J. A. T., Cunha, R. R., Gimenes, D. T., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., Determinação simultânea de ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica pulsada. *Química Nova* (aceito para publicação).
- [131] Manea, F., Remes, A., Radovan, C., Pode, R., Picken, S., Schoonman, J., Simultaneous electrochemical determination of nitrate and nitrite in aqueous solution using Ag-doped zeolite-expanded graphite-epoxy electrode. *Talanta*, **2010**, 83, (1), 66-71.
- [132] Trojanowicz, M., Recent developments in electrochemical flow detections-A review Part I. Flow analysis and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 653, (1), 36-58.
- [133] Trojanowicz, M., Recent developments in electrochemical flow detections-A review Part II. Liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **2011**, 688, (1), 8-35.
- [134] Ricci, F., Amine, A., Moscone, D., Palleschi, G., Prussian blue modified carbon nanotube paste electrodes: A comparative study and a biochemical application. *Analytical Letters*. **2003**, 36, (9), 1921-1938.
- [135] Ricci, F., Amine, A., Tuta, C. S., Ciucu, A. A., Lucarelli, F., Palleschi, G., Moscone, D., Prussian Blue and enzyme bulk-modified screen-printed electrodes for hydrogen peroxide and glucose determination with improved storage and operational stability. *Analytica Chimica Acta*, **2003**, 485, (1), 111-120.
- [136] Karyakin, A. A., Karyakina, E. E., Gorton, L. Prussian-Blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis. *Talanta*, **1996**, 43, 1597-1606.
- [137] Ping, J. F., Mao, X. L., Fan, K., Li, D. Y., Ru, S. P., Wu, J. A., Ying, Y. B., A Prussian blue-based amperometric sensor for the determination of hydrogen peroxide residues in milk. *Ionics*, **2011**, 16, (6), 523-527.
- [138] de Mattos, I. L., Shiraishi, K. A., Braz, A. D., Fernandes, J. R. Peróxido de hidrogênio: Importância e determinação. *Química Nova*, **2003**, 26, (3), 373-380.
- [139] Lück, H., The use of hydrogen peroxide in milk and dairy products. *German Research Institute for food chemistry*, **1957**, Munique, p. 50.
- [140] ANVISA, [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/34\\_311007.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/34_311007.htm), acessado em 05/08/2011.
- [141] Anderson, B. J., Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Paediatric anaesthesia*, **2008**, 18, (10), 915-921.
- [142] Bosch, M. E., Sanchez, A. J. R., Rojas, F. S., Ojeda, C. B., Determination of paracetamol: Historical evolution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 42, (3), 291-321.
- [143] Ergun, H., Frattarelli, D. A. C., Aranda, J. V., Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyrone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2004**, 35, (3), 479-487.
- [144] Stammschulte, T., Remy, U. G., Metamizole (Dipyrone) and Agranulocytosis in Germany: Long-Term Consequences of a Regulatory Measure in 1986. *Drug Safety*, **1986**, 34, (10), 1012-1012.
- [145] Conte, E. D., Barry, E. F., Gas-chromatographic determination of caffeine in beverages by alkali aerosol flame ionization detection. *Microchemical Journal*, **1993**, 48, (3), 372-376.

- [146] Palmer, H., Graham, G., Williams, K., Day, R., A Risk-Benefit Assessment of Paracetamol (Acetaminophen) Combined with Caffeine. *Pain Medicine*, **2010**, 11, (6), 951-965.
- [147] <http://consultaremedios.com.br>, acessado em 15/12/11.
- [148] Haughey, D. B., Greenberg, R., Schaal, S. F., Lima, J. J., Liquid-chromatographic determination of caffeine in biologic fluids. *Journal of Chromatography*, **1982**, 229,(2),387-395.
- [149] <http://www.chemicalize.org>, acessado em 12/01/12.
- [150] dos Santos, W. T. P., Desenvolvimento de metodologias de análises em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos. Tese de doutorado. Instituto de Química, Uberlândia, UFU, **2009**, p. 126.
- [151] Ramalho, V. C., and Jorge, N., Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. *Química Nova*, **2006**, 29, (4), 755-760.
- [152] Chaithongdee, D., Chutmanop, J., Srinophakun, P., Effect of Antioxidants and Additives on the Oxidation Stability of Jatropha Biodiesel. *Kasetsart journal: natural science*, **2010**, 44, 243-250.
- [153] Lobo, I. P., Ferreira, S. L. C., da Cruz, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, **2009**, 32, (6), 1596-1608.
- [154] Os antioxidantes. *Food Ingredients Brasil*. **2009**, 6, disponível em <http://www.revista-fi.com>, acessado em 20/11/2011.
- [155] Domingos, A. K., Saad, E. B., Vechiatto, W. W. D., Wilhelm, H. M., Ramos, L. P. The influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (biodiesel). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2007**, 18, (2), 416-423.
- [156] Tang, H. Y., Wang, A. F., Salley, S. O., Ng, K. Y. S., The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. *Journal of American Oil Chemical Society*, **2008**, 85, (4), 373-382.
- [157] Maia, E. C. R., Borsato, D., Moreira, I., Spacino, K. R., Rodrigues, P. R. P., Gallina, A. L. Study of the biodiesel B100 oxidative stability in mixture with antioxidants. *Fuel Process Technology*, **2011**, 92, (9), 1750-1755.
- [158] ANVISA, <http://www.anvisa.gov.br>, acessado em 15/12/11.
- [159] Takemoto, E., Teixeira, J., Godoy, H. T., Validação da metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. *Química Nova*, **2009**, 32, (5), 1189-1194.
- [160] Tormin, T. F., Gimenes, D. T., Silva, L. G., Ruggiero, R., Richter, E. M., Ferreira, V. S., Munoz, R. A. A., Direct amperometric determination of tert-butylhydroquinone in biodiesel. *Talanta*, **2010**, 82, (4), 1599-1603.
- [161] de Araujo, T. A., Barbosa, A. M. J., Viana, L. H., Ferreira, V. S. Electroanalytical determination of TBHQ, a synthetic antioxidant, in soybean biodiesel samples. *Fuel*, **2011**, 90, (2), 707-712.
- [162] Pedrotti, J. J., Angnes, L., Gutz, I. G. R., Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. *Electroanalysis*, **1996**, 8, (7), 673-675.
- [163] da Silva, R. A. B., Construção e caracterização de micro-células voltamétricas para análises em volumes reduzidos. Dissertação de mestrado. Instituto de Química. Uberlândia, UFU, **2009**, p. 65.

- [164] Baccan, N., de Andrade, J. C., Godinho, O. E. S., Barone, J. S., Química analítica quantitativa elementar, Edgard Blücher, São Paulo, **1979**, p. 246.
- [165] Ricci, F., Goncalves, C., Amine, A., Gorton, L., Palleschi, G., Moscone, D. Electroanalytical study of Prussian Blue modified glassy carbon paste electrodes. *Electroanalysis*, **2003**, 15, (14), 1204-1211.
- [166] Bard, A.J., and Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods*, 1<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, New York, **1980**, p. 391.
- [167] Itaya, K., Akahoshi, H., Toshima, S., Electrochemistry of Prussian Blue modified electrodes - an electrochemical preparation method. *Journal of Electrochemical Society*, **1982**, 129, (7), 1498-1500.
- [168] Stilwell, D., Park, K. H., Miles, M. H., Electrochemical studies of the factors influencing the cycle stability of Prussian Blue films. *Journal of Applied Electrochemistry*. **1992**, (22), 325-331.
- [169] Karyakin, A. A., and Chaplin, M., Polypyrrole Prussian Blue films with controlled level of doping: codeposition of polypyrrole and Prussian Blue. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1994**; 56, 85-92.
- [170] Wu, S., Liu, J., Bai, X., Tan, W., Stability Improvement of Prussian Blue by a Protective Cellulose Acetate Membrane for Hydrogen Peroxide Sensing in Neutral Media. *Electroanalysis*, **2010**; 22, (16), 1906–1910.
- [171] Karyakin, A. A., and Karyakina, E. E., Gorton, L., On the mechanism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduction at Prussian Blue modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, **1999**, 1, (2), 78-82.
- [172] Gimenes, D. T., dos Santos, W. T. P., Tormin, T. F., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., Flow-Injection Amperometric Method for Indirect Determination of Dopamine in the Presence of a Large Excess of Ascorbic Acid. *Electroanalysis*, **2010**, 22, (1), 74-78.
- [173] Miner, D. J., Rice, J. R., Riggin, R. M., Kissinger, P. T., Voltammetry of acetaminophen and its metabolites. *Analytical Chemistry*, **1981**, 53, (14), 2258-2263.
- [174] Hansen, B. H., and Dryhurst, G., Electrochemical oxidation of theobromine and caffeine at pyrolytic graphite electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1971**, 30, (3), 407-415.
- [175] da Silva, W. C., Determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica. Dissertação de mestrado. Instituto de Química, Uberlândia, UFU, **2011**, p. 74.
- [176] Teixeira, M. F. S., Marcolino-Junior, L. H., Fatibello, O., Dockal, E. R., Cavalheiro, E. T. G., Voltammetric determination of dipyrone using a N,N'-ethylenebis (salicylideneaminato) oxovanadium(IV) modified carbon-paste electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2004**, 15, (6), 803-808.
- [177] Ceballos, C. D., Zon, M. A., Fernandez, H. Using square wave voltammetry on ultramicroelectrodes to determine synthetic antioxidants in vegetable oils. *Journal of Chemistry Education*, **2006**, 83, (9), 1349-1352.
- [178] de la Fuente, C., Acuna, J. A., Vazquez, M. D., Tascon, M. L., Batanero, P. S., Voltammetric determination of the phenolic antioxidants 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole and tert-butylhydroquinone at a polypyrrole electrode modified with a nickel phthalocyanine complex. *Talanta*, **1999**, 49, (2), 441-452.
- [179] Eiras, S. P., Coscione, A. R., Custodio, R., de Andrade, J. C. Métodos de otimização em química. *Chemkeys*, **1999**, disponível em <http://chemkeys.com/br/2000/03/18/metodos-de-otimizacao-em-quimica>, acessado em 15/01/2012.