

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

*Uso do método do padrão interno em sistemas FIA e BIA e
determinação de diclofenaco e codeína em formulações farmacêuticas
por amperometria de múltiplos pulsos*

DENISE TOFANELLO GIMENES

Uberlândia
Julho / 2013



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química - Doutorado

***Uso do método do padrão interno em sistemas FIA e BIA e
determinação de diclofenaco e codeína em formulações farmacêuticas
por amperometria de múltiplos pulsos***

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

Doutoranda: Denise Tofanello Gimenes

Orientador: Eduardo Mathias Richter

Co-orientador: Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

Área de concentração: Química Analítica

Uberlândia – MG

Julho / 2013



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 24/COPGQ.**

DATA: 25/07/2013

DISCENTE: Denise Tofanello Gimenes

MATRÍCULA: 10923QMI001

TÍTULO DO TRABALHO: Uso do método do padrão interno em sistemas FIA e BIA e determinação de diclofenaco e codeína em formulações farmacêuticas por amperometria de múltiplos pulsos.

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.

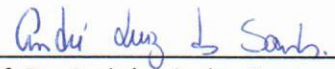
Às treze horas e trinta minutos do dia vinte e cinco de julho do ano dois mil e treze, no Auditório C do Bloco 50, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Jairo José Pedrotti, da Universidade Presbiteriana Mackenzie e Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, da Universidade Estadual Paulista; André Luiz dos Santos da Faculdade de Ciências Integradas do Pontal/UFU e João Marcos Madurro, do Instituto de Química da UFU e Eduardo Mathias Richter, professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 02/2010/COPGQ. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e a provou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido

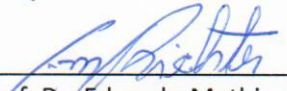
Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 15 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Jairo José Pedrotti – Mackenzie


Prof. Dr. M^a Del Pilar T. Sotomayor – UNESP


Prof. Dr. João Marcos Madurro – IQUFU


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


Orientador : Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter – IQUFU

Dedico este Trabalho,

Aos dois homens da minha vida:

Joel, exemplo de marido, pai e companheiro,

Gabriel, um anjo que Deus me enviou na forma de filho, que mesmo pequenino já me ensinou o valor da vida e a grandiosidade da palavra “mãe”.

E também aos meus pais, pois sem eles eu nada seria.

Amo muito vocês!

Agradecimentos

- *A Deus por me ajudar nesta conquista, por me dar forças nos momentos de desânimo, por me guiar e permitir que eu convivesse com pessoas tão importantes durante esta jornada.*
- *À toda minha família, que se entende à família do meu marido, que são o suporte da minha vida, apoio e compreensão. Terão sempre a minha admiração e carinho.*
- *Ao meu orientador prof. Dr. Eduardo Mathias Richter, pela orientação, paciência, ensinamentos, amizade, confiança, incentivo, respeito e principalmente compreensão. Seu exemplo de pessoa e orientador serve de aprendizado e deveria ser seguido por seus alunos.*
- *Ao meu co-orientador prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Munoz, pelo apoio dado a este trabalho e pelos ensinamentos.*
- *Aos amigos do Laboratório de Pesquisa, pela amizade e momentos de descontração, discussão e ajuda: Polyana, Mariana, Aninha, Thiago, Florence, Rodrigo Amorim, Rafael, Rodrigo Montes, Tatielli, Jhonys e Joyce. Ao Wallans que sempre me ajudou nesta conquista. E a todos os outros que não estão aqui citados, mas que merecem meu agradecimento. Desejo a todos felicidades e que o sucesso seja parte integrante na vida pessoal e profissional de vocês.*
- *Aos amigos que não fazem parte do grupo de pesquisa, mas que mesmo distante sempre torceram por mim.*
- *Aos professores do programa de pós graduação que contribuíram para minha formação.*
- *Aos técnicos e secretarias da graduação e da pós graduação, que sempre prontamente me ajudou.*
- *À CAPES e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.*
- *Ao Instituto de Química (IQ-UFU) pelo espaço concedido e pela oportunidade de desenvolver este trabalho, em especial ao laboratório multiusuário que permitiu a realização dos testes de HPLC.*

Obrigada!

ÍNDICE

Resumo	i
Abstract	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	xi
Abreviaturas, siglas e símbolos	xii
Trabalhos realizados	xiv
Introdução e Objetivos do trabalho.....	1
1.1. Considerações gerais	2
1.2. Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD).....	5
1.3. Análise por Injeção em Fluxo (FIA)	8
1.4. Análise por Injeção em Batelada (BIA)	14
1.5. Método do Padrão Interno (PI).....	20
1.6. Diclofenaco (DCF)	24
1.6.1. Métodos analíticos para determinação de DCF.....	25
1.7. Codeína (CO).....	28
1.7.1. Métodos analíticos para determinação de CO	31
1.8. Objetivos do trabalho	35
Parte Experimental	36
2.1. Instrumentação	37
2.1.1. Detecção Eletroquímica.....	37
2.1.1.1. Eletrodos de trabalho	37
2.1.1.2. Eletrodo de Referência	38
2.1.1.3. Eletrodo Auxiliar	38
2.1.1.4. Célula Eletroquímica para medidas estacionárias	39
2.1.1.5. Sistema FIA	39
2.1.1.6. Sistema BIA.....	43
2.1.2. Análises cromatográficas.....	45
2.2. Soluções, reagentes e preparação das amostras.....	45
Resultados e Discussão.....	48

3.1.	Considerações Gerais	49
3.2.	Parte I - Introdução do método do padrão interno em sistemas FIA ou BIA com detecção MPA.....	49
3.2.1.	Método do padrão Interno (PI) em sistema FIA-MPA.....	49
3.2.1.1.	Comportamento eletroquímico do AU e do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	49
3.2.1.2.	Investigação para identificação dos pulsos de potenciais a serem usados em FIA-MPA para uso do método do PI.....	51
3.2.1.3.	Análise da eficiência do PI em sistemas FIA com detecção amperométrica	53
3.2.1.3.1.	Estabilidade do sistema FIA na presença de problemas de contaminação ou passivação do eletrodo.....	53
3.2.1.3.2.	Variação na vazão da solução carregadora.....	57
3.2.1.3.3.	Variação do volume injetado no sistema FIA	59
3.2.1.3.4.	Variação na força iônica da solução amostra	60
3.2.1.3.5.	Formação ou inserção acidental de bolhas no sistema em fluxo.....	62
3.2.1.3.6.	Curva de calibração usando o método do PI	63
3.2.1.4.	Conclusões parciais – PI em sistemas FIA com detecção amperométrica .	65
3.2.2.	Aplicação do método do PI em sistema BIA-MPA.....	66
3.2.2.1.	Estudos para identificação de um PI	66
3.2.2.2.	Estudo da influência de alguns parâmetros no desempenho do sistema BIA	72
3.2.2.3.	Estudos de repetibilidade do método.....	76
3.2.2.4.	Curvas de calibração utilizando o método do PI.....	78
3.2.2.5.	Conclusões parciais – PI em sistemas BIA com detecção amperométrica	82
3.3.	Parte II – Determinação de DCF e análise simultânea de DCF e CO	83
3.3.1.	Determinação de DCF (DCF).....	83
3.3.1.1.	Comportamento eletroquímico do DCF em diferentes eletrodos.....	83
3.3.1.2.	Estabilidade de resposta para a oxidação de DCF em diferentes eletrólitos.....	89
3.3.1.3.	Otimizações de parâmetros do sistema FIA	90
3.3.1.4.	Precisão do método proposto.....	92
3.3.1.5.	Determinação de DCF em amostras farmacêuticas.....	93
3.3.1.6.	Determinação de DCF usando BIA e o método do padrão interno	96
3.3.1.7.	Conclusões parciais – determinação de DCF	99

3.3.2.	Determinação de DCF e CO	99
3.3.2.1.	Comportamento eletroquímico do DCF e CO	99
3.3.2.2.	Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de DCF e CO.....	102
3.3.2.3.	Influência da agitação mecânica no sistema BIA-MPA.....	104
3.3.2.4.	Estudo do <i>FC</i>	105
3.3.2.5.	Estudo de repetibilidade do método	108
3.3.2.6.	Aplicações do sistema BIA-MPA na análise de formulações farmacêuticas.....	111
3.3.2.7.	Aplicação do método do padrão interno na determinação simultânea de DCF e CO.....	114
3.3.2.8.	Conclusões parciais – determinação simultânea de DCF e CO	117

Conclusões e Perspectivas..... 118

Referências Bibliográficas 121

RESUMO

Gimenes, Denise Tofanello. Uso do método do padrão interno em sistemas FIA e BIA e determinação de diclofenaco e codeína em formulações farmacêuticas por amperometria de múltiplos pulsos. Tese de doutorado. Instituto de Química, UFU. Uberlândia, julho de 2013.

Esta tese apresenta, pela primeira vez, a possibilidade de usar o método do padrão interno em sistemas FIA ou BIA com detecção amperométrica. O método permite a obtenção de resultados precisos na presença de flutuações em parâmetros dos sistemas (volume injetado, velocidade de injeção, força iônica e inserção acidental de bolhas de ar) e na presença de contaminação e/ou passivação gradual do eletrodo de trabalho. Métodos para determinação de diclofenaco (DCF) usando FIA com detecção amperométrica e simultânea de DCF e codeína (CO) por BIA com detecção amperométrica também foram desenvolvidos.

O método do padrão interno foi implementado no sistema de análise por injeção em fluxo com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (FIA-MPA) mediante a aplicação de uma sequência de pulsos de potenciais ao eletrodo de trabalho em função do tempo. O analito (+0,80 V/300ms) e o padrão interno (-0,05 V/400ms) foram detectados seletivamente, um em cada pulso de potencial. Melhoras significativas foram obtidas na precisão do método quando os resultados obtidos antes e após a normalização (usando o método do padrão interno) foram comparados. As seguintes variações foram calculadas, respectivamente, antes e após a normalização dos resultados usando o método do padrão interno. Variação na velocidade de vazão de 3,0 para 1,0 mL min⁻¹ (-57% e < 1%); no volume de injeção de 300 para 100 µL (-63% e 3%); força iônica de 0,60 para 0,77 mol L⁻¹ (-44 e 0,2%) e antes e após a inserção de bolhas de ar no sistema (-9,6% e 1,7%). Uma melhora significativa também foi obtida no coeficiente de

correlação da curva de calibração na presença de problemas de passivação ou contaminação do eletrodo de trabalho. O coeficiente de correlação foi calculado, respectivamente, em 0,975 e 0,998, antes e após a normalização dos resultados pelo método do PI.

O método do padrão interno também foi aplicado para corrigir erros em sistemas de análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica provenientes do procedimento de injeção (velocidade de injeção e volume injetado) quando seringas descartáveis foram utilizadas. Os resultados obtidos antes e após a normalização dos resultados pelo método do PI foram os seguintes, respectivamente: estudo de repetibilidade (DPR=6,4 e 1,8%; $n = 8$), coeficientes de correlação ($R=0,954$ e $0,997$) e erros obtidos na análise de amostras sintéticas ($9,4 \pm 1,5\%$ e $3,5 \pm 0,7$; $n = 8$).

A determinação de DCF por FIA-MPA foi implementada através da aplicação de dois pulsos de potenciais ao eletrodo de BDD em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte: (i) $+1,2 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ para oxidação e quantificação do DCF e, (ii) $0,0 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ para constante limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho. O sistema apresentou boa estabilidade ($\text{RSD} = 1,0\%$; $n=10$) e elevada frequência analítica ($135 \text{ injeções h}^{-1}$). O método apresentou resposta linear entre 5 e $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e os limites de detecção e quantificação foram calculados em $0,14$ e $0,46 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi aplicado na determinação de DCF em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram similares ao obtidos por HPLC a um nível de confiança de 95%.

A determinação simultânea de DCF e CO foi realizada usando os seguintes pulsos de potenciais: (i) $+1,1 \text{ V} / 50 \text{ ms}$: oxidação e quantificação de DCF; (ii) $+1,4 \text{ V} / 50 \text{ ms}$: para oxidação simultânea de DCF e CO; (iii) $0,0 \text{ V} / 200 \text{ ms}$: para constante limpeza eletroquímica do eletrodo de BDD. A corrente de oxidação da CO foi obtida pela

subtração entre as correntes detectadas em 1,4 e 1,1 V mediante uso de um fator de correção. O sistema apresentou boa estabilidade (RSD= 1,1 e 0,9% para DCF e CO, respectivamente, n=10) e elevada frequência analítica (~300 injeções h⁻¹). O método apresentou resposta linear entre 10 e 50 µmol L⁻¹ para o DCF e entre 7,1 e 35,7 µmol L⁻¹ para CO. O LD e o LQ foram calculados, respectivamente, em 1,1 e 3,7 µmol L⁻¹, para DCF e 1,0 e 3,3 µmol L⁻¹ para CO. O método proposto foi aplicado na determinação simultânea de DCF e CO em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram similares ao obtidos por HPLC a um nível de confiança de 95%.

Palavras-Chave: Amperometria de múltiplos pulsos, FIA, BIA, padrão interno, análise simultânea, diamante dopado com boro (BDD), codeína, diclofenaco.

ABSTRACT

Gimenes, Denise Tofanello. Use of the internal standard method in FIA and BIA systems and determination of diclofenac and codeine in pharmaceutical formulations by multiple pulse amperometry. Doctorate thesis, Instituto de Química, UFU. Uberlândia, julho de 2013.

The present thesis demonstrates, for the first time, the possibility of using of the internal standard method in FIA or BIA systems with amperometric detection. The method allows to obtain accurate results in the presence of fluctuations in the system parameters (injected volume, dispensing rate, ionic strength and accidental insertion of air bubbles) and in the presence of contamination and/or gradual passivation of the working electrode surface. Methods for determination of diclofenac (DCF) using FIA with amperometric detection and simultaneous determination of DCF and codeine (CO) by BIA with amperometric detection have also been developed.

The internal standard method was implemented in the flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection (FIA-MPA) system by applying a sequence of potential pulses of the working electrode as a function of time. The analyte (+0.80 V/300ms) and internal standard (-0.05 V/400ms) were detected selectively, one at each potential pulse. Significant improvements were obtained in the accuracy of the system when the results before and after normalization (using the internal standard method), were compared. The following errors were calculated, respectively, before and after normalization of the results using the internal standard method. Change in flow rate from 3.0 to 1.0 ml min⁻¹ (-57% e < 1%); volume injection from 300 to 100 µL (-63% and 3%); ionic strength from 0.60 to 0.77 mol L⁻¹ (-44 and 0,2%) and before and after the introduction of air bubbles into the system (-9,6% and 1,7%). A significant improvement was also obtained in the correlation coefficient of the calibration curve in the presence of problems of passivation or contamination of the working electrode. The

correlation coefficient was calculated, respectively, as 0,975 and 0,998, before and after the normalization of the results by the IS method.

The internal standard method was also applied to correct errors derived from the injection procedure (dispensing rate and injected volume) in batch injection analysis systems (BIA) with amperometric detection when disposable syringes were used. The results obtained before and after normalization of the results by the IS method were the following, respectively: repeatability test (RSD = 6.4 and 1.8%; n = 8), correlation coefficients (R=0.954 and 0.997) and errors obtained in analysis of synthetic samples ($E = 9.4 \pm 1.5$ and $3.5 \pm 0.7\%$; n = 8).

The determination of DCF by FIA-MPA was implemented by applying two potential pulses to the BDD electrode using H_2SO_4 0.1 mol L^{-1} as supporting electrolyte: (i) + 1.2 V / 50 ms for oxidation and quantification of DCF, and (ii) 0.0 V / 50 ms for constant electrochemical cleaning of the electrode surface. The system showed good stability (RSD = 1.0%, n = 10) and high analytical frequency ($135 \text{ injections h}^{-1}$). The method showed a linear response between 5 and $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ and the detection and quantification limits were as 0.14 and 0.46 mmol L^{-1} , respectively. The proposed method was applied to determine of DCF in pharmaceutical formulations and the obtained results were similar to those obtained by HPLC with a confidence level of 95%.

The simultaneous determination of DCF and CO was performed using the following potential pulses: (i) +1.1 V / 50 ms: oxidation and quantification of DCF; (ii) +1.4 V / 50 ms: simultaneous oxidation of DCF and CO, (iii) 0.0 V / 200 ms: for constant electrochemical cleaning of the BDD electrode. The oxidation current from CO was obtained by the difference between currents detected at 1.4 and 1.1 V by using a

correction factor. The system showed good stability (RSD = 0.9% and 1.1 for DCF and CO respectively, n = 10) and high analytical frequency (~ 300 injections h^{-1}). The method showed a linear response between 10 and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for DCF and 7.1 and 35.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for CO. The LQ and LD were calculated, respectively, at 1.1 and 3.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$, for DCF and 1.0 and 3.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for CO. The proposed method was applied for simultaneous determination of DCF and CO in pharmaceutical formulations and the obtained results were similar to those obtained by HPLC with a confidence level of 95%.

Keywords: Multiple pulse amperometry, FIA, BIA, internal standard, simultaneous analysis, boron doped diamond (BDD), codeine, diclofenac.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica.....	15
Figura 2: Fórmula estrutural do diclofenaco	24
Figura 3: Fórmula estrutural da Codeína.....	29
Figura 4: Esquema de montagem para utilização da pressão gerada por uma coluna de água para controle de vazão de sistemas em fluxo.....	39
Figura 5: Célula eletroquímica do tipo “ <i>wall-jet</i> ”(eletrodos de GC e Au).....	40
Figura 6: Representação esquemática da célula FIA (BDD).	42
Figura 7: Imagem real da célula em fluxo (BDD)	42
Figura 8: Representação esquemática da célula BIA.	43
Figura 9: Imagem da célula BIA usada nos estudos.	45
Figura 10: Voltamogramas cíclicos obtidos para soluções sem (a) e com a adição de 0,5 mmol L ⁻¹ de AU (b) ou 0,3 mmol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ³⁻ (c).....	50
Figura 11: (A) Esquema da aplicação dos pulsos de potenciais aplicados no eletrodo de trabalho de GC. (B) Respostas amperométricas para AU (a), [Fe(CN) ₆] ³⁻ (b) e (c) AU +[Fe(CN) ₆] ³⁻	52
Figura 12: Amperogramas obtidos para AU e [Fe(CN) ₆] ³⁻	54
Figura 13. Amperograma para injeções de AU e [Fe(CN) ₆] ³⁻ . Pulsos aplicados: +0,8V / 500ms; -0,05V / 400ms e +0,6V / 500ms.....	55
Figura 14. Amperogramas para injeções de AU e [Fe(CN) ₆] ³⁻ . Pulsos aplicados: +0,8V / 500ms; -0,05V / 400ms e +0,6V / 500ms.....	56
Figura 15. Comparação do desempenho do sistema FIA-MPA sem e com o uso do PI em função de injeções de solução padrão de AU (analito) e [Fe(CN) ₆] ³⁻ (PI).....	57
Figura 16. (A) Amperogramas obtidos para AU e [Fe(CN) ₆] ³⁻ em função da variação da vazão do sistema. (B). Comparação do desempenho do sistema FIA-MPA sem e com o uso do PI.	58
Figura 17. A) Amperogramas obtidos para AU e [Fe(CN) ₆] ³⁻ em função do volume injetado. B) Comparação do desempenho do sistema FIA-MPA sem e com o uso do PI.	59
Figura 18. A) Amperogramas obtidos para AU e [Fe(CN) ₆] ³⁻ em função da variação de força iônica. B) Comparação do desempenho do sistema FIA-MPA sem e com o uso do PI.....	61

Figura 19. A) Amperogramas obtidos para AU e 3 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em função da inserção de bolhas de ar no sistema FIA-MPA. B) Comparação do desempenho do sistema FIA-MPA sem e com o uso do PI.	62
Figura 20. (A) Amperogramas para concentrações crescentes de AU e constantes do PI. (B) Curvas analíticas sem e com normalização dos resultados.	64
Figura 21. Voltamograma hidrodinâmico do NC.....	67
Figura 22. Escada de potencial aplicada ao BDD em função do tempo.....	68
Figura 23. Amperogramas BIA-MPA para: (A) CO, PA e CO + PA; (B) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, DI e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ + DI.....	69
Figura 24. Amperogramas BIA-MPA para o AM, PI e AM + PI.	70
Figura 25. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA sem e com agitação da solução no interior da célula.	72
Figura 26. (A) Amperogramas para CA (AM) e PA (PI) em função da variação na velocidade de injeção. (B) Respostas obtidas para oxidação da CA sem e com a normalização dos resultados.....	74
Figura 27. Amperogramas para CA (AM) + PA (PI) em função da variação no volume injetado no sistema BIA-MPA. (B) Respostas obtidas para oxidação da CA sem e com a normalização dos resultados.....	75
Figura 28. Amperogramas BIA-MPA para CO (AM) + TBHQ (PI) com três diferentes modos de injeção: (A) micropipeta eletrônica, seringa descartável sem (B) e com (C) a presença do PI.....	77
Figura 29. Amperogramas e respectivas curvas de calibração para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de CO e constantes de PI usando três formas diferentes de injeção: micropipeta eletrônica, seringa descartável sem e com a presença do PI.....	79
Figura 30. Voltamograma cíclico para H_2SO_4 sem (a) e com DCF.	83
Figura 31. Esquema de eletro-oxidação do DCF.....	84
Figura 32. A) Escada de potencial aplicada ao eletrodo de BDD posicionado no sistema FIA-MPA. B) Amperogramas para sucessivas injeções de DCF. C) Voltamogramas hidrodinâmicos.	85
Figura 33. (A) Amperogramas obtidos para sucessivas injeções de DCF usando GC, Au ou BDD como eletrodos de trabalho. (B) Respectivas correntes de oxidação detectados nos eletrodos de GC, Au ou BDD	87

Figura 34. (A) Amperogramas para DCF no sistema FIA utilizando a detecção MPA e amperometria convencional. (B) Respectivas correntes de oxidação do DCF.....	88
Figura 35. (A) Amperogramas obtidos para DCF, usando como eletrólito H_2SO_4 , HClO_4 , tampão fosfato e acetato. (B) Respectivas correntes de oxidação.	89
Figura 36. Amperogramas obtidos para DCF em função da variação na vazão do sistema FIA.....	91
Figura 37. Amperogramas obtidos para DCF variando o volume injetado no sistema FIA.....	92
Figura 38. (A) Escada de potencial aplicado ao eletrodo de BDD. (B) Amperogramas obtidos para solução com concentrações crescentes e decrescentes de DCF. (C) Respectiva curva de calibração.....	94
Figura 39. (A) Escada de potencial aplicado ao eletrodo de BDD. (B) Amperogramas obtidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (PI), DCF e PI + DCF.....	97
Figura 40. (A) Amperogramas obtidos para concentrações crescentes de DCF e constantes do PI. (B) Curvas de calibração para o DCF com e sem o uso do método do PI.....	98
Figura 41. Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sem (a) e com a presença de (b) DCF e (c) CO..	100
Figura 42. Reação de oxidação eletroquímica da codeína.	100
Figura 43. (A) Amperogramas obtidos para DCF (a) e CO (b). (B) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para o DCF e CO.	101
Figura 44. (A) Escada de potencial aplicado ao eletrodo de BDD. (B) Amperogramas obtidos para CO; DCF e DCF + CO.....	102
Figura 45. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA para CO e DCF com e sem agitação da solução.....	104
Figura 46. Sinais médios de corrente de oxidação e FC obtidos para DCF em função da: (A) velocidade de injeção e (B) volume injetado.	105
Figura 47. Curvas de calibração para concentração crescente de DCF e respectivo FC.	107
Figura 48. Amperogramas obtidos para DCF ou DCF + CO sem potencial de limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho.....	108
Figura 49. Amperogramas obtidos para DCF ou DCF + CO com potencial de limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho.....	109

Figura 50. Amperogramas obtidos para DCF e DCF + CO, respectivamente, com duas concentrações diferentes.....	110
Figura 51. Amperogramas obtidos para injeções de duas soluções contendo somente DCF, cinco soluções contendo simultaneamente DCF + CO e duas amostras adequadamente diluídas.....	111
Figura 52. Curvas de calibração obtidas para DCF e CO.....	112
Figura 53. (A) Escada de potencial aplicado ao eletrodo de BDD em função do tempo. (B) Amperogramas obtidos para injeções $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, DCF, CO e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ + DCF + CO.....	115
Figura 54. (A) Amperogramas obtidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ + DCF e soluções contendo concentrações crescentes de DCF + CO e constantes de PI (B) Curvas de calibração para o DCF e CO com e sem normalização.	116

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Dados de concentração e pulsos de potenciais aplicados para o AM e PI.....	71
Tabela 2. Frequência analítica para os pares (AM + PI) com e sem agitação.....	73
Tabela 3. Comparação entre os resultados para repetibilidade obtida por BIA-MPA para oito pares de AM/PI usando três processos diferentes de injeção:	77
Tabela 4. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA para sete pares de AM/PI estudados usando três processos diferentes de injeção	80
Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos com a micropipeta motorizada e seringa descartável antes e após normalização usando o método do PI para amostras sintéticas usando BIA-MPA.....	81
Tabela 6. Resultados obtidos no estudo de repetibilidade intra e entre-dias na determinação de DCF por FIA-MPA.	93
Tabela 7. Comparação dos resultados obtidos na determinação de DCF em amostras farmacêuticas usando FIA-MPA e HPLC.	95
Tabela 8. Comparação dos resultados obtidos para a determinação de DCF e CO em amostras farmacêuticas usando a metodologia proposta <i>versus</i> HPLC.	113

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

\varnothing_i	Diâmetro interno
AA	Ácido Ascórbico
AAS	Ácido acetilsalicílico
AM	Analito Modelo
AU	Ácido Úrico
BDD	Diamante dopado com boro, do inglês “ <i>Boron-Doped Diamond</i> ”
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
BIA	Análise por Injeção em Batelada, do inglês “ <i>Batch Injection Analysis</i> ”
CA	Cafeína
CO	Codeína
CVD	Deposição química a partir da fase de vapor do inglês <i>chemical vapor deposition</i>
DCF	Diclofenaco
DI	Dipirona
DPR	Desvio padrão relativo
EA	Eletrodo auxiliar
ER	Eletrodo de referência
ET	Eletrodo de trabalho
eV	Elétron volt
FIA	Análise por Injeção em Fluxo, do inglês “ <i>Flow Injection Analysis</i> ”
FC	Fator de correção
GC	Carbono vítreo
HPHT	Altas temperaturas e altas pressões, do inglês <i>High pression high temperature</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>
I	Corrente
I_p	Corrente de pico
LD	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)

LQ	Limite de quantificação ($LQ = (10 \times DP_{\text{Branco}} - C_L) / S$)
MPA	Amperometria de múltiplos pulsos, do inglês “ <i>Multiple pulse amperometry</i> ”
NC	New coccine
NSAIDs	Antiinflamatório não esteroide, do inglês, <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>
PA	Paracetamol
PAD	Amperometria pulsada, do inglês <i>Pulsed Amperometric Detection</i>
PI	Padrão interno
PVC	Policloreto de Vinila
TAc/Ac⁻	Tampão acetato
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
UV	Ultravioleta

TRABALHOS REALIZADOS

PUBLICAÇÕES EM REVISTAS CIENTÍFICAS DE ARTIGOS RELACIONADOS A PRESENTE TESE

1 - Gimenes, D.T., dos Santos, W.T.P., Muñoz, R.A.A., and Richter, E.M., *Internal standard in flow injection analysis with amperometric detection*. Electrochemistry Communications, 2010. **12**(2): p. 216-218.

2 - Gimenes, D.T., de Freitas, J.M., Muñoz, R.A.A., and Richter, E.M., *Flow-Injection Amperometric Method for Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode*. Electroanalysis, 2011. **23**(11): p. 2521-2525.

3 - Gimenes, D.T., Pereira, P.F., Cunha, R.R., Bezerra da Silva, R.A., Muñoz, R.A.A., and Richter, E.M., *A Simple Strategy to Improve the Accuracy of the Injection Step in Batch Injection Analysis Systems with Amperometric Detection*. Electroanalysis, 2012. **24**(9): p. 1805-1810.

4 – Gimenes, D. T., Cunha, R. R., Ribeiro, M. M. A. C., Pereira, P. F., R.A., Muñoz, R.A.A., and Richter, E.M., *Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac*. Talanta, Artigo submetido.

DEMAIS PUBLICAÇÕES EM REVISTAS CIENTÍFICAS

5 – Cunha, R. R., Gimenes, D.T., Munoz, R. A. A., do Lago, C., Richter, E. M., *Simultaneous determination of diclofenac and its common counter-ions in less than 1 minute using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. Electrophoresis (Weinheim. Print), 2013. **34**(9-10): p. 1423-1428.

6 – Miranda, J.A.T., Cunha, R.R., Gimenes, D.T., Muñoz, R.A.A., and Richter, E.M., *Simultaneous determination of ascorbic acid and acetylsalicylic acid using flow*

injection analysis with multiple pulse amperometric detection. Química Nova, 2012. **35**(7): p. 1459-1463

7 - dos Santos, W.T.P., Gimenes, D.T., Richter, E.M. Angnes, L., *Flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection: potentialities and applications*. Química Nova, 2011. **34**(10): p. 1753-1761

8 - Tormin, T.F., Gimenes, D.T., Richter, E.M., and Munoz, R.A.A., *Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection*. Talanta. 2011. **85**(3): p. 1274-1278.

9 - Silva, W.C., Pereira, P.F., Marra, M.C., Gimenes, D.T., Cunha, R.R., da Silva, R.A.B., Munoz, R.A.A., and 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**(12): p. 2764-2770.

10 - da 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, 2011. **3**(12): p. 2804-2808.

11 - Tormin, T.F., Gimenes, D.T., Silva, L.G., Ruggiero, R., Richter, E.M., Ferreira, V.S., Muñoz, R.A.A., *Direct amperometric determination of tert-butylhydroquinone in biodiesel*. Talanta, 2010. **82**(4): p. 1599-1603

12 - Gimenes, D.T., dos Santos, W.T.P., Tormin, T.F., Munoz, R.A.A., and 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): p. 74-78.

13 - dos Santos, W.T.P., Gimenes, D.T., de Almeida, E.G.N., Eiras, S.D., Albuquerque, Y.D.T., and 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): p. 1249-1255.

14 - dos Santos, W.T.P., de Almeida, E.G.N., Ferreira, H.E.A., Gimenes, D.T., and Richter, E.M., *Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection*. *Electroanalysis*, 2008. **20**(17): p. 1878-1883.

Introdução e Objetivos do trabalho

1.1. Considerações gerais

Química analítica é uma área de estudo da química direcionada ao desenvolvimento e uso de métodos, instrumentos e estratégias para obter informação da composição e natureza da matéria em espaço e tempo, com a necessária validação e determinação de incertezas associadas e rastreabilidade. Sendo de grande importância na indústria, na medicina e em diversas áreas do conhecimento. Devido à sua importância nestas áreas busca-se constantemente o desenvolvimento de metodologias de análises que sejam acessíveis a qualquer laboratório.

Dentre as características desejáveis no desenvolvimento de uma metodologia analítica cabe destacar um menor tempo de análise, maior sensibilidade e seletividade, boa precisão, baixo custo de instrumentação e fácil operação. Sendo assim, sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA, do inglês “*Flow Injection Analysis*”) [1] ou de injeção em batelada (BIA, do inglês “*Batch Injection Analysis*”) [2] tem sido amplamente exploradas para satisfazer estes requisitos. Os sistemas FIA e BIA permitem o acoplamento a diversos tipos de detectores, tais como espectrofotometria [3-5], fluorescência [6-8], quimiluminescência [9-11], potenciometria [12-14], voltametria [15, 16] e amperometria [17-20], entre outros.

Dentre estes detectores podemos destacar os eletroquímicos devido ao baixo custo operacional, simplicidade no uso e possibilidade de minimização de etapas de pré-tratamento das amostras (análise de amostras coloridas ou turvas e na presença de particulados) [21]. Este tipo de detecção é especialmente vantajosa em relação à detecção espectrofotométrica quando os analitos de interesse não possuem um grupo cromóforo (absorção na região UV-VIS) ou quando possuem baixo coeficiente de absorvidade molar. Isto também pode ser considerado em relação à detecção fluorimétrica de compostos eletroativos que não tem propriedades fluorescentes [22].

Pode-se ainda efetuar análises em baixos níveis de concentração, pois há a possibilidade de pré-concentração de espécies sobre a superfície do eletrodo, tanto por eletrodeposição, quanto por adsorção [23].

Entre os detectores eletroquímicos mais utilizados em sistemas de fluxo, destacam-se os amperométricos [24]. Na amperometria convencional, um potencial constante é aplicado ao eletrodo de trabalho e uma reação redox (oxidação ou redução) deve ocorrer com o composto de interesse [21]. Neste tipo de detecção, a corrente capacitiva é muito baixa (tende a zero), o que contribui para uma elevada detectabilidade, uma vez que é possível medir baixos níveis de corrente faradaica provenientes de baixas concentrações das espécies de interesse. Quando a comparação é realizada com os métodos voltamétricos estacionários, a detecção amperométrica acoplada a sistemas em fluxo pode apresentar duas vantagens: (1) maior sensibilidade em função do transporte de massa através do fluxo contínuo da solução em direção ao eletrodo e menor probabilidade de contaminação devido ao menor tempo de contato da solução amostra ou padrão com o eletrodo de trabalho [23].

Apesar do menor tempo de contato da solução com o eletrodo de trabalho, a amperometria convencional ainda apresenta limitações quando se analisa compostos eletroativos que adsorvem fortemente na superfície do eletrodo de trabalho. Neste caso, uma gradativa passivação ou contaminação do eletrodo pode ocorrer, dificultando ou até mesmo impedindo a transferência de carga, o que resulta em falta de repetibilidade das análises. Além disto, sinais eletroquímicos oriundos de subprodutos de reações também podem interferir na aquisição do sinal analítico de interesse [25-27].

Além da amperometria convencional, dois modos de detecção nos quais pulsos de potenciais são aplicados ao eletrodo de trabalho vêm sendo cada vez mais utilizadas: a detecção amperométrica pulsada (PAD, do inglês *"Pulsed Amperometric Detection"*) e

a amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês “*Multiple Pulse Amperometry*”). Ambas as técnicas são semelhantes na forma de aplicação dos pulsos de potenciais, mas o que distingue uma da outra é a aquisição da corrente gerada. Na PAD, dois ou mais pulsos de potenciais são aplicados ao eletrodo, porém, a aquisição da corrente é limitada a um único pulso de potencial, não sendo possível, portanto, monitorar a corrente nos demais pulsos aplicados [23]. Contudo, esta técnica contorna uma das principais limitações da detecção amperométrica convencional (potencial constante) que é a falta de estabilidade do sinal eletroquímico em função do tempo. A técnica permite a aplicação de um ou mais pulsos de potenciais adicionais responsáveis pela constante limpeza e/ou condicionamento da superfície do eletrodo de trabalho empregado. A MPA, que segundo nosso conhecimento, é uma técnica somente disponibilizada em potenciostatos comercializados pela empresa Metrohm – Eco Chemie (software GPES 4.9), permite a aplicação de até 10 pulsos de potenciais com o monitoramento da corrente em função do tempo em todos os pulsos de potenciais (aquisição de até 10 amperogramas distintos e simultâneos). Nesta técnica há uma limitação no software quanto ao tempo mínimo de aplicação de cada pulso de potencial que é de 30 ms [23].

A associação da detecção MPA ou PAD a sistemas em fluxo apresenta várias finalidades conforme descrito na literatura. Dentre elas podemos destacar [23]:

- a) Solução de problemas relacionados à contaminação/passivação da superfície do eletrodo de trabalho. Isto é possível aplicando-se no mínimo dois pulsos de potenciais alternadamente em função do tempo, onde um pulso de potencial monitora a corrente da(s) espécie(s) de interesse em função da concentração (aplicação analítica) e o outro pulso de potencial promove uma constante limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho. Muitas vezes, no entanto, além

da limpeza eletroquímica, um terceiro pulso de potencial necessita ser aplicado para constante ativação da superfície do eletrodo [20, 28]

- b) Análise indireta de compostos eletroativos, onde em um pulso de potencial ocorre à oxidação ou redução de mais de uma espécie e em outro pulso de potencial, o produto da reação redox de somente um destes compostos é monitorada. Esta análise é uma alternativa para solucionar problemas de sobreposição de sinais analíticos de espécies onde somente uma delas apresenta comportamento reversível ou quase reversível e a outra apresenta características irreversíveis ou com reversibilidade de menor intensidade [29-32].
- c) Análise simultânea de compostos usando um único eletrodo de trabalho. Um primeiro pulso de potencial monitora apenas um composto que apresente reação redox (oxidação/redução). O segundo pulso de potencial é aplicado de modo que os dois compostos de interesse apresentem sinais de corrente de oxidação e/ou redução. A diferença de corrente entre os dois pulsos de potenciais fornece o sinal amperométrico para o segundo composto [33-36].

Alguns parâmetros otimizáveis também devem ser considerados quando se usa a detecção por MPA em sistemas em fluxo, como: volume injetado, vazão e duração do tempo de aplicação de cada pulso de potencial. É importante lembrar também que o tempo total de aplicação de uma sequência de pulsos de potenciais está diretamente ligado ao número de vezes que a corrente é adquirida em função do tempo em cada amperograma [23].

1.2. Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

A composição do diamante foi descrita pela primeira vez por Antoine Lavoisier em 1772, onde corretamente relatou que o diamante era formado apenas pelo elemento

químico carbono . O diamante é um material que apresenta propriedades exclusivas. Possui alta densidade atômica, dureza, é um ótimo isolante elétrico a temperatura ambiente e resiste ao ataque de qualquer produto químico [37].

Tendo em vista as propriedades exclusivas do diamante, no final do século 19 surgem relatos de estudiosos que tentavam sintetizar o diamante. Porém, a produção do diamante sintético somente foi alcançada durante a década de 1950 por pesquisadores da empresa *General Electric*. A metodologia envolvia altas temperaturas e altas pressões (HPHT- do inglês *High pressure high temperature*). No entanto, apesar desta síntese ter sido considerada um grande avanço e a que mais se assemelha ao processo de formação do diamante natural [38], o método HPHT exigia uma instrumentação de alto custo, além dos cristais obtidos serem pequenos e de baixa qualidade devido a prováveis contaminações no processo.

A viabilidade de fabricação de diamantes sintéticos foi conseguida na mesma década por um pesquisador da *Union Carbide* através da deposição química a partir da fase de vapor (CVD – do inglês *chemical vapor deposition*) a baixas pressões. Esta metodologia apresentou um custo inferior quando comparado ao método do HPHT, mas teve uma baixa taxa de crescimento e obteve-se uma quantidade significativa de grafite. Mais tarde, Deryagin *et al.* [39] conseguiram taxas de crescimento significativas e Angus *et al.* [40] demonstraram que o grafite indesejado poderia ser eliminado por ataque com hidrogênio atômico.

Hoje em dia, a síntese de filmes finos de diamante é uma técnica muito difundida, uma vez que é economicamente viável (uso de reatores de construção e manuseio simplificados) e permite o crescimento dos filmes sobre vários substratos de diferentes tamanhos e formatos, tais como: molibdênio, tungstênio, quartzo, silício, titânio, grafite, carbono vítreo, irídio e nióbio. [38].

Por causa de suas características isolantes (*band-gap* com mais de 5 eV) e alta resistividade ($10^{20} \Omega \text{ cm}$), o diamante puro não é um material eletródico. Uma vez já estabelecida a tecnologia para construção de filmes finos de diamante sintético através da técnica CVD surge então o interesse em fabricar filmes de diamante com características semicondutoras. O diamante quando apropriadamente dopado pode se tornar um bom condutor elétrico e passa a ser um excelente candidato a material de eletrodo [41, 42]. Diversos dopantes podem ser utilizados: boro, fósforo, enxofre ou nitrogênio. Há a possibilidade de formação de semicondutores do tipo-n quando fósforo ou nitrogênio são utilizados como agentes dopantes [43]. O boro possui um elétron a menos que o carbono e devido do seu pequeno raio atômico pode ser facilmente incorporado na rede cristalina do diamante, tornando-se o agente dopante mais utilizado, formando um semicondutor do tipo-p [44]. Esta dopagem geralmente é feita a partir do gás trimetil boro adicionado à fase gasosa na faixa de concentração de 10 a 10.000 ppm, e a dopagem deve ser com uma concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^{21}$ átomos de boro cm^{-3} [45].

O aumento na condutividade do diamante gerou um material eletródico (BDD - do inglês *Boron doped diamond*) que apresenta propriedades eletroquímicas superiores quando comparados com outras formas alotrópicas de carbono (carbono vítreo, grafite e pasta de carbono) comumente utilizadas como eletrodos até então [37]. Destacam-se as seguintes características: larga janela de potencial útil em meio aquoso e não aquoso, baixa e estável corrente de fundo, baixa e fraca adsorção de moléculas polares, estabilidade morfológica e microestrutural a altas temperaturas, transparência óptica em regiões do UV/VIS e IV, alta resistência a corrosão em meios agressivos, estabilidade de resposta a longos períodos e alta sensibilidade [37, 46-53].

O comportamento eletroquímico do BDD depende de suas propriedades físicas, químicas e eletrônicas. Estas propriedades são diretamente afetadas pela superfície terminal presente no BDD: hidrogênio, oxigênio e outros [54]. As superfícies dos filmes de BDD recém-preparados possuem terminações em hidrogênio, mas esta terminação pode ser facilmente modificada por oxigênio através da exposição da superfície a um plasma de oxigênio ou a uma solução de ácido forte em ebulição. Esta substituição também é possível em meio ácido e temperatura ambiente mediante polarizações anódicas [55].

Suffredini *et al.* [37] estudaram o efeito da superfície eletroquímica pré tratada do BDD na resposta eletroquímica ao par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$. Foram observados que ambos os sistemas apresentam picos quase reversíveis após polarização anódica (3,0 V, por 30 min em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹) e picos reversíveis após polarização catódica. Estes resultados demonstraram que a resposta eletroquímica do eletrodo de BDD é dependente do pré-tratamento realizado em sua superfície, pois após tratamento catódico houve uma melhora significativa de ambos os sistemas. Ainda segundo Suffredini *et al.* [37], os resultados indicam que há uma transformação interna do filme de BDD ou a presença de uma camada ativa responsável pelo comportamento observado [56].

1.3. Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

O número de amostras nos laboratórios de análises clínicas e de controle de processos industriais vem tendo um crescimento considerável ao longo dos últimos anos. Neste contexto, estudos para o desenvolvimento de procedimentos automatizáveis, que possibilitem análises rápidas tem sido realizados por muitos pesquisadores.

Desde que o conceito de análise por injeção em fluxo (FIA) foi introduzido em 1975 [1], houve um grande impacto na forma como as metodologias analíticas foram e continuam sendo implementadas. Isto se torna claro quando se verifica o número de trabalhos científicos gerados até o momento: em torno de 8000 artigos científicos [57], 182 teses/dissertações (banco de teses CAPES, palavra chave: análise por injeção em fluxo) e 1126 pesquisadores brasileiros atuando na área segundo pesquisa feita no sistema Lattes do CNPq em 07 de agosto de 2012. Este alto impacto é devido às características inerentes e atraentes dos sistemas em fluxo, tais como: alta frequência analítica, baixo custo da instrumentação, menor tempo de exposição do analista aos reagentes e amostras, consumo reduzido de reagentes e amostras, alta precisão e reprodutividade, possibilidade do acoplamento com vários detectores e facilidade na automação.

O processo de análise por injeção em fluxo se baseia na inserção de uma alíquota da amostra em uma tubulação onde a mesma é transportada até o detector, sendo que o sistema mais simples é o de linha única. Nesta configuração, a amostra se dispersa na solução carregadora, enquanto é transportada até o detector, onde esta dispersão pode afetar a magnitude do sinal analítico [58]. Por isso, é importante ter controle da vazão da solução transportadora e do volume injetado no sistema, assim como oferecer condições para que o sistema fique estável durante toda a análise.

Para que seja feito o transporte da solução carregadora é necessário que se tenha um sistema propulsor, tais como bombas peristálticas, pneumáticas, de deslocamento e de membrana, entre outras. Há uma restrição quando se utiliza o sistema de propulsão por bombas peristálticas relacionada ao ruído gerado nos detectores causado pela alternância dos roletes propulsores [59], o que é mais pronunciado quando se utiliza os detectores eletroquímicos. Este problema pode ser contornado com o uso de

amortecedores de pulso ou de mini-compressores de ar do tipo bomba de diafragma, sendo que o controle da vazão, neste caso, pode ser facilitado por pressão de retorno gerada por uma coluna d'água [60]. O injetor é outra parte importante do sistema. Ele é responsável por injetar um volume definido e reprodutível de soluções padrão ou amostra no interior da tubulação do sistema em fluxo onde ocorre o transporte até o detector.

O caminho percorrido pela solução padrão ou amostra do ponto de injeção até o detector é denominado percurso analítico. O propósito inicial é conduzir a amostra até o detector, mas reações químicas também podem ser promovidas neste percurso ou até mesmo todo o procedimento de pré-tratamento de uma amostra (pré-concentração, extração, diluição ou dissolução). [61].

Conforme comentado anteriormente, uma das vantagens dos sistemas FIA é a possibilidade de adaptação de diversos detectores normalmente usados em análise química. No presente trabalho, o interesse está no acoplamento de sistemas FIA com detecção amperométrica, especialmente no modo pulsado, não sendo, portanto, de interesse discutir o acoplamento com outros detectores.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa propôs uma nova célula eletroquímica para detecção em sistemas de análises em fluxo [62]. O detector proposto é do tipo “*wall-jet*” e foi construído usando um tubo de vidro e com configuração para posicionamento de três eletrodos. Uma das inovações propostas na célula é sua operação sob baixa pressão interna (pressão atmosférica), o que contribui muito para evitar vazamentos. Além disso, a geometria da célula é favorável para efetuar a limpeza mecânica do eletrodo de trabalho, uma vez que é possível retirar e recolocar o eletrodo de trabalho sem que o sistema seja totalmente desmontado.

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 por Surareungchai *et al.* Os autores desenvolveram um procedimento para a determinação simultânea de glicose e frutose [63] utilizando FIA-MPA através da aplicação de quatro pulsos de potenciais sobre o eletrodo de ouro modificado com Nafion em meio de NaOH 0,10 mol L⁻¹. O primeiro pulso de potencial ($E_{\text{det1}} = -0,5 \text{ V} / 240 \text{ ms}$) promove a oxidação da glicose. O segundo pulso de potencial ($E_{\text{det2}} = +0,2 \text{ V} / 180 \text{ ms}$) é onde ocorre a oxidação da glicose e da frutose, simultaneamente. O terceiro ($E_{\text{oxd}} = 1,0 \text{ V}$) e quarto ($E_{\text{red}} = -0,8 \text{ V}$) pulsos de potenciais foram utilizados para limpeza e reativação da superfície do eletrodo, respectivamente. A quantificação direta e seletiva da glicose foi realizada pelo amperograma registrado em E_{det1} . Porém, para a quantificação da frutose fez-se uma subtração das correntes dos amperogramas obtidos em E_{det1} e E_{det2} , para assim, obter o amperograma com as correntes correspondentes apenas à concentração de frutose e realizar sua quantificação. Os limites de detecção obtidos foram 1,2 e 0,13 mmol L⁻¹ para glicose e frutose, respectivamente.

Nosso grupo de pesquisa vem recentemente empregando sistemas FIA com detecção amperométrica no desenvolvimento de novos métodos de análise.

Em 2008 [31] foi descrito um procedimento usando FIA-MPA para determinação simultânea de paracetamol (PA) e ácido ascórbico (AA) em formulações farmacêuticas. Os compostos foram detectados pela aplicação de quatro pulsos de potenciais sobre o eletrodo de ouro em meio de tampão acetato (pH 4,7). O AA foi oxidado em +0,40 V (sem interferência de PA) e o PA foi indiretamente detectado em 0,0 V pela redução do produto de oxidação do paracetamol previamente gerado em +0,65 V. A aplicação de um quarto pulso de potencial (-0,05 V) foi necessária para constante limpeza da

superfície do eletrodo de trabalho de ouro. Segundo os autores, o sistema proposto é simples, rápido (60 injeções por hora) e apresenta adequada precisão e exatidão.

Em outro trabalho, Santos *et al.* [30] descreveram uma metodologia para quantificação simultânea de dipirona (DI) e paracetamol (PA) em formulações farmacêuticas. Neste caso, uma sequência de quatro pulsos de potenciais também foi aplicada em função do tempo: (1) +0,40 V: oxidação e determinação de DI (sem interferência de PA); (2) +0,65 V: oxidação de DI e PA; (3) 0,0 V: redução do produto de oxidação do PA e quantificação indireta do mesmo sem a interferência de DI e; (4) -0,5 V: limpeza e regeneração da superfície do eletrodo de trabalho de carbono vítreo. Com este sistema obteve-se uma frequência analítica de 45 injeções por hora com um baixo consumo de reagentes (2 mL por determinação) e amostras (150 µL).

A determinação indireta de dopamina na presença de altas concentrações de AA [29] também foi proposta usando um sistema FIA-MPA. Neste trabalho, três pulsos de potenciais foram constantemente aplicados ao eletrodo de trabalho de carbono vítreo, sendo que a dopamina e o AA são simultaneamente oxidados em +0,8V e a quantificação seletiva da dopamina em +0,35V foi possível através da redução de seu produto de oxidação gerado em +0,8V. Um terceiro pulso de potencial (0,0V) foi alternadamente aplicado para limpeza do eletrodo. A frequência analítica para este trabalho foi calculada em 40 injeções por hora e o LD para dopamina em 50 nmol L⁻¹.

Uma nova estratégia para determinações simultâneas empregando FIA-MPA foi descrita em dois trabalhos publicados recentemente [34, 64]. Um descreve a determinação simultânea de PA e cafeína (CA) e o outro de AA e ácido acetilsalicílico (AAS). O procedimento consiste em aplicar dois pulsos de potenciais, sendo que, em um pulso de potencial (E₁), apenas um analito (A₁) é oxidado e num segundo pulso de potencial (E₂; mais positivo), os dois analitos (A₁ e A₂) são simultaneamente oxidados.

O acesso à corrente proveniente da oxidação do segundo composto (A_2) é possível mediante subtração da corrente detectada em ambos os pulsos de potenciais ($i_{E2} - i_{E1}$). No entanto, a corrente detectada para o analito A_1 normalmente não é a mesma em ambos os pulsos de potenciais (E_1 e E_2) e uma simples subtração de corrente não fornece acesso à corrente de oxidação de A_2 . Para contornar esta limitação, um fator de correção (FC) necessita ser obtido. O FC é obtido pela divisão das correntes detectadas em E_2 e E_1 na análise de soluções contendo concentrações crescentes do analito A_1 ($FC = i_{A1 \text{ em } E2} / i_{A1 \text{ em } E1}$). Uma segunda equação necessita ser usada para obtenção de acesso à corrente proveniente da oxidação de A_2 ($i_{A2} = i_{(A1+A2) \text{ em } E2} - (FC \times i_{A1 \text{ em } E1})$). Este procedimento foi usado com sucesso na determinação simultânea de PA e CA e de AA e AAS em formulações farmacêuticas com a obtenção de resultados similares aos obtidos por HPLC. Comparando com HPLC, os métodos propostos apresentam custo inferior, menor consumo de reagentes ou solventes e frequência analítica muito superior (mais de 120 injeções por hora em ambos os casos).

Outros grupos de pesquisa têm também mostrado interesse na determinação simultânea empregando sistemas FIA com detecção amperométrica. Um método para determinação simultânea dos antioxidantes BHA e BHT em alimentos foi desenvolvido usando FIA-MPA [36]. Para esta determinação, dois pulsos de potenciais foram aplicados ao BDD em meio de uma solução hidroetanólica (30% etanol, v/v) com $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ (pH = 1,5). No primeiro pulso de potencial (+0,85 V / 200 ms) ocorre a oxidação do BHA e no segundo pulso de potencial (+1,15 V / 200 ms) a oxidação do BHA e BHT. A concentração de BHA foi calculada com a corrente detectada no primeiro pulso de potencial (E_1), enquanto que a concentração do BHT é obtida através da simples subtração entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais ($E_2 -$

E₁). Os limites de detecção foram calculados em 0,030 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o BHA e 0,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o BHT. A frequência analítica foi calculada em 63 injeções h^{-1} .

Medeiros *et al.* [65] também determinaram simultaneamente os corantes sintéticos tartrazina e amarelo crepúsculo ou azul brilhante e amarelo crepúsculo em alimentos, usando o sistema FIA com detecção amperométrica e eletrodo de BDD. Para as determinações simultâneas, dois pulsos de potenciais foram utilizados. No primeiro pulso de potencial (-0,15 V / 400ms) ocorre a redução e quantificação do amarelo crepúsculo e no segundo pulso de potencial (-0,45 V / 100 ms) a redução da tartrazina e amarelo crepúsculo ou azul brilhante e amarelo crepúsculo. Segundo os autores não houve a necessidade de aplicação de um pulso para limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo, porque não houve adsorção dos analitos no eletrodo de BDD. Para se ter acesso as correntes de redução dos corantes tartrazina e azul brilhante uma subtração de corrente foi feita entre os dois potenciais com o uso de um fator de correção (já citado anteriormente). Os limites de detecção foram calculados em 2,5 e 0,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente para tartrazina e amarelo crepúsculo e 3,5 e 0,85 respectivamente para azul brilhante e amarelo crepúsculo. A frequência analítica foi calculada em 80 injeções h^{-1} .

1.4. Análise por Injeção em Batelada (BIA)

Os sistemas de análise por injeção em batelada foram descritos na literatura pela primeira vez no ano de 1991 por Wang e Taha [66]. A célula eletroquímica (Figura 1) normalmente contém um grande volume de eletrólito suporte e inerte, três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) e um local apropriado para posicionamento reprodutível do sistema de injeção. O sistema pode ser operado com ou sem agitação da solução no interior da célula. A posição do eletrodo de trabalho é oposta à ponteira do sistema de

injeção. A injeção da solução em análise (aproximadamente 100 μL), portanto, é feita diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho (configuração “*wall-jet*”).

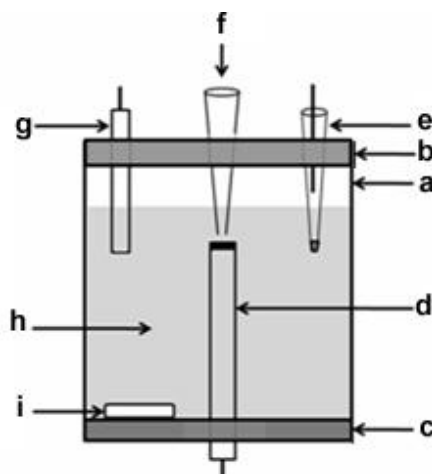


Figura 1: Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica [57]. a) corpo da célula; b) tampa superior; c) tampa inferior; d) eletrodo de trabalho; e) eletrodo de referência; f) ponteira de micropipeta para injeção; g) eletrodo auxiliar; h) solução de eletrólito suporte; i) barra magnética.

Inicialmente [14, 66-69], quando pipetas manuais eram utilizadas no procedimento de injeção, a etapa era dependente da habilidade do operador. Com a introdução de micropipetas motorizadas [70], a operação ficou mais precisa e reprodutível, pois além do controle no volume, a velocidade de injeção também passou a ser controlada. A partir de então, um operador capacitado para controlar as injeções de forma reprodutível deixou de ser necessário.

Os sinais obtidos em sistemas BIA são transientes (similar a sistemas FIA), nos quais a altura dos picos é proporcional à concentração das espécies de interesse. O perfil do sinal analítico pode ser explicado por fenômenos característicos presentes em diferentes etapas da injeção. Antes da injeção observa-se uma corrente constante e normalmente baixa, indicando que não há transferência eletrônica na interface entre o eletrodo e a solução, que se atribui a corrente gerada a partir do eletrólito inerte. Quando

a solução padrão ou amostra é injetada, há um aumento brusco da corrente que se atribui ao processo redox relacionado ao analito de interesse mecanicamente transportado até a superfície do eletrodo de trabalho. Após o fim do procedimento de injeção, a corrente atinge um valor máximo permanecendo constante durante um pequeno intervalo de tempo. Após este patamar constante há uma queda acentuada do sinal analítico referente à mudança do transporte mecânico para o transporte controlado por difusão, atingindo, portanto, o equilíbrio existente antes da injeção. Este processo pode ser acelerado mediante uso de agitação mecânica da solução presente no interior da célula.

Apesar do sistema BIA ter sido pouco explorado até hoje [71], ele apresenta várias características semelhantes ao sistema FIA, tais como possibilidade de trabalhar com baixos volumes de amostras e reagentes, elevada frequência analítica, alta sensibilidade e repetibilidade, baixos limites de detecção e custo reduzido [72]. Além disso, assim como em sistemas FIA, o fenômeno da passivação ou contaminação da superfície do eletrodo de trabalho também é menor em relação aos sistemas estacionários (voltametrias de pulso ou cíclica, por exemplo) devido ao menor tempo de contato entre o analito e o eletrodo de trabalho durante a análise [73].

Além das características atraentes dos sistemas BIA, há também alguns inconvenientes quando comparados aos sistemas FIA, tal quando há a necessidade de derivatização do analito. Esta limitação ocorre devido à pequena distância entre o injetor e o detector, minimizando o tempo em que o reagente e o analito permanecem em contato [57]. Duas outras limitações do sistema BIA incluem a não possibilidade de automação e pré-tratamento on-line de amostras.

Entretanto, o sistema BIA também apresenta algumas vantagens adicionais em relação a FIA, com destaque à menor lixiviação do material usado em eletrodos modificados (ausência de soluções carregadoras em tempo integral) [71], melhor

sensibilidade (menor efeito de dispersão da amostra) [72, 74], possibilidade de injeção da amostra sem prévia diluição no eletrólito suporte, devido à força iônica se manter praticamente inalterada, pois um pequeno volume de amostra é injetado em um volume muito grande de eletrólito [76], menor geração de resíduos; eliminação de problemas relacionados a vazamento e presença de bolhas de ar [72], maior simplicidade e robustez na aparelhagem e maior facilidade de desenvolvimento de métodos analíticos portáteis [76].

Apesar destas características interessantes, um pequeno número de estudos sobre o assunto foi relatado na literatura até hoje [73]. Provavelmente, isto ocorreu, principalmente, por dois motivos: (1) necessidade de utilizar pipetas motorizadas, que geralmente não estão disponíveis nos laboratórios comuns de pesquisa e são necessárias para obtenção de reprodutibilidade no processo de injeção, uma vez que pipetas manuais são dependentes da habilidade do operador e a sua utilização normalmente proporciona baixa repetibilidade [70] e, (2) problemas com os fenômenos de adsorção irreversíveis (contaminação) quando eletrodos sólidos são usados [74]. No uso de métodos de análise em fluxo com detecção amperométrica pulsada, o problema de contaminação do eletrodo pode ser evitado pela aplicação repetitiva e alternada em função do tempo de pulsos de potenciais de limpeza ao eletrodo de trabalho [29, 32, 77-80]. No entanto, de acordo com nosso conhecimento, a amperometria pulsada foi pouco utilizada como modo de detecção em sistemas BIA até hoje [20, 81], provavelmente porque a maioria dos estudos empregando BIA com detecção amperométrica foram realizados sem agitação da solução, sendo que a limpeza eletroquímica é mais ou somente é eficaz com o meio (solução) sob movimento constante. Idealmente, o modo de agitação utilizado em sistemas BIA também deveria apresentar características portáteis [20].

Recentemente, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com sucesso com o acoplamento de sistemas BIA com detecção por MPA (BIA-MPA). No primeiro trabalho demonstramos a possibilidade da determinação direta do antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) em biodiesel [82]. A amostra de biodiesel somente foi diluída (única etapa de preparação da amostra) e diretamente injetada sobre a superfície do eletrodo de trabalho (diamante dopado com boro) imerso em uma solução hidroetanólica (50:50; v/v) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 . A amperometria de múltiplos pulsos foi utilizada na obtenção do voltamograma hidrodinâmico no sistema BIA, aplicando dez pulsos de potenciais (de +0,7V a +1,6V) e aquisição de 10 amperogramas em função do tempo. Na determinação de BHA, a amperometria convencional foi utilizada. A metodologia apresentou vantagens em análises de biodiesel, tais como: baixo desvio padrão relativo entre injeções sucessivas (0,29%, $n=20$), alta frequência analítica (120 injeções por hora), valores adequados de recuperação (93-101%) e baixos limites de detecção (100 ng de BHA por grama de biodiesel). De acordo com os autores, o método pode ser adaptado na determinação de outros antioxidantes em amostras de biodiesel.

A associação da amperometria de múltiplos pulsos também possibilitou determinações simultâneas em sistemas BIA usando somente um eletrodo de trabalho, [33]. Neste caso, utilizou-se a aplicação de apenas dois pulsos de potenciais na determinação de dois compostos em diferentes amostras (biodiesel e formulações farmacêuticas). A detecção e quantificação seletiva de cada composto foi possível mediante uso de um fator de correção (já citado anteriormente e usado em FIA). Neste trabalho foi demonstrada a possibilidade de determinação simultânea de PA e CA ou DI e CA em formulações farmacêuticas e dos antioxidantes TBHQ e BHA em biodiesel. A

metodologia é rápida (mais de 60 injeções por hora), simples e pode ser facilmente adaptada para análises “*in-situ*”, de acordo com os autores.

A possibilidade de determinação de etanol em gasolina e álcool combustível também foi demonstrada utilizando BIA-MPA [20]. Neste caso, é mais correto afirmar de que se trata de BIA com detecção amperométrica pulsada, pois a corrente gerada em um pulso de potencial era usada na quantificação. Os demais pulsos eram usados para limpeza e ativação do eletrodo de trabalho. Neste trabalho, uma alíquota da amostra adequadamente diluída é diretamente injetada sobre o eletrodo de ouro imerso em solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹. Os resultados obtidos pela metodologia proposta foram comparados com cromatografia a gás com a obtenção de resultados similares. A metodologia é simples, precisa, rápida (180 injeções por hora) e pode ser facilmente adaptada para análises em campo.

O sistema BIA-MPA também foi utilizado na determinação de peróxido de hidrogênio em amostras de leite utilizando eletrodo compósito de grafite modificado com azul da Prússia [83]. Amostras de leite foram apenas diluídas em 10 vezes no eletrólito suporte antes das análises. A metodologia proposta é precisa (DPR 1,6%, n=5) e rápida (80 análises por hora). Segundo os autores, a superfície do eletrodo de trabalho modificado pode ser limpa e/ou renovada por simples polimento mecânico, sendo que a estabilidade de armazenamento deste eletrodo é de mais de um ano.

A determinação simultânea dos antioxidantes BHA e TBHQ em biodiesel também foi realizada por BIA-MPA [35]. Uma sequência de pulsos de potenciais foi selecionada para detectar TBHQ e BHA separadamente em uma etapa única de injeção sobre o eletrodo de carbono vítreo posicionado em um sistema BIA. As amostras foram diluídas em solução hidroetanólica (50:50; v/v) com 0,1 mol L⁻¹ de HClO₄ antes da injeção. A

metodologia se mostrou precisa (recuperação entre 100 e 110%), rápida (170 injeções por hora), precisa (DPR menor que 1%), com baixos limites de detecção (73 e 75 nmol L⁻¹ para BHA e TBHQ, respectivamente) e pode ser facilmente adaptada para determinação em campo.

A determinação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi realizada por amperometria em sistemas BIA [84] em uma rede de microeletrodos de ouro modificados com platina. Segundo os autores, o método de análise é simples, rápido (pode atingir até 300 determinações por hora), seletivo e muito prático para determinação de H₂O₂ na faixa de concentração de 0,8 a 100 µmol L⁻¹. O limite de detecção foi estimado em 0,34 µmol L⁻¹.

1.5. Método do Padrão Interno (PI)

A química é uma ciência que possui fundamento empírico e apresenta um importante papel experimental para entendimento do comportamento da matéria. Entretanto, as medidas experimentais envolvem erros e incertezas que são a somatória de erros cometidos durante todas as etapas das medidas experimentais. Os erros envolvidos são parte integrante do mundo quantitativo sendo impossível realizar uma análise química totalmente livre de erros ou incertezas. Este assunto ganha destaque quanto se considera a química analítica devido a sua importância no desenvolvimento de metodologias e instrumentação para obtenção de informações precisas sobre a composição da matéria. Os erros associados às medidas experimentais podem afetar algumas propriedades analíticas, tais como a exatidão e a precisão dos resultados. A indicação da incerteza no resultado analítico é de suma importância para garantir a qualidade dos processos de medição e viabilizar a avaliação da informação gerada após uma análise química [85-89].

Os principais erros experimentais que podem ocorrer durante uma análise são os seguintes [90]:

- a) Erros aleatórios ou indeterminados: são provocados por muitas variáveis incontrolláveis que são parte inevitável em toda análise. Pode-se citar como exemplos destes: julgamentos visuais, tais como nível de água, variações no tempo de escoamento e no ângulo da pipeta durante seu escoamento, flutuações na temperatura, que afetam o volume da pipeta, viscosidade do líquido e o desempenho da balança e vibrações, correntes de ar que causam pequenas variações nas leituras da balança. A média e o desvio padrão de um conjunto de medidas são utilizados para avaliar a magnitude dos erros aleatórios.
- b) Erros sistemáticos ou determinados: são devidos às alterações operacionais bem definidas no processo analítico tal como a perda despercebida do analito durante um aquecimento de uma amostra.
- c) Erro grosseiro: ocorrem normalmente de forma ocasional e são com frequência resultados de erros humanos. Os erros grosseiros levam à ocorrência de resultados que diferem de todos os outros dados de um conjunto de réplicas.

Em química analítica, o método do padrão interno (PI) tem sido empregado como uma alternativa para minimizar os erros aleatórios e/ou sistemáticos provocados durante a obtenção do sinal analítico [91]. A substância a ser considerada como padrão interno deve apresentar características muito próximas as do analito, mas que apresente um sinal analítico separado da espécie de interesse. Neste método, uma mesma quantidade conhecida da espécie que atua como PI é adicionada a todas as soluções amostra e padrão [92]. O princípio desta metodologia está baseado no fato que supostamente, tanto o analito, como o padrão interno estão propensos a influências similares da matriz da amostra e de que ambos são perturbados igualmente pelas alterações nas condições

instrumentais ou operacionais [92]. A resposta (sinal) não é aquela do próprio analito, mas sim da razão entre o sinal do analito e o da espécie usada como PI. A partir da razão obtida pode-se preparar uma curva analítica na qual o eixo y é a razão entre as respostas e o eixo x, a concentração do analito nas soluções padrões [90]. O método do PI é comumente utilizado em técnicas de separação como a cromatografia [93-100] e eletroforese capilar [101-109]. A introdução do método do padrão interno em técnicas de separação é mais simples, uma vez que há a possibilidade de ajuste das condições de separação para obtenção do pico obtido pelo padrão interno que deve estar bem separado dos picos dos outros componentes da amostra [90].

Considerando apenas técnicas eletroanalíticas e de acordo com nosso conhecimento, poucos estudos foram relatados na literatura onde o método do PI foi utilizado. Índio (III) foi utilizado como padrão interno na determinação de cádmio, cobre e chumbo aplicando a voltametria de pulso diferencial com redissolução anódica [110]. Em cada solução analisada, o pico de redissolução do íon de interesse foi normalizado em relação à altura do pico de uma concentração conhecida e com adição de índio (III) na amostra ou solução padrão. A curva analítica é construída utilizando as alturas de pico normalizadas.

O índio (III) também foi usado como padrão interno em outro trabalho [111], na determinação de chumbo em sangue utilizando um filme de mercúrio e uma rede de microeletrodos através da técnica de voltametria de onda quadrada com redissolução anódica. Segundo os autores, o índio foi adequado para utilização como PI porque possui uma baixa concentração endógena e devido à boa separação (resolução) existente entre os picos de redissolução anódica de cádmio, índio e chumbo nas condições usadas. Nas condições otimizadas neste trabalho, a razão entre os picos do chumbo e índio

apresentaram uma faixa linear de reposta entre 12 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para determinação de chumbo em amostras de sangue.

Outra metodologia para análise de chumbo em sangue foi proposta por Yang *et al.*, [112] utilizando eletrodos descartáveis. O uso de tálio (III) como padrão interno simplificou a calibração dos eletrodos descartáveis (carbono impresso banhado de mercúrio pré anodizado) na quantificação de chumbo no sangue. Sob as condições otimizadas, a relação entre as corrente de pico de chumbo e tálio foi linear entre 1 a 300 ppb ($r = 0,999$ e $LD = 0,23$ ppb).

Wang *et al.*, [113] demonstraram que a oxidação de filme de bismuto formado “in situ”(em todas as análises) é utilizada como PI nas análises de chumbo empregando a técnica de voltametria de redissolução anódica. Um baixo DPR (1,5%, $n = 8$) foi atingido utilizando a normalização com o PI ($i_{\text{Pb}}/i_{\text{Bi}}$). A razão entre os picos do Pb e Bi apresentaram uma faixa linear de reposta entre 25 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($R = 0,994$).

Outra abordagem para utilização do PI em voltametria de redissolução foi demonstrado experimentalmente por Brown *et al.*, [114]. Os autores propuseram um método no qual os analitos que estavam sob investigação (Zn, Cd, Pb e Cu) atuassem como padrões internos uns dos outros sem adição de padrão interno extra. Assim, na determinação de Cd e Zn, o PI que apresentou o melhor resultado é o Pb presente na amostra. Na determinação de Pb ou Cu, o PI com melhor desempenho foi o Cd e Zn, respectivamente.

O ferrocianeto de potássio foi utilizado como PI em análise de etanol em vinho por Ji *et al.*, [115]. O uso deste PI resolveu problemas em relação à contaminação do eletrodo de trabalho após longos períodos de trabalho e ruídos na linha base poderiam ser superados com a razão entre analito e PI. Técnicas voltamétricas foram utilizadas em meio de 0,1 mol L^{-1} de NaOH e platina como eletrodo de trabalho. O LD foi de 0,012%

(v/v) por voltametria de onda quadrada e 0,023% (v/v) por voltametria cíclica. O estudo de repetibilidade apresentou um desvio padrão relativo entre 2,5 a 3,3% (n=8).

Em todos os casos supracitados, o método do PI foi utilizado para compensar erros aleatórios na determinação de metais pesados utilizando voltametria de redissolução, com exceção ao uso da voltametria cíclica na análise de etanol em vinhos [115]. Nenhum trabalho foi localizado na literatura onde o método do PI foi implementado utilizando a detecção amperométrica acoplada a sistemas de injeção em fluxo ou em batelada.

1.6. Diclofenaco (DCF)

O DCF (Figura 2) é conhecido há mais de 30 anos e é um antiinflamatório não esteroideal (NSAIDs - do inglês, *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) com propriedades antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas. É prescrito no tratamento sintomático, em longo prazo, da artrite reumatóide, da osteoartrite e da espondilite anquilosante. Também é útil no tratamento, em curto prazo, da dor musculoesquelética aguda e dismenorreia [116, 117].

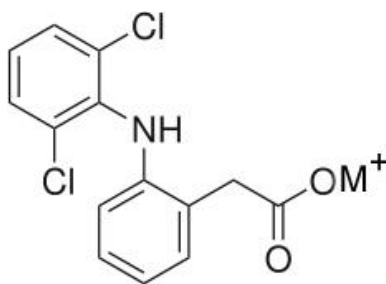


Figura 2: Fórmula estrutural do diclofenaco (M⁺ = Na⁺ ou K⁺ ou NH₄⁺).

A dosagem diária recomendada varia de 50 a 150 mg. O DCF é bem tolerado e devido a isto, é um NSAIDs de primeira escolha usado no tratamento de condições

crônicas e antiinflamatórias [118]. Porém, em uma alta dosagem, vários efeitos indesejados podem acontecer durante tratamento, principalmente sobre o trato gastrointestinal, que incluem irritação, sangramento, ulcerações e, eventualmente, perfurações na parede gástrica [119, 120]. Então, o controle de qualidade em formulações farmacêuticas é essencial.

1.6.1. Métodos analíticos para determinação de DCF

Vários métodos analíticos têm sido descritos na literatura para determinação do DCF, tanto em fluidos biológicos quanto em formulações farmacêuticas.

Em análises de preparações farmacêuticas diversos métodos podem empregados, tais como, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês, *high performance liquid chromatography*) [121-125], a espectrofotometria [126-128], a espectrofluorometria [129, 130], a cromatografia a gás [117, 131] e eletroforese capilar [132-134]. Em fluídos biológicos (amostras mais complexas), os métodos cromatográficos são essenciais na determinação do DCF. Dentre estes, podemos incluir a cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons [135], cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa [136] e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa [137, 138].

Considerando que os métodos eletroquímicos são o foco de estudo deste trabalho, uma revisão mais detalhada se faz nesta área.

Daneshgar *et al.* demonstraram que eletrodos de pasta de carbono modificados por nanofios de carbono possuem boa sensibilidade na determinação de DCF [118]. Além da inovação no eletrodo de trabalho, os autores também utilizaram uma nova técnica de detecção denominada voltametria de onda quadrada com transformada rápida de Fourier. Usando esta técnica, o eletrodo modificado e tampão acetato 0,05 mol L⁻¹ como

eletrólito suporte, o DCF apresentou um pico de oxidação irreversível em 850 mV vs Ag/AgCl. O LD para o DCF foi de 2,0 nmol L⁻¹. O percentual de recuperação obtido em amostras farmacêuticas foi de 99,96 %.

Em outro trabalho, Blanco-Lopez *et al.* demonstraram a possibilidade de determinação de DCF usando voltametria adsortiva de redissolução anódica por pulso diferencial e um eletrodo de carbono vítreo modificado com polímeros molecularmente impressos [139]. Segundo os autores, os melhores resultados foram obtidos em meio de solução aquosa de tampão citrato 0,025 mol L⁻¹ (pH = 6): acetonitrila (90:10, respectivamente). O método proposto apresentou boa seletividade na presença de anti-inflamatórios similares como os ácidos niflúmico e meclofenâmico. No entanto, a contaminação do sensor com os produtos de oxidação do DCF é uma limitação do método. Como alternativa, o uso de eletrodos descartáveis é sugerido.

Posteriormente, Blanco-Lopez *et al.*, [140] publicaram outro trabalho onde estudaram o comportamento eletroquímico do DCF com três tipos de eletrodos: grafite, compósito de carbono sem modificação e compósito de carbono modificado com polímeros impressos. Utilizando eletrodo de grafite em meio de HClO₄ 0,1 mol L⁻¹, o DCF apresenta um pico de oxidação em +0,842 V. O produto de oxidação gerado apresenta processo eletroquímico reversível com picos em +0,39 e +0,62 V. Os eletrodos compósitos de carbono também geraram resultados semelhantes aos obtidos por eletrodos de grafite. A faixa linear de resposta para o DCF foi de 0,06 a 1 µmol L⁻¹ e o LD calculado em 50 nmol L⁻¹.

Na publicação de um terceiro trabalho de determinação de DCF, Blanco-Lopez *et al.*, [141] descreveram o uso de polímeros molecularmente impressos para a determinação deste fármaco em urina por voltametria adsortiva de redissolução anódica e pulso diferencial. O DCF apresentou resposta linear na faixa de concentração entre 5,4

nmol L⁻¹ a 0,54 µmol L⁻¹. O LD para o DCF encontrado foi de 1,6 nmol L⁻¹. A porcentagem de recuperação para diferentes níveis de concentração de DCF (n=3) variaram de 98 a 99%.

Em outro trabalho, DCF foi determinado em urina e em amostras farmacêuticas utilizando voltametria de onda quadrada através de um sensor de grafite pirolítico de borda plana [26]. A oxidação do DCF apresentou um pico único (500 mV) bem definido e dependente do pH (tampão fosfato pH = 7,2). A corrente aumenta linearmente com a concentração de DCF na faixa de 10 - 100 nmol L⁻¹ e o LD foi calculado em 6,2 nmol L⁻¹. Segundo os autores, o método é simples, confiável, preciso, estável, reprodutível e faz uso de instrumentação barata.

O DCF também foi quantificado usando um eletrodo composto (grafite/epóxi) contendo zeólita modificada com cobre [142]. Este eletrodo exibiu um efeito eletrocalítico frente à oxidação do DCF em meio NaOH 0,1 mol L⁻¹ permitindo a sua determinação. As técnicas de cronoamperometria e voltametria de pulso diferencial foram utilizadas para analisar a dependência da corrente com a concentração de DCF. Segundo os autores, o sensor oferece uma alta sensibilidade e baixo LD (5 x 10⁻⁸ mol L⁻¹) e pode ser usado para determinar DCF em níveis de traço.

Rodriguez *et al.* [143] descreveram um detector amperométrico tubular de filme de bismuto que foi instalado como parte de um sistema de análise por injeção em fluxo onde a propulsão é controlada por multi-seringas (MSFIA, do inglês “*multisyringe flow injection analysis*”). Este sistema foi usado na determinação de DCF em formulações farmacêuticas. O método automatizado permite a regeneração contínua e automática do filme de bismuto (a cada 30 injeções), impedindo a passivação do detector melhorando a sensibilidade e repetibilidade do sistema (DPR = 3,5%; n = 30). O método apresentou intervalo linear de resposta entre 6 a 50 µmol L⁻¹, LD de 4,3 µmol L⁻¹ e frequência

analítica de 90 injeções por hora. A metodologia proposta foi validada comparando-se os resultados obtidos com os fornecidos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. Os resultados obtidos foram similares a um nível de confiança de 95%.

Santini *et al.* [144] propuseram o uso de um eletrodo compósito modificado com Pt/Hg/Hg₂(DCF)₂ para análise potenciométrica de DCF em amostras farmacêuticas. A resposta do eletrodo para DCF apresentou boa sensibilidade ($58,1 \pm 0,8$ mV por década) na faixa de concentração $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, com LD igual a $32 \mu\text{mol L}^{-1}$. Segundo os autores, o eletrodo é facilmente construído e apresenta um custo relativamente baixo.

Em todos os métodos eletroquímicos citados até aqui para determinação de DCF, eletrodos modificados foram utilizados, o que se deve à gradual passivação ou contaminação presente quando eletrodos de trabalho sólidos não modificados são utilizados. Estudos envolvendo eletrodos modificados são com certeza uma das mais extensas áreas de pesquisa em eletroquímica/eletroanalítica. Porém, o que algumas vezes não é enfatizado é que a etapa de modificação dos eletrodos é um processo tedioso e trabalhoso, fato que limita a utilização deste tipo de eletrodo em análises de rotina.

1.7. Codeína (CO)

A CO (Figura 3) é um dos mais importantes alcalóides do grupo dos opióides sendo preparada através da metilação da morfina e podendo ser encontrada no ópio em baixas concentrações [145, 146].

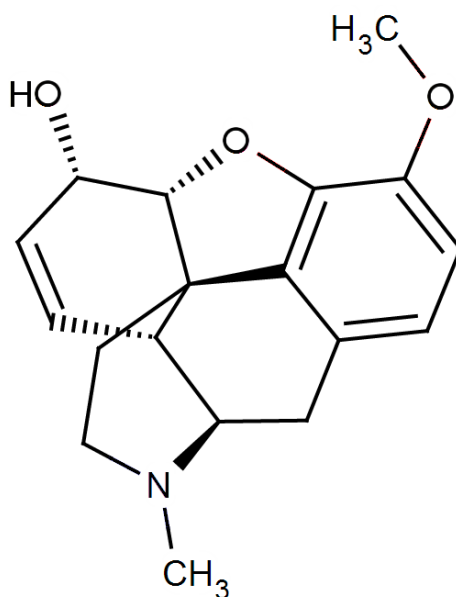


Figura 3: Fórmula estrutural da Codeína.

O fosfato de codeína é usado em todo o mundo e possui efeito analgésico para dores com efeito moderado a grave. Frequentemente é combinada com analgésicos não opióides, tais como aspirina, paracetamol e DCF. A CO também é utilizada como antitussígeno [147, 148]. Há evidências de que o efeito analgésico da CO é mediado pela morfina *o*-desmetilada, uma vez que quantidades vestigiais de morfina são formadas após sua administração [146]. Como analgésico, a dose deve ser ajustada de acordo com a intensidade da dor e com a sensibilidade de cada paciente. A dosagem usual varia de 30 a 60 mg a cada 4 horas até um máximo de 240 mg por dia. Em sintomas de tosse podem ser administradas doses de 15 a 30 mg três ou quatro vezes diariamente. O uso deste fármaco pode gerar graves efeitos adversos como diarreia, náuseas, vômitos, obstipação intestinal, secura da boca, prurido, confusão, sedação e depressão respiratória. Além disso, a CO pode criar vício e ser usada como droga de abuso, embora muito menos frequente do que outros opióides. Após finalizar o tratamento, ao ser retirado abruptamente, a abstinência de CO pode causar reações

relativamente fortes no organismo, como dores abdominais seguidas de vômito e prisão de ventre [149].

Uma superdosagem com este opióide é considerada grave e é caracterizada por depressão respiratória, queda da pressão arterial, insuficiência circulatória e aprofundamento do coma. Podem ocorrer convulsões, especialmente em crianças [150]. Em 1982, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou um programa de alívio da dor de câncer. Este programa consta de uma escada analgésica de três degraus para o uso sequencial de drogas, no tratamento de dor proveniente do câncer. A subida de cada degrau baseia-se no aumento da força do analgésico dos fármacos a partir de analgésicos não opióides (degrau 1) seguindo para opióides fracos (degrau 2) e finalmente fortes (degrau 3). O primeiro degrau é caracterizado por pacientes com dores leves a moderados e indica usar drogas não opiáceas (por exemplo, aspirina) com a adição de uma droga adjuvante, sendo estas NSAIDs e paracetamol. Se a droga não opiácea, dada na dose e frequência recomendada não alivia a dor, passa-se para o segundo degrau (dor moderada), onde se adiciona um opiáceo fraco (por exemplo, fosfato de codeína). Se a combinação de opiáceo fraco com o não opiáceo também não for eficaz no alívio da dor (dor intensa), substitui-se o opiáceo fraco por um forte (morfina) [151].

O DCF é um NSAID que tem sido amplamente utilizado no tratamento de dores reumáticas e tem demonstrado boa eficácia no alívio da dor moderada a grave no câncer. Este composto se mostrou tão eficaz quanto uma combinação de aspirina e CO, mas apresentou melhor tolerabilidade [151]. Além disso, a combinação de fármacos antiinflamatórios (NSAIDs) com opióides foi recentemente utilizada para reduzir os requisitos de opióides. O propósito é obter uma melhora na analgesia sem aumentar os efeitos secundários de cada droga, mas mesmo trazendo estes benefícios, esta

combinação ainda tem uso clínico escasso [152]. A CO sozinha tem sido amplamente utilizada para alívio da dor pós-operatória ou também em combinação com paracetamol. No entanto, existem evidências que sugerem que esta combinação não é bem tolerada e que não oferece alternativa para o alívio da dor. Assim, outras combinações têm sido exploradas, tais como CO e DCF, onde há uma melhora analgésica em comparação com a administração de DCF sozinho, devido à interação sinérgica entre estes dois compostos em níveis diferentes de transmissão da dor [152].

1.7.1. Métodos analíticos para determinação de CO

Várias técnicas analíticas já foram empregadas na determinação de CO, entre elas, podemos citar a cromatografia líquida [153-158], a espectrometria de absorção molecular [159, 160], a fluorescência [161, 162] e a eletroquímica [145, 163-165]. Neste trabalho, uma breve revisão sobre o uso de técnicas eletroquímicas para este fim será abordada.

A CO foi determinada em formulações farmacêuticas por potenciometria utilizando membranas de PVC modificadas [145]. A seletividade da membrana de PVC (dioctil ftalato + dibutil sebacato) ao cátion CO foi obtida mediante sua modificação com uma associação entre cátions CO, tetrafenilborato e reineckate. Como principais características do método, os autores mencionam a rapidez (40 injeções h⁻¹), a estabilidade (variação de ± 2 mV em 3 semanas) e resposta obedecendo a equação de Nerst. Na determinação direta de CO, a recuperação média foi de 100,6% com um desvio padrão médio de $\pm 0,8\%$ (n = 24). Os resultados obtidos foram comparados favoravelmente com os obtidos através da metodologia da farmacopéia Britânica (titulação).

Em outro trabalho [163], a CO foi determinada simultaneamente com paracetamol e ácido ascórbico por voltametria de pulso diferencial em eletrodo de alumínio modificado por uma fina camada de paládio. Segundo os autores, o paládio metálico sobre um substrato de alumínio pode ser usado para a oxidação anódica de ácido ascórbico ($E_p = 0,2 \text{ V}$), paracetamol ($E_p = 0,6 \text{ V}$) e CO ($E_p = 0,95 \text{ V}$). Os voltamogramas de pulso diferencial registrados para os três compostos mostraram que os picos de oxidação estão bem definidos e que esta metodologia é adequada para a determinação simultânea e seletiva dos compostos em níveis de concentração na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os autores destacam ainda a facilidade de preparação do eletrodo, assim como seletividade e baixo LD ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para os três compostos).

A CO também foi determinada simultaneamente com morfina utilizando um eletrodo de alumínio modificado com paládio e um filme de azul da Prússia [164]. A amperometria hidrodinâmica (aplicação de potencial constante com a solução sob agitação) foi usada para determinação de CO e morfina em uma faixa de concentração entre $2\text{-}30$ e $2\text{-}50 \mu\text{mol L}^{-1}$ para CO e morfina, respectivamente. O LD do método foi de $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,73 \mu\text{mol L}^{-1}$ para morfina e CO, respectivamente. Além disto, a possibilidade de uso da técnica de voltametria de pulso diferencial também foi demonstrada, onde uma separação de pico de 200 mV foi obtida entre a morfina e CO.

Em outro trabalho, a CO foi determinada em formulações farmacêuticas usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica e voltametria de redissolução catódica por onda quadrada [165]. Neste trabalho foi utilizado um eletrodo impresso de carbono modificado com argila contendo nontronita e os dados foram comparados com eletrodo de carbono impresso sem modificação. Segundo os autores, o eletrodo impresso modificado apresentou uma melhor resposta para a CO. A curva de calibração em voltametria de onda quadrada foi linear na faixa de $2,5\text{-}45 \mu\text{mol L}^{-1}$ (com coeficiente

de correlação = 0,999) com LD igual a 20 nmol L⁻¹. Enquanto, que nas análises em fluxo, a linearidade foi na faixa de 0,625-15 µmol L⁻¹, com um LD de 125 nmol L⁻¹ empregando um volume de amostragem de 20 µL. A estabilidade do eletrodo foi avaliada no sistema em fluxo e uma excelente reprodutibilidade (n = 10) foi obtida, tanto para uma solução amostra, como para soluções padrão contendo 1 ppm e 4 ppm de CO (coeficiente de variação = 2,98; 1,39 e 2,14%, respectivamente). A quantificação de CO em urina e em drogas comerciais foi realizada pelo método de adição de padrão. Os estudos de recuperação feitos em amostras farmacêuticas e urina propiciaram resultados satisfatórios (96,8 - 105,9% e 98,42 - 102,76%, respectivamente).

Um número restrito de métodos para a determinação simultânea de CO e DCF foram localizados na literatura. Dentre eles, um faz uso de eletroforese capilar [166] e o outro de espectroscopia UV-vis usando a matriz inversa da lei de Beer-Lambert (CPA-matrix) [167].

Segundo nosso conhecimento, não existe trabalho na literatura onde DCF e COD são determinados simultaneamente por HPLC. Nos trabalhos existentes envolvendo DCF, COD e HPLC, as determinações são realizadas em cromatogramas diferentes [168-171]. Provavelmente isto se deve a diferença entre as propriedades dos dois compostos. O DCF pode ser considerado um ácido fraco (pK_a = 4,18) e a CO uma base fraca (pK_a=8,2) [172]. Na determinação de fármacos por HPLC, a coluna de separação C18 (características apolares) é normalmente empregada, e nesta condição, a determinação simultânea de DCF e CO não é possível. O DCF apresenta características apolares em pH abaixo de 3,0 (ganho de um próton; sem carga) e a CO em pH acima de 7,0 (perda de um próton; sem carga). Portanto, quando ambos os compostos forem dissolvidos na mesma fase móvel, um vai interagir fortemente com a fase estacionária da coluna e outro não ou vice-versa. Supõe-se que a eluição por gradiente não permita a

variação de pH neste intervalo (3 para 7) no mesmo cromatograma [173]. Adicionalmente, na detecção espectrofotométrica, problemas em relação a variações na absorvidade molar dos compostos em função do pH também podem estar presentes.

A determinação destes compostos também não é simultânea empregando espectrometria de massa, pois a CO é analisada no modo íon positivo e o DCF no modo íon negativo [168]. Nenhum trabalho foi localizado na literatura onde a detecção eletroquímica foi utilizada na determinação simultânea de DCF e CO.

1.8. Objetivos do trabalho

Os objetivos gerais deste trabalho de doutorado foram desenvolver novos métodos de análise usando FIA ou BIA com detecção amperométrica e propor estratégias para melhorar o desempenho deste tipo de detecção empregando eletrodos sólidos.

Basicamente, o trabalho foi dividido em duas partes:

1. Investigação da potencialidade da detecção MPA acoplada a sistemas FIA ou BIA na introdução do método do padrão interno (PI);
2. Desenvolvimento de novos procedimentos de análise: (a) determinação de DCF por FIA com detecção amperométrica; (b) determinação simultânea de DCF e CO por BIA com detecção por MPA.

Parte Experimental

2.1. Instrumentação

2.1.1. Detecção Eletroquímica

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

2.1.1.1. Eletrodos de trabalho

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

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

O material usado como eletrodo de BDD foi adquirido da empresa Adamant Technologies SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça. Trata-se de placas a base de silício ($0,7 \times 0,7 \text{ cm}$) com espessura de aproximadamente $1,2 \text{ mm}$ e cobertas com um fino filme de

diamante com nível de dopagem de boro de 7000 a 8000 ppm. Antes do início das medidas eletroquímicas, o eletrodo de BDD foi submetido a um processo de limpeza/ativação, uma vez que não seria possível a limpeza manual com polimento, pois se trata de um filme de BDD muito fino. Neste trabalho dois modos de limpeza eletroquímica foram empregados, uma anódica (aplicando um potencial de +2,0 V ou uma corrente de +0,01 A) em meio de tampão Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0) e uma catódica (aplicando-se um potencial de -2,0 V ou uma corrente de - 0,01 A) em meio de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹. Estes tratamentos são similares aos descritos na literatura [37, 44]. Os tempos de ativação (limpeza) variavam de 15 a 30 minutos. A limpeza catódica foi feita diariamente previamente ao uso. Já a limpeza anódica somente foi realizada quando o sinal voltamétrico registrado em voltametria cíclica em meio de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ superava uma corrente de 10 µA. Após a ativação anódica, sempre foi necessário fazer também a ativação catódica. O tempo de aplicação de cada limpeza foi definido mediante registro voltamétrico posterior. A limpeza era considerada adequada quando a corrente de fundo usando voltametria cíclica na faixa de potencial entre 0,0 e 1,4 V ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) em meio de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ ficava próxima a 1 µA.

2.1.1.2. Eletrodo de Referência

Em todos os experimentos utilizou-se um mini eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl_{sat.})[174] preparado no próprio laboratório pela eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag através da eletrólise de uma solução de HCl 0,10 mol L⁻¹, sob corrente constante de 0,2 mA, durante 2 h.

2.1.1.3. Eletrodo Auxiliar

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

2.1.1.4. Célula Eletroquímica para medidas estacionárias

Nas medidas voltamétricas estacionárias, utilizou-se uma célula convencional de vidro (béquer de 10 mL). Os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência foram posicionados na célula através de uma garra de fixação. Todos os experimentos foram realizados sem a remoção do O₂ dissolvido.

2.1.1.5. Sistema FIA

O sistema FIA usado era de linha única e composto por um sistema propulsor, um injetor, um detector eletroquímico e tubos de polietileno com 1,0 mm de diâmetro interno. O sistema de propulsão e controle da vazão foi desenvolvido no próprio laboratório [60] e consiste em um mini-compressor de ar acoplado a uma coluna de água conforme apresentado na Figura 4.

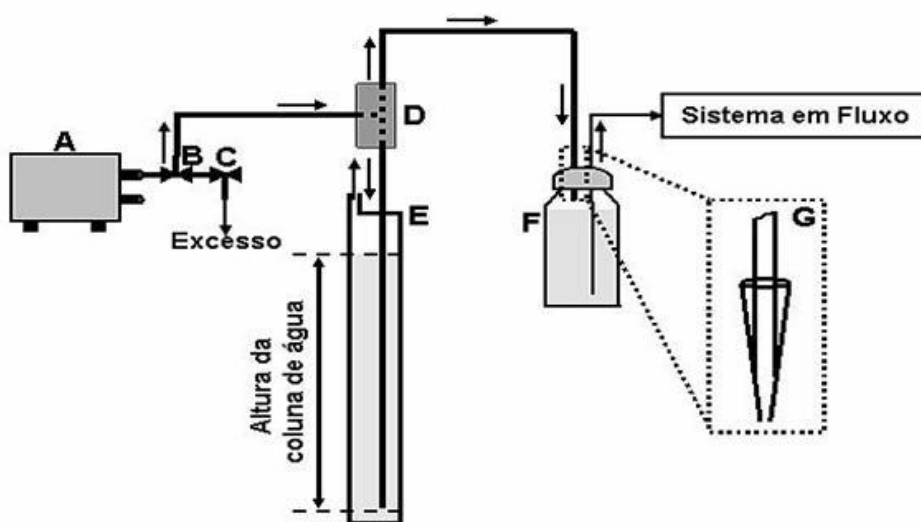


Figura 4: Esquema de montagem para utilização da pressão gerada por uma coluna de água para controle de vazão de sistemas em fluxo. (A) Mini-compressor de ar; (B, C) Válvulas usadas em aquarismo para divisão e controle de fluxo de ar; (D) Junção de acrílico tipo T; (E) Tubo de PVC – coluna de água; (F) Reservatório do carregador; (G) Vista ampliada da conexão do tubo de polietileno ao reservatório com eletrólito.

O injetor manual de acrílico utilizado foi adquirido do Cena/USP (Piracicaba) [175] e as células eletroquímicas foram desenvolvidas no próprio laboratório. As duas células eletroquímicas com possibilidade de posicionamento de três eletrodos usadas com os sistemas FIA são descritas a seguir.

Célula eletroquímica 1: para posicionamento dos eletrodos comerciais de GC e Au

Neste caso, utilizou-se uma célula eletroquímica do tipo “*wall-jet*” (Figura 5) com capacidade para acomodar três eletrodos, a qual foi construída no próprio laboratório. Mais detalhes sobre a construção da célula pode ser obtido em trabalho publicado anteriormente [176].

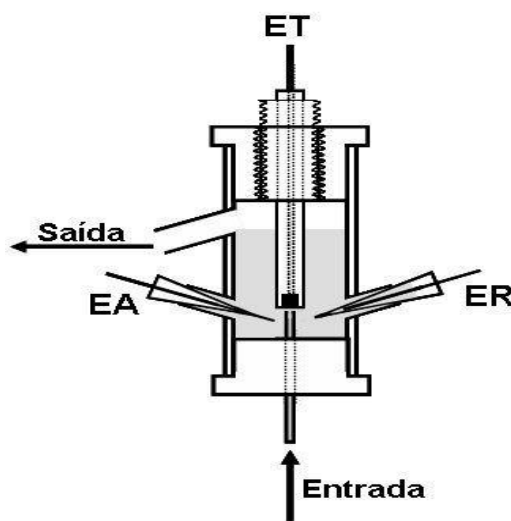


Figura 5: Célula eletroquímica do tipo “*wall-jet*” usada no trabalho para posicionamento dos eletrodos de trabalho de GC e Au em sistemas FIA. (EA) eletrodo auxiliar; (ER) eletrodo referência; (ET) eletrodo de trabalho.

Célula eletroquímica 2: para posicionamento do eletrodo de BDD

A célula também é do tipo “*wall-jet*” e foi construída a partir de um tarugo de teflon (2,0 cm de comprimento e 3,0 cm de diâmetro) com capacidade total de ~10 mL. Um orifício foi aberto em um dos lados do tarugo com 0,9cm de profundidade e 1,2 cm de diâmetro, permanecendo um dos lados ainda fechado constituindo a base inferior da célula. Nesta base, um pequeno orifício central (3,0 mm de diâmetro) foi aberto, onde é posicionado um anel de borracha (O-ring) e sobre este anel, a peça de BDD (0,7 x 0,7 cm) [177]. A área útil do eletrodo de BDD é definida pelo diâmetro interno deste anel (3 mm). Para fixação da peça de BDD e manter o contato elétrico, um pedaço de circuito impresso de cobre foi preso através de dois parafusos colados nas extremidades da parte inferior da célula. A parte superior da célula (tampa) contém três orifícios para o posicionamento dos eletrodos de referência e auxiliar, e um orifício central que contém um tubo de aço inox utilizado para entrada da solução transportadora. Como a superfície de BDD também foi posicionada ao centro da célula, mas no lado oposto, o tubo de aço inox foi posicionado no centro e a 2 mm do eletrodo.

Esta célula permite um fácil procedimento de limpeza eletroquímica e ser realizado com o eletrodo de trabalho posicionado em fluxo, sem a necessidade de desmontar a célula, o que pode ser considerado uma vantagem em relação à célula semelhante usada por outros autores [178].

Na Figura 6 está representado um esquema geral desta célula e na Figura 7 a imagem real da mesma.

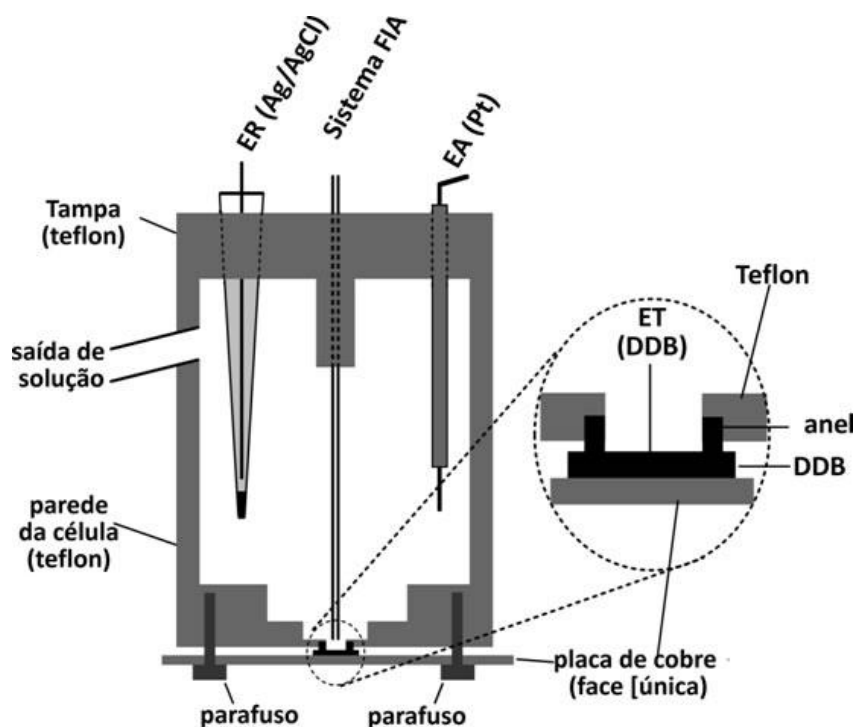


Figura 6: Representação esquemática da célula FIA para o eletrodo de trabalho de BDD.

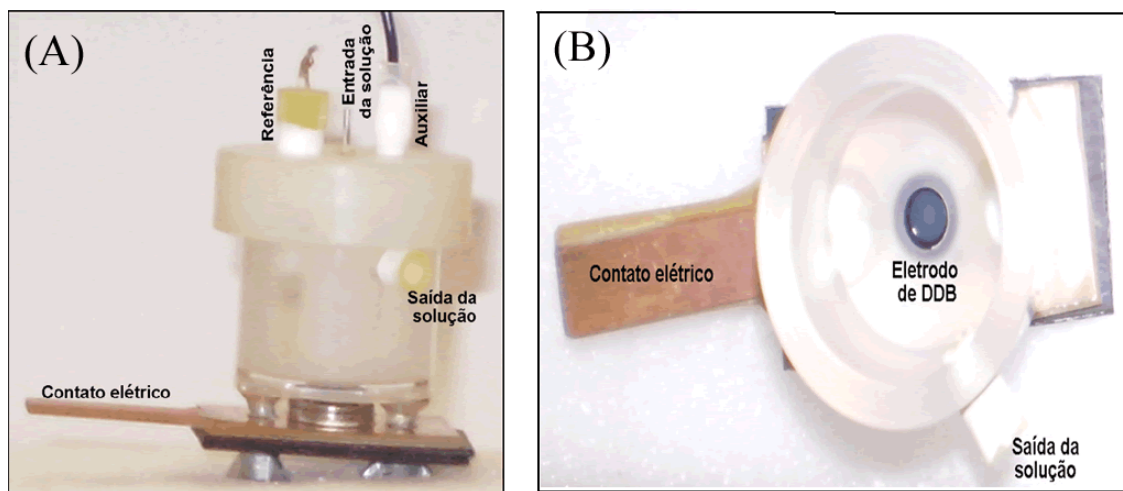


Figura 7: Imagem real da célula em fluxo utilizada para o posicionamento do eletrodo de trabalho de BDD. (A) Vista lateral com a tampa; (B) Vista superior sem a tampa.

2.1.1.6. Sistema BIA

Nos estudos com o sistema BIA, utilizou-se uma célula construída no próprio laboratório [82], constituído por um tubo de vidro com as seguintes dimensões: $\varnothing_{\text{interno}} = 6,5 \text{ cm}$; altura = 6,5 cm; volume total = $\approx 200 \text{ mL}$.

A Figura 8 ilustra um diagrama esquemático da célula BIA utilizada no trabalho com o posicionamento do micro-motor DC para agitação [20], sendo este de uso opcional.

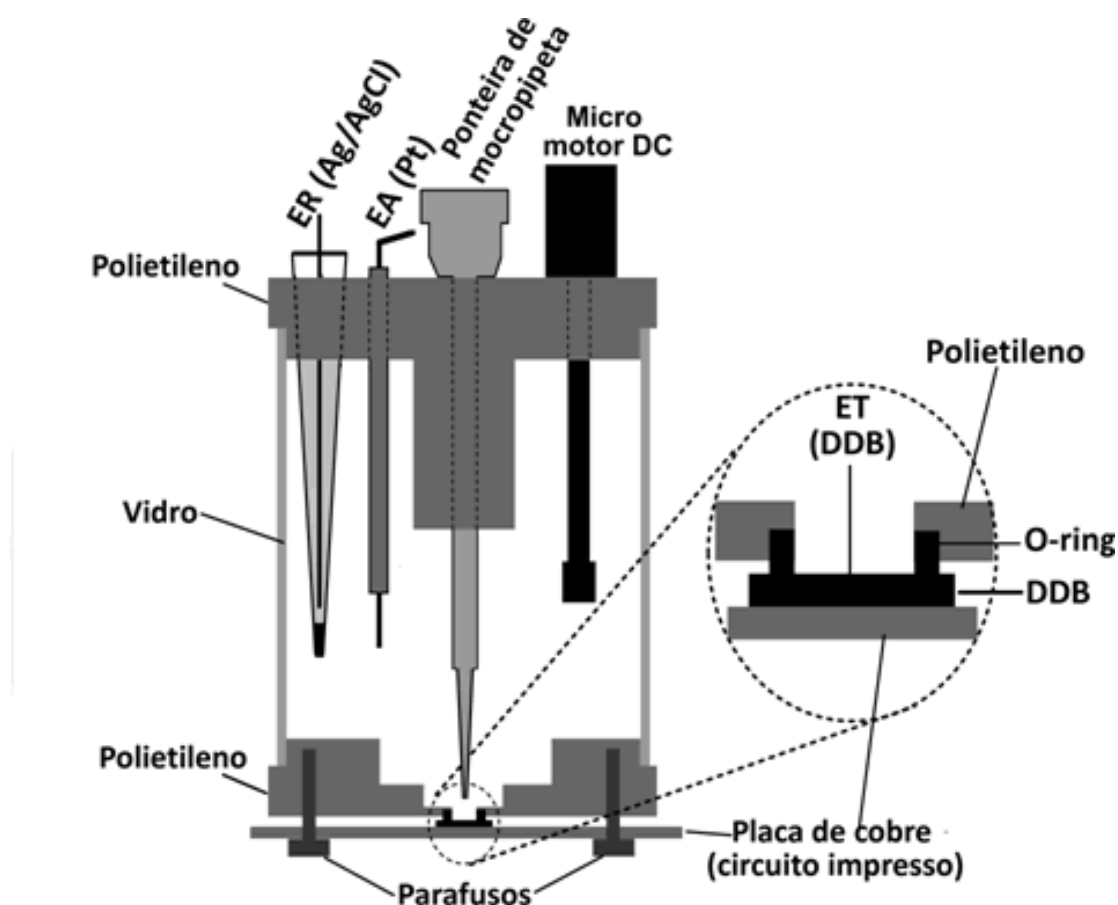


Figura 8: Representação esquemática da célula BIA com possibilidade de agitação.

Nas duas extremidades do tubo foram fixadas tampas de polietileno. Um orifício central foi feito nas duas tampas. Além do orifício central (para o posicionamento da ponteira do sistema de injeção), a tampa superior contém mais três orifícios: dois para fixação dos eletrodos auxiliar e referência e um para a inserção do agitador mecânico. O

sistema de agitação é composto por um micro-motor DC de 12 V usado originalmente em secadores de cabelo ou brinquedos elétricos. Ao eixo deste micro motor foi adaptado com uma haste de teflon [20] e a velocidade de agitação é controlada com uma fonte universal de tensão variável (3 a 12 V). Quanto maior a voltagem selecionada, maior é a rotação do motor.

Na tampa inferior foi posicionado o eletrodo BDD com auxílio de um anel de borracha de modo semelhante ao descrito anteriormente “célula eletroquímica 2” para o uso em sistema FIA. A célula foi construída de forma que durante a injeção, a ponteira fique posicionada a ~ 2 mm [73] do eletrodo de BDD com o objetivo de obter resultados reprodutíveis durante as análises. Para a injeção neste sistema utilizou-se uma pipeta motorizada (Eppendorf® Multipette stream) que permite injeções de 10 a 1000 μL (usando um combitip® de 1 mL) com velocidades de injeção de 28 a 250 $\mu\text{L s}^{-1}$, ou uma seringa descartável (BD Ultra-Fine II: 0,3 mL) cuja finalidade primeira é para aplicação de insulina. Quando a seringa descartável foi utilizada no procedimento de injeção, a tampa da parte superior da célula BIA foi substituída por outra contendo um orifício central com as dimensões exatas da seringa. Uma imagem da célula é apresentada na Figura 9.



Figura 9: Imagem da célula BIA usada nos estudos.

2.1.2. Análises cromatográficas

Foi utilizando o equipamento Shimadzu LC-10 VP equipado com um detector UV-VIS (SPD-10AV), uma coluna com fase estacionária C_{18} (Lychnispher 100 A° RP18-C18, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m), um degaseificador (DGU-20A5), um injetor manual com alça de amostragem de 20 μ L e uma bomba LC-10AD-VP.

2.2. Soluções, reagentes e preparação das amostras

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade superior a 18 $M\Omega\text{ cm}^{-1}$) obtida de sistema de purificação Milli-Q.plus (Millipore). Todos os reagentes utilizados apresentavam pureza analítica e foram usados sem purificação prévia. Os padrões de ácido úrico (AU), paracetamol (PA), cafeína (CA), dipirona (DI) e nova coquina (NC) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

DCF de sódio e potássio (DCF) e fosfato de codeína (CO) foram adquiridos da All Chemistry (São Paulo – Brasil) e terc-butilhidroquinona (TBHQ) foi obtido da Acros Organics (USA).

As soluções estoque de PA, CA, DI, NC, DCF e CO foram obtidas a partir da dissolução do padrão sólido em água deionizada, formando uma solução estoque com concentração de 10 mmol L^{-1} . Como o AU e o TBHQ são pouco solúveis em água deionizada, a solução estoque de AU foi preparada em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e de TBHQ em etanol absoluto. Na determinação simultânea DCF e CO, as soluções estoques destes compostos foram preparadas no mesmo balão volumétrico, obedecendo a razão em molaridade contida no medicamento. Todas estas soluções padrões foram previamente diluídas em eletrólitos de suporte apropriados ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ cada) usados nos estudos (tampão acetato (pH 4,7), ácido perclórico, ácido sulfúrico, tampão fosfato (pH 7,2)) para posterior injeção no sistema FIA-MPA e BIA-MPA.

No preparo das amostras farmacêuticas contendo DCF (Na ou K) e DCF associado com CO, os comprimidos presentes em uma cartela (9 comprimidos para o DCF e 5 comprimidos para DCF e CO) foram pesados em uma balança analítica (precisão de quatro casas decimais) e macerados utilizando um almofariz e pistilo de porcelana. O estoque das soluções amostra foi feito a partir de uma quantidade suficiente em massa para uma concentração final igual a 10 mmol L^{-1} para DCF e 7 mmol L^{-1} para CO. Na etapa seguinte, uma alíquota desta solução foi diluída em eletrólito suporte.

A fase móvel utilizada nos testes cromatográficos para determinação de DCF (Na ou K) foi constituída de 60% acetonitrila (grau cromatográfico e espectroscópico) e 40% de água deionizada com pH = 2,1 ajustado com ácido fosfórico. O comprimento de onda selecionado foi de 280 nm [179]. Na determinação de CO por cromatografia

líquida, a fase móvel utilizada foi composta de acetonitrila, tampão HAc/Ac⁻ (pH=6,9) e metanol (10:5:85 v/v) e o comprimento de onda do detector foi fixado em 254 nm [180].

Resultados e Discussão

3.1. Considerações Gerais

Os resultados e discussões abordados nesta tese serão divididos em duas partes. Na primeira parte, serão apresentados os estudos realizados para implementar o método do padrão interno em sistemas FIA ou BIA com detecção amperométrica de múltiplos pulsos. Na segunda parte, serão apresentados os estudos realizados com o desenvolvimento de um método para determinação de DCF e determinação simultânea de DCF e CO em formulações farmacêuticas.

3.2. Parte I - Introdução do método do padrão interno em sistemas FIA ou BIA com detecção MPA

3.2.1. Método do padrão Interno (PI) em sistema FIA-MPA

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a possibilidade de utilizar um sistema FIA de linha única com detecção amperométrica de múltiplos pulsos para detecção simultânea e seletiva de dois analitos utilizando um único eletrodo de trabalho [29-31]. A possibilidade de determinação simultânea de espécies usando somente um eletrodo de trabalho possibilitou o início dos estudos para tentar introduzir o método do padrão interno em sistemas FIA com detecção amperométrica.

Para demonstrar esta abordagem, o ácido úrico (AU) e ferricianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) foram adotados como analito modelo e padrão interno (PI), respectivamente.

3.2.1.1. Comportamento eletroquímico do AU e do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$

O comportamento eletroquímico do AU e do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ foi estudado utilizando um eletrodo de carbono vítreo em meio de H_2SO_4 0,2 mol L^{-1} por meio de voltametria

cíclica. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 10.

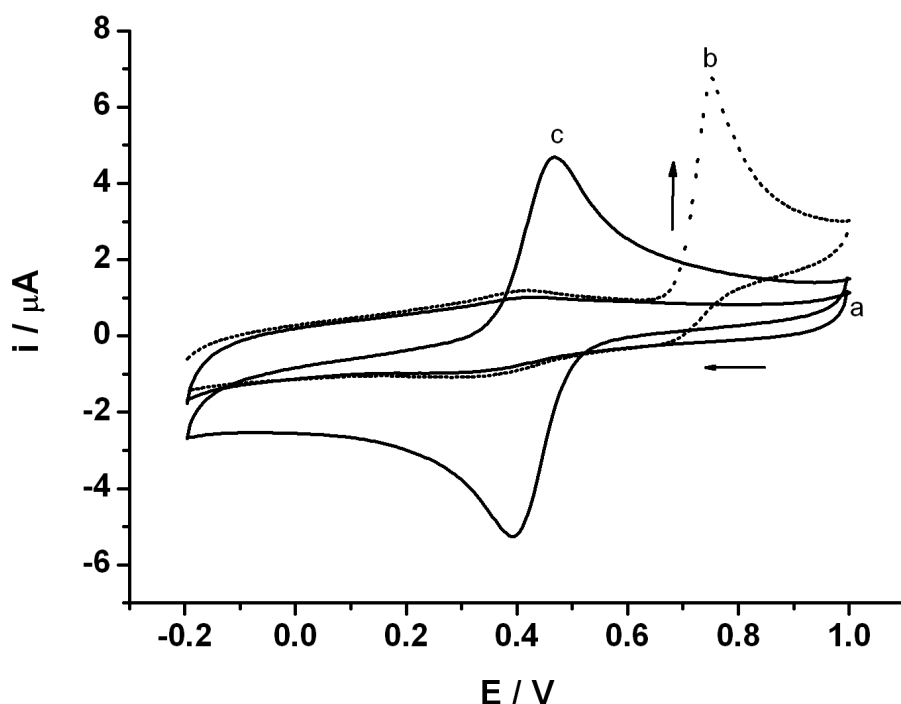


Figura 10: Voltamogramas cíclicos obtidos para soluções sem (a) e com a adição de 0,5 mmol L⁻¹ de AU (b) ou 0,3 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]³⁻ (c). Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,20 mol L⁻¹; ET: GC; Faixa de trabalho: -0,2 V a 1,0 V *vs* Ag/AgCl; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode-se observar, o AU apresenta um pico de oxidação bem definido em torno de +0,75 V, o que está de acordo com a literatura [181, 182]. O mecanismo de oxidação é um processo que envolve $2e^-$ e $2H^+$ para formar uma diimina. Já o [Fe(CN)₆]³⁻ apresenta um comportamento reversível com dois picos bem definidos: um referente à redução do Fe³⁺ em +0,4 V e outro referente à oxidação do Fe²⁺ eletroquimicamente gerado em +0,5 V.

3.2.1.2. Investigação para identificação dos pulsos de potenciais a serem usados em FIA-MPA para uso do método do PI

Para que o método do PI seja possível de ser usado em um sistema FIA-MPA, uma sequência de pulsos de potenciais necessita ser selecionada e aplicada continuamente ao longo de cada experimento, de modo que o analito e o PI sejam detectados individualmente e independentemente no mesmo eletrodo de trabalho.

Com base nos voltamogramas apresentados na Figura 10, o AU pode ser oxidado sem a interferência de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em potenciais mais positivos do que +0,70 V. Assim, para este estudo foi selecionado o pulso de potencial de +0,80 V para determinação do AU sem interferência do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. O $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, por sua vez, pode ser determinado (redução) sem interferência de AU em potenciais mais negativos do que +0,40 V. Nos estudos seguintes, o pulso de potencial de -0,05 V foi adotado para redução e detecção do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

Nos primeiros testes realizados empregando somente os dois pulsos de potenciais (-0,05 e +0,80 V), o produto de redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ gerado em -0,05 V foi oxidado em +0,80 V e uma interferência na detecção de AU passou a existir. Além disto, a oxidação do AU em +0,80 V contaminava lentamente o eletrodo de trabalho e uma queda na corrente de pico em função de sucessivas análises era observada. Para contornar este problema, dois pulsos de potenciais adicionais (MPA) foram incluídos no procedimento. Assim, o pulso de potencial de +0,60 V passou a ser aplicado duas vezes na sequência de pulsos selecionados. Na primeira aplicação (após o pulso de +0,80 V), a função é remover da superfície do eletrodo os produtos de oxidação do AU gerados em +0,80 V. Na segunda aplicação (após o pulso de -0,05 V), a função é remover o produto da redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ gerado em -0,05 V. Assim, o produto da oxidação do AU

deixou de contaminar gradativamente o eletrodo de trabalho de GC e o produto da redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ deixou de ser detectado em +0,8V. A eficácia desta abordagem está relacionada a dois fenômenos simultâneos: consumo eletroquímico e remoção dos produtos gerados pelo fluxo de solução da superfície do eletrodo de trabalho.

Na Figura 11A está apresentado o esquema da sequência dos pulsos de potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho para implementação do método do PI em um sistema FIA com detecção amperométrica. A Figura 11B apresenta os amperogramas obtidos nos pulsos de potenciais de +0,8 V e -0,05 V referentes às injeções em triplicata de três soluções distintas. Os amperogramas referentes às duas aplicações do pulso de +0,6 V não são apresentados. Na primeira injeção (Figura 11Ba), a solução contém apenas AU ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), na segunda (Figura 11Bb), apenas $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ($38 \mu\text{mol L}^{-1}$) e na terceira (Figura 11Bc) uma mistura de ambos os analitos na mesma concentração das soluções anteriores ($100 + 38 \mu\text{mol L}^{-1}$).

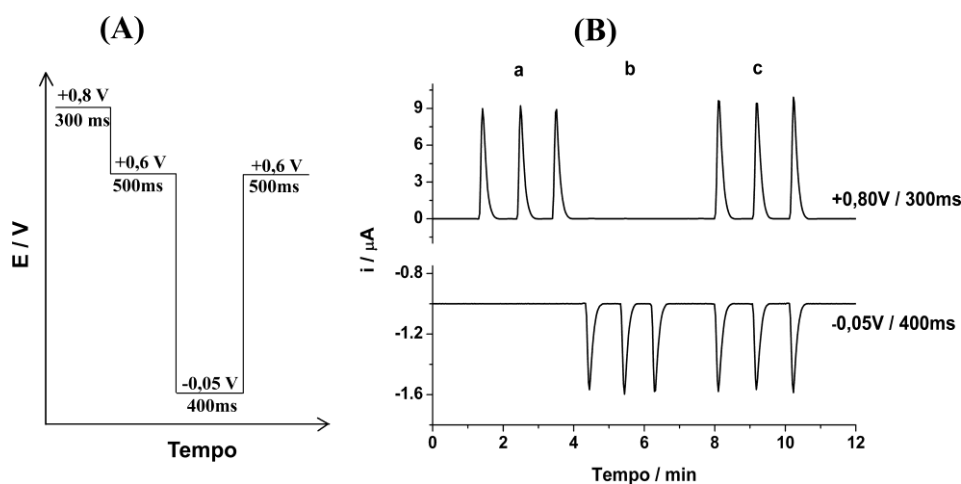


Figura 11: (A) Esquema da aplicação dos pulsos de potenciais aplicados no eletrodo de trabalho de GC. (B) Respostas amperométricas obtidas após injeção de soluções contendo $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU (a), $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (b) e (c) mistura de AU e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ na mesma concentração de “a” e “b” ($100 + 38 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente). Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,20 \text{ mol L}^{-1}$; vazão: $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume injetado: $300 \mu\text{L}$.

Como pode ser observado, no pulso de potencial de +0,80 V, apenas o AU é oxidado e no pulso de potencial de -0,05 V apenas o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ é reduzido. Observa-se ainda que a corrente detectada na injeção das soluções contendo apenas AU ou apenas $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ apresentam a mesma magnitude de corrente da solução contendo a mistura de AU + $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Assim, com esta sequência de pulsos de potenciais é possível detectar o AU e o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ seletivamente por FIA com detecção por MPA usando somente um eletrodo de trabalho.

3.2.1.3. Análise da eficiência do PI em sistemas FIA com detecção amperométrica

O método do padrão interno em sistemas FIA com detecção por MPA foi avaliado em relação à repetibilidade do sistema na presença de altas concentrações de AU (provável contaminação do eletrodo de trabalho), flutuações na vazão e volume de injeção, diferença de força iônica entre soluções padrões e amostras e formação ou inserção acidental de bolhas de ar no sistema. Cada estudo feito será descrito com detalhes a seguir.

3.2.1.3.1. Estabilidade do sistema FIA na presença de problemas de contaminação ou passivação do eletrodo

O método do padrão interno foi avaliado em relação ao seu desempenho em situação onde ocorre contaminação gradativa do eletrodo de trabalho (GC) quando soluções contendo AU são injetadas no sistema FIA. Inicialmente aplicou-se a sequência de pulsos de potenciais descritos no item 3.2.1.2, ou seja, um pulso de

potencial para detecção do AU (+0,8 V) e outro para detecção do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (-0,05 V) e dois pulsos de limpeza (+0,6V). Os amperogramas obtidos para este teste são apresentados na Figura 12.

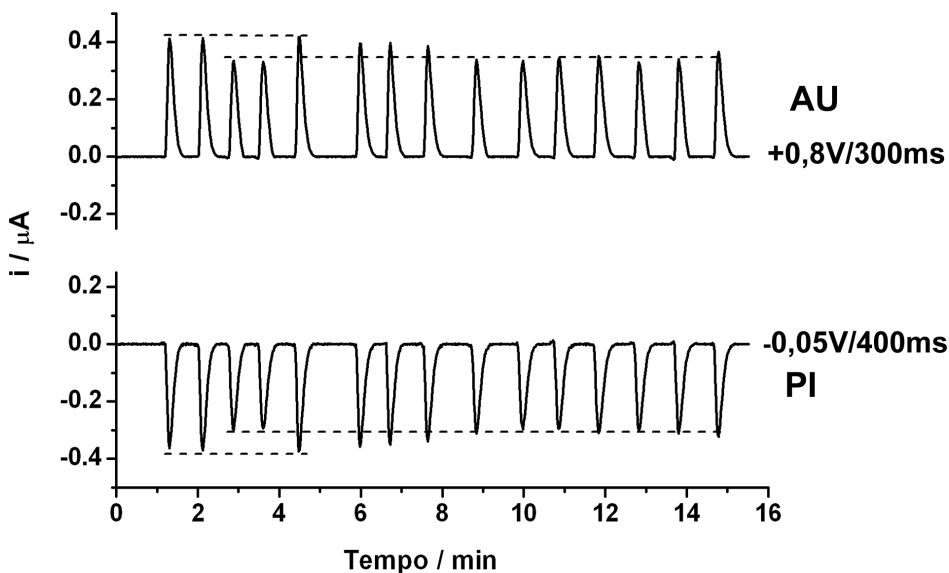


Figura 12: Amperogramas obtidos para injeções de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU e $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Demais condições experimentais: idem Figura 11.

Como podemos observar, aplicando a sequência dos pulsos de potenciais descrita no item 3.2.1.2, os potenciais de limpeza foram eficazes, pois não houve uma passivação e/ou contaminação considerável da superfície do eletrodo, uma vez que o sinal amperométrico do AU e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ manteve-se praticamente constante (RSD = 2,15 e 2,63% para AU e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, respectivamente; $n = 15$). Neste caso, o padrão interno é dispensável. É importante observar que mesmo assim, o perfil amperométrico de resposta do PI ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) é bem parecido com o de resposta do AU (oscilações similares), indicando que o PI é influenciado pelos mesmos parâmetros que o analito (AU).

Uma vez que os potenciais de limpeza permitem que não haja a contaminação/passivação do eletrodo de trabalho, uma alternativa foi usar uma nova

sequência de pulsos de potenciais para observar se haveria ou não contaminação da superfície eletródica. Então, a seguinte sequência de pulsos de potencial foi aplicada: +0,8 V (oxidação do AU); -0,05 V (redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) e +0,6 V para remoção/consumo do produto de redução do PI ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$). A mudança feita foi retirar o pulso de potencial de limpeza da sequência de pulsos aplicada nos estudos apresentados na Fig. 12 (+0,60 V após 0,80 V). A Figura 13 apresenta os amperogramas detectados neste estudo mediante injeções sucessivas de soluções padrão contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AU e 38 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

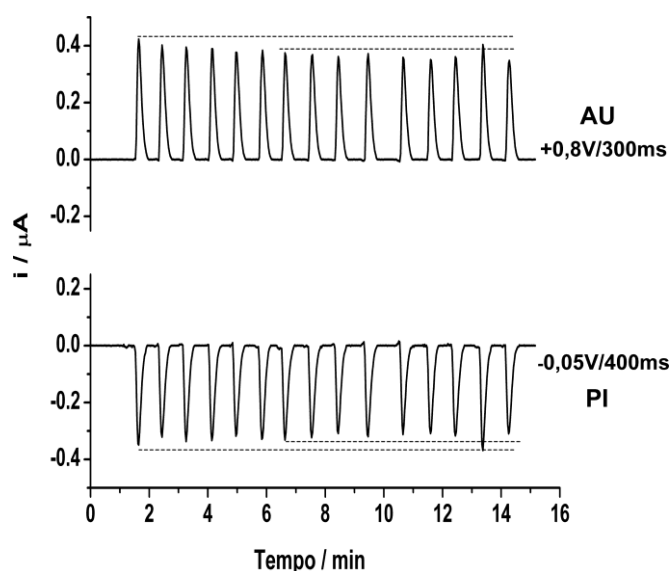


Figura 13. Amperograma para injeções de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AU e 38 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Pulsos aplicados: +0,8 V / 500 ms; -0,05 V / 400 ms e +0,6 V / 500 ms. Demais condições experimentais conforme Figura 11.

Conforme pode ser observado nos amperogramas da Figura 13, na ausência do pulso de potencial de limpeza (+0,60 V após 0,80 V) houve uma pequena contaminação/passivação do eletrodo de trabalho, o que pode ser observado por uma ligeira queda de corrente nos picos iniciais no amperograma detectado em +0,8 V. No entanto, após algumas injeções (após o 6º pico) houve uma estabilização do sinal analítico. Com o intuito de promover maior contaminação/passivação do eletrodo de

trabalho empregado e investigar a probabilidade do método do PI em anular este efeito, a concentração de AU foi aumentada de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 14).

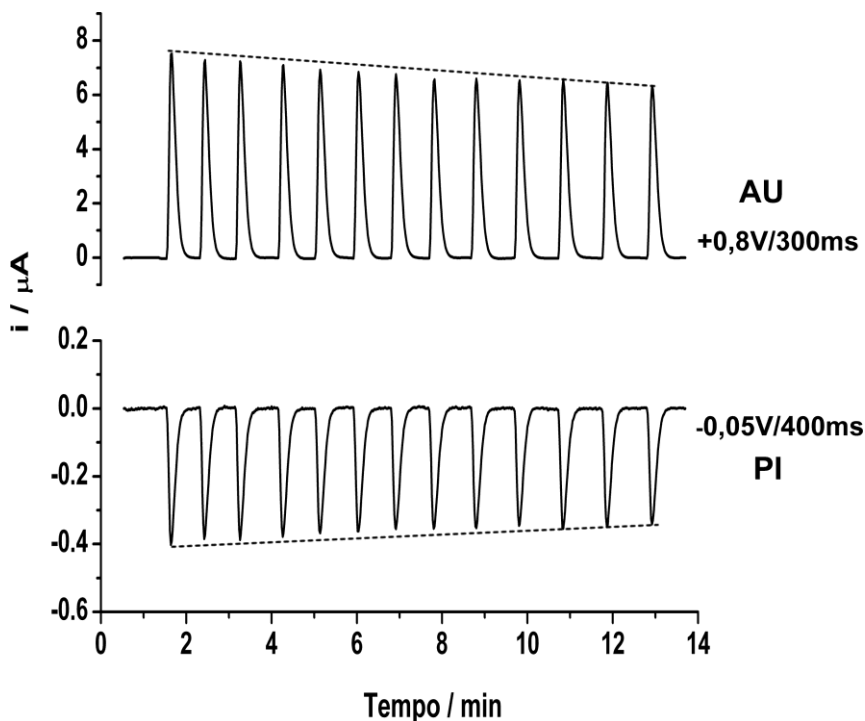


Figura 14. Amperogramas para injeções de $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU e $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Pulsos aplicados: $+0,8 \text{ V} / 500 \text{ ms}$; $-0,05 \text{ V} / 400 \text{ ms}$ e $+0,6 \text{ V} / 500 \text{ ms}$. Demais condições experimentais conforme Figura 11.

Como pode ser observado pelos amperogramas apresentados na Figura 14, com o aumento da concentração de AU, a superfície do eletrodo de trabalho foi passivando ou contaminando e o sinal amperométrico foi diminuindo a cada nova injeção, com uma variação de 16,5% na corrente detectada entre a primeira e décima terceira injeção. No entanto, após a normalização destes resultados ($i_{\text{AU em } +0,80 \text{ V}} / i_{\text{PI em } -0,05 \text{ V}}$), o desempenho do método pode ser considerado como sendo muito bom, pois a variação de 16,5% caiu para 2,5%. Esta comparação pode ser melhor visualizada na Figura 15.

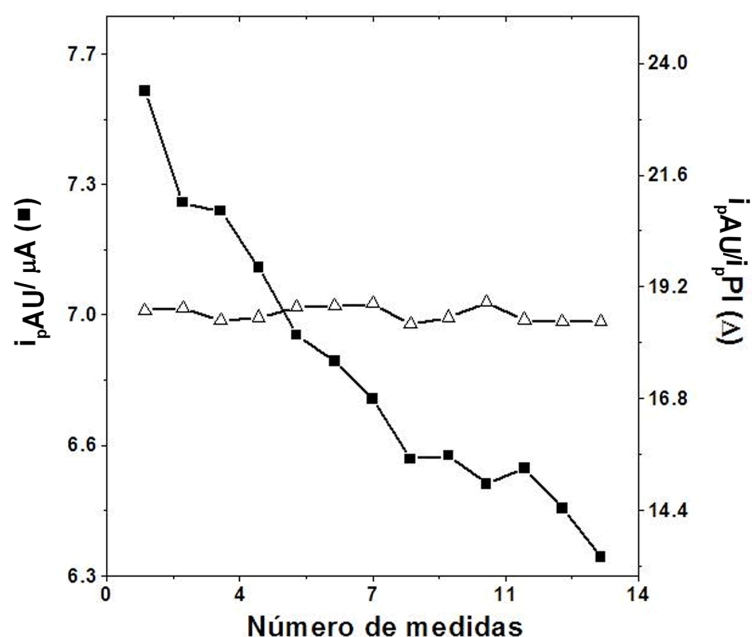


Figura 15. Comparação do desempenho do sistema FIA-MPA sem (■) e com (Δ; i_{AU}/i_{PI}) o uso do método do padrão interno em função de injeções sucessivas de solução padrão contendo $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU (analito) e $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (PI). Demais condições experimentais conforme Figura 11.

3.2.1.3.2. Variação na vazão da solução carregadora

A magnitude da resposta eletroquímica em sistemas FIA com detecção amperométrica pode variar consideravelmente em função de flutuações na vazão da solução transportadora [176]. Portanto, para obtenção de resultados precisos é imprescindível que a vazão no sistema permaneça constante durante todo o tempo de análise. A Figura 16A apresenta os amperogramas obtidos com 10 injeções de solução padrão contendo $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU a uma vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ e 10 injeções a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

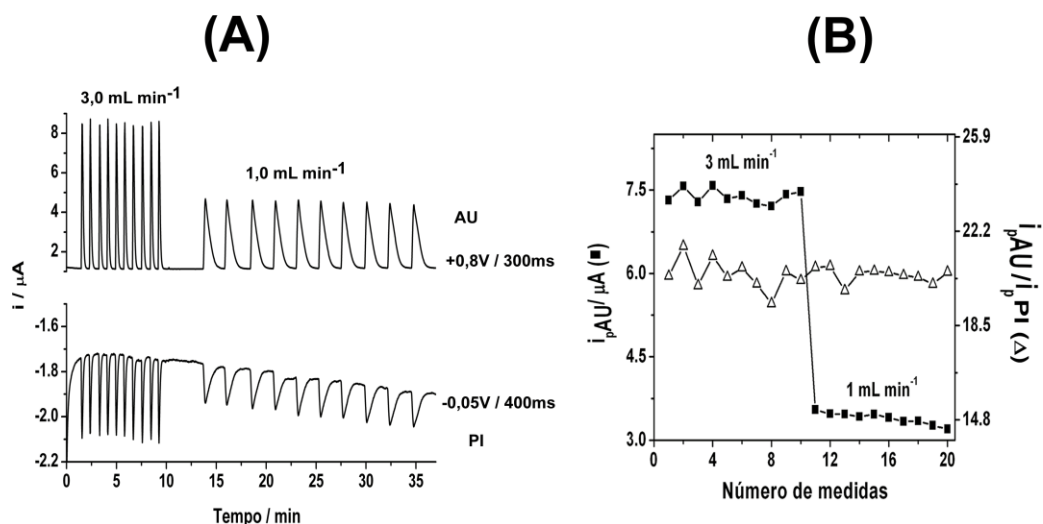


Figura 16. (A) Amperogramas obtidos para injeções de solução padrão contendo $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU e $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em função da variação da vazão do sistema de 3.0 para 1.0 mL min^{-1} . Pulsos de potenciais aplicados: +0,8V / 500ms; +0,6V / 500ms; -0,05V / 400ms e +0,6V / 500ms. (B). Comparação do desempenho do sistema FIA-MPA sem (■; i_{AU}) e com (Δ; i_{AU}/i_{PI}) o uso do método do padrão interno em função da variação na vazão do sistema. Demais condições experimentais conforme Figura 11.

Como esperado, o pico de corrente de oxidação do AU decresce consideravelmente (-57%) quando a vazão do sistema FIA varia de 3,0 para $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A Figura 16B ilustra uma comparação da corrente detectada na oxidação de AU sem (■; i_{AU} em 0,80V) e com (Δ; i_{AU} em 0,80V/ i_{PI} em -0,05V) sua normalização pela corrente gerada na redução do PI. Como pode ser observado, após a normalização dos resultados (i_{UA}/i_{PI}), o sinal detectado passa a ser praticamente constante (variação menor que 1%), demonstrando a capacidade do método do padrão interno em compensar flutuações relacionadas a variações na vazão da solução transportadora em sistemas FIA com detecção amperométrica.

3.2.1.3.3. Variação do volume injetado no sistema FIA

Na detecção amperométrica em sistemas FIA normalmente se utiliza como medida analítica a altura dos picos, sendo que esta altura pode variar em função do volume injetado. Portanto, o volume injetado é outro parâmetro que deve ser mantido constante durante análises usando FIA-MPA.

A Figura 17 ilustra os amperogramas obtidos com injeções sucessivas ($n = 10$) no sistema FIA-MPA de uma solução padrão contendo $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU e $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (PI) em função da variação no volume injetado (300 e 100 μL , respectivamente).

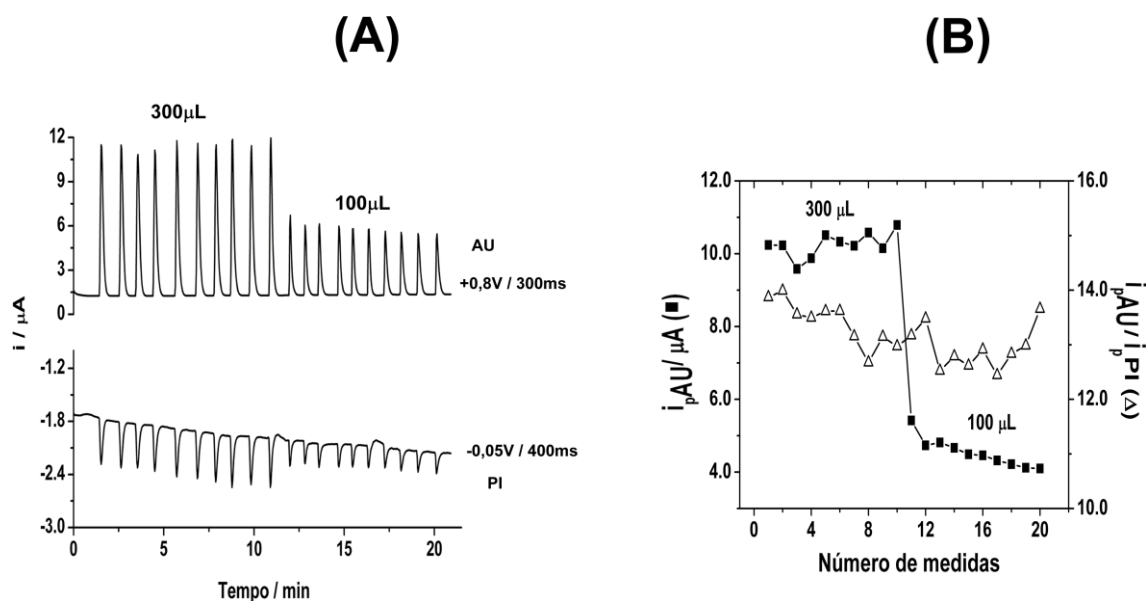


Figura 17. A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de solução contendo $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU e $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em função do volume injetado (300 μL e 100 μL). Pulsos de potenciais aplicados: +0,8 V / 500 ms; +0,6 V / 500 ms; -0,05 V / 400 ms e +0,6 V / 500 ms. B) Comparação do desempenho do sistema FIA-MPA sem (■; i_{AU}) e com (Δ; $i_{\text{AU}}/i_{\text{PI}}$) o uso do método do padrão em função da variação do volume injetado do sistema. Demais condições experimentais conforme Figura 11.

De acordo com os amperogramas apresentados na Figura 17A, a variação no volume injetado de 300 para 100 μL gerou uma diminuição acentuada (-63%) na corrente relativa à oxidação do AU em +0,80 V e de redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (PI) em -0,05 V. A Figura 17B ilustra a corrente de oxidação do AU sem (\blacksquare ; $i_{\text{AU em } 0,80\text{V}}$) e com (Δ ; $i_{\text{AU em } 0,80\text{V}}/i_{\text{PI em } -0,05\text{V}}$) sua normalização com a corrente gerada na redução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (PI). Como podemos observar, após a normalização, os resultados obtidos podem ser considerados satisfatórios, pois a variação entre o maior e o menor pico transiente (3,1%) é um valor muito inferior ao valor obtido anteriormente (63%). Estes resultados indicam que o controle preciso de volume de injeção é desnecessário quando o método do padrão interno é usado em sistemas FIA com detecção amperométrica.

3.2.1.3.4. Variação na força iônica da solução amostra

Outro problema que pode afetar a precisão de análises por FIA com detecção amperométrica é a diferença de força iônica entre as soluções padrão e amostra. Como exemplo, podemos citar a análise de AU em amostras de urina as quais apresentam elevada força iônica. Na Figura 18A é demonstrado como a diferença de força iônica entre soluções padrão e amostra podem afetar o resultado obtido com um sistema FIA com detecção amperométrica. Uma solução padrão contendo 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AU e 38 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (PI) diluída em eletrólito (H_2SO_4 0,2 mol L^{-1} ; força iônica = 0,60 mol L^{-1}) foi injetada no sistema FIA-MPA, sem e com a adição de 0,17 mol L^{-1} de cloreto de sódio (H_2SO_4 0,2 mol L^{-1} + NaCl 0,17 mol L^{-1} ; força iônica = 0,77 mol L^{-1}).

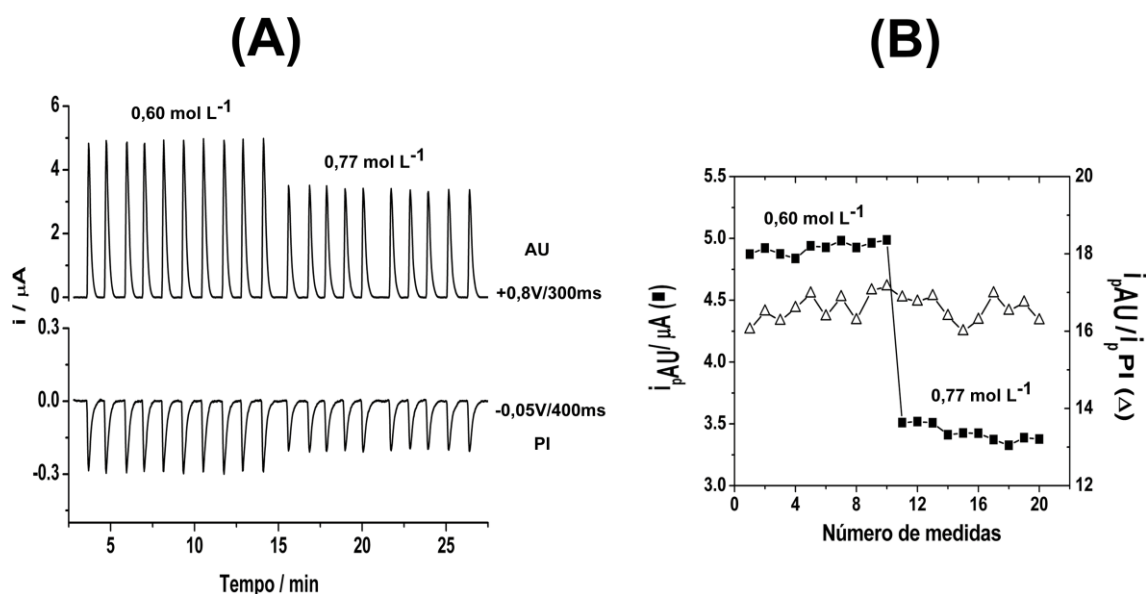


Figura 18. A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de solução contendo 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AU e 38 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em função da variação de força iônica (H_2SO_4 0,2 mol L^{-1} ou H_2SO_4 0,2 mol L^{-1} + NaCl 0,17 mol L^{-1}). Pulsos aplicados: +0,8 V / 500 ms; +0,6 V / 500 ms; -0,05 V / 400 ms e +0,6 V / 500 ms. B) Comparação do desempenho do sistema FIA-MPA sem (■; i_{AU}) e com (Δ; $i_{\text{AU}}/i_{\text{PI}}$) o uso do método do padrão em função da variação de força iônica. Demais condições experimentais conforme Figura 11.

Na ausência e na presença de uma solução de NaCl 0,17 mol L^{-1} , a corrente de oxidação do AU variou de 4,9 para 3,4 μA , respectivamente, o que corresponde a uma variação de 44%. No entanto, quando a correção usando o PI ($i_{\text{AU}}/i_{\text{PI}}$) foi utilizada, o sinal variou apenas 0,2% entre o pico de maior e menor corrente (Figura 18B).

3.2.1.3.5. Formação ou inserção accidental de bolhas no sistema em fluxo

Outro problema comum em sistemas de injeção em fluxo é a formação ou a inserção accidental de bolhas de ar na solução transportadora. As bolhas de ar podem obstruir o contato elétrico entre o eletrodo de trabalho e de referência, o que pode reduzir a sensibilidade e precisão, mesmo após a remoção da bolha de ar do sistema de fluxo. A Figura 19A apresenta os amperogramas para injeções de solução contendo $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU e $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ no sistema FIA antes e após a introdução de uma bolha de ar (\downarrow) no sistema.

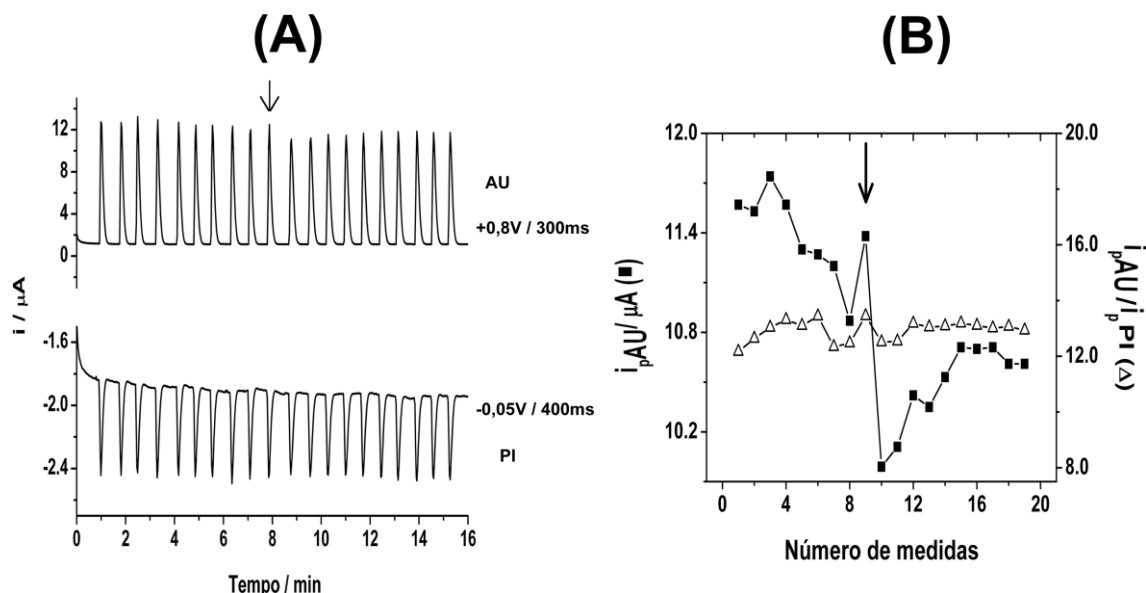


Figura 19. A) Amperogramas obtidos para injeções de soluções padrão contendo $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU e $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em função da inserção de bolhas de ar no sistema FIA-MPA. Pulsos de potenciais aplicados: $+0,8\text{V} / 500\text{ms}$; $+0,6\text{V} / 500\text{ms}$; $-0,05\text{V} / 400\text{ms}$ e $+0,6\text{V} / 500\text{ms}$. B) Comparação do desempenho do sistema FIA-MPA sem (■; i_{AU}) e com (Δ; $i_{\text{AU}}/i_{\text{PI}}$) o uso do método do padrão em função da inserção de bolhas de ar no sistema. Demais condições experimentais conforme Figura 11.

Após a remoção das bolhas, o sinal amperométrico de oxidação do AU diminuiu 9,6%. Quando a correção mediante uso do PI foi realizada (Figura 19B), o sinal resultante apresentou uma variação menor (1,7%). Este resultado demonstra que o método do padrão interno também pode compensar as perturbações geradas pela introdução acidental de bolhas de ar na solução transportadora de um sistema FIA-MPA.

3.2.1.3.6. Curva de calibração usando o método do PI

Neste estudo, soluções contendo concentrações crescentes de AU (10,0; 40,0; 100,0; 200,0; 300,0 e 400,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e constantes do PI (38 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) foram injetadas no sistema FIA-MPA. Como o objetivo foi verificar se o uso do PI era eficaz na obtenção de curvas de calibração na presença de problemas de contaminação do eletrodo de trabalho, o pulso de potencial de +0,6 V (limpeza relacionada com o produto de oxidação do AU) não foi usado. Assim, a seguinte sequência de pulsos de potenciais foi usada neste estudo: +0,8 V (oxidação do AU); -0,05 V (redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) e +0,6 V (remoção dos produtos gerados na redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$). O volume de injeção e a vazão foram mantidos constantes e iguais a 300 μL e 3,0 ml min^{-1} , respectivamente.

Os amperogramas obtidos neste estudo são apresentados na Figura 20A. A Figura 20B apresenta duas curvas analíticas construídas a partir das correntes de oxidação do AU em +0,80 V, sem (■) e com (Δ) normalização dos resultados mediante divisão pela corrente de redução do PI ($i_{\text{AU}}/i_{\text{PI}}$). Com o intuito de facilitar a comparação entre as duas curvas analíticas, os valores de corrente de oxidação do AU foram multiplicados por 2,7 para que se tornassem similares aos obtidos pela razão $i_{\text{AU}}/i_{\text{PI}}$.

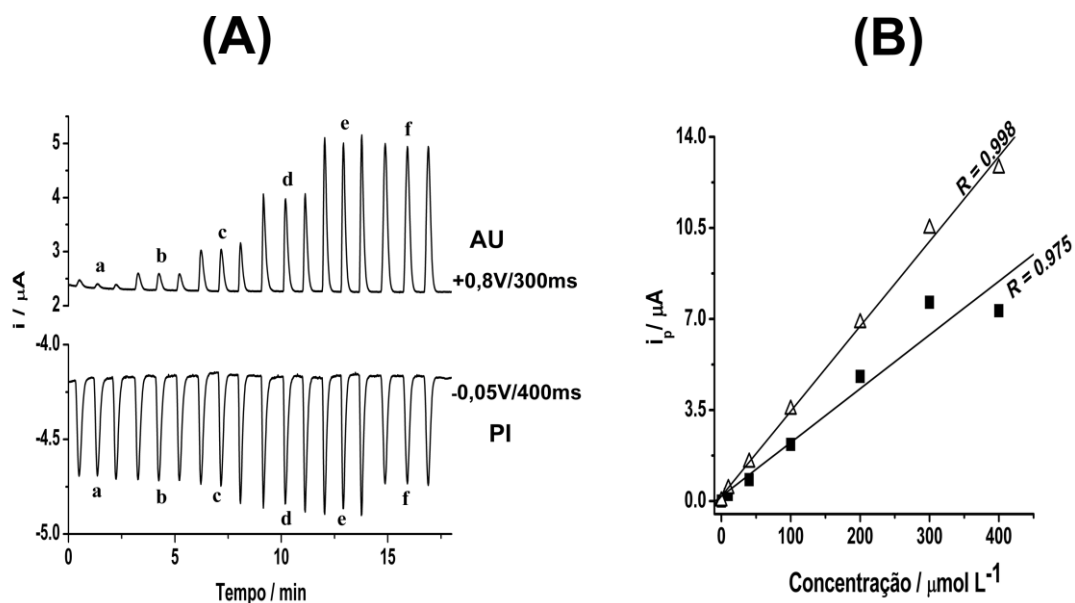


Figura 20. (A) Amperogramas obtidos com o sistema FIA-MPA após injeções em triplicada de soluções contendo concentrações crescentes de AU (10,0; 40,0; 100,0; 200,0; 300,0 e 400,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e constantes do PI (38 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$). (B) Curvas analíticas referentes à oxidação de AU em +0,80V sem (\blacksquare) e com (Δ) normalização dos resultados ($i_{\text{AU}}/i_{\text{PI}}$). Demais condições experimentais conforme Figura 11.

Como podemos observar, a corrente detectada na solução padrão contendo 400,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AU (Figura 20Af) não apresentou uma relação linear com a concentração e um coeficiente de correlação de 0,975 foi calculado. No entanto, quando a normalização dos resultados foi efetuada ($i_{\text{AU}}/i_{\text{PI}}$), um bom coeficiente de correlação ($R = 0,998$) foi obtido.

Em todos os testes apresentados até o momento, o PI foi adicionado a cada uma das soluções para depois ser injetado no sistema FIA. No entanto, em sistemas FIA, o acréscimo manual do PI a cada solução pode ser eliminado mediante uso do método de interpenetração de zonas [183]. De acordo com este método, a alíquota da solução do

padrão interno e das soluções padrão ou amostra são injetadas simultaneamente em duas linhas separadas de um sistema em fluxo. Posteriormente, em uma conexão em forma de Y, as duas linhas são unidas e a homogeneização ocorre durante o transporte para a célula eletroquímica. Desse modo, apenas é necessário o preparo de uma única solução contendo o PI e erros associados ao preparo de soluções seriam evitadas (relacionadas com o PI).

3.2.1.4. Conclusões parciais – PI em sistemas FIA com detecção amperométrica

Os resultados apresentados demonstram que em sistemas FIA com detecção amperométrica, tanto o analito quanto o PI são afetados de forma similar pela variação de parâmetros físicos e químicos do sistema e pela perda progressiva da sensibilidade devido à gradativa contaminação da superfície do eletrodo. Assim, a normalização dos resultados ($i_{analito}/i_{PI}$) podem ser usados para compensar algumas condições não controladas. Melhoras significativas foram obtidas em termos de precisão do sistema através da minimização da influência em variações na velocidade de vazão, volume de injeção, força iônica e inserção acidental de bolhas de ar. Além disso, o método do padrão interno também minimizou a limitação mais comum dos detectores amperométricos usando eletrodos sólidos, que é a variação da corrente devido à passivação ou contaminação gradual da superfície do eletrodo de trabalho.

3.2.2. Aplicação do método do PI em sistema BIA-MPA

Nos tópicos a seguir serão apresentados os resultados obtidos nos estudos para verificar a possibilidade de usar o método do padrão interno para melhorar a precisão no procedimento de injeção em sistemas BIA-MPA.

3.2.2.1. Estudos para identificação de um PI

O comportamento eletroquímico de alguns compostos que serão usados como analitos modelo (AM) no presente estudo (PA, CA, DI e TBHQ) [33, 34, 57] foram estudados anteriormente em nosso grupo de pesquisa empregando BDD como eletrodo de trabalho. Usando tampão HAc/Ac⁻ 0,1 mol L⁻¹ (pH = 4,6) como eletrólito de suporte, a oxidação do PA [34] se inicia em aproximadamente +0,70 V e chega a um valor máximo de corrente em +1,0 V. Neste mesmo meio, a oxidação da CA se inicia em torno de +1,30 V e chega a um valor máximo em aproximadamente +1,50 V [34]. Neste mesmo eletrólito, a oxidação da DI [33] envolve mais de uma etapa. Inicialmente há um aumento da corrente de oxidação em potencial próximo de +0,40 V alcançando um máximo em +1,10 V. Entretanto, em potenciais mais positivos que +1,10 V ocorre um novo aumento de corrente até +1,70 V, sem atingir um valor máximo no intervalo estudado (+0,35 V até +1,70 V). O comportamento eletroquímico do TBHQ [57] foi avaliado em meio de KCl + HCl 0,1 mol L⁻¹ em 30/70% de etanol/água, respectivamente. Neste eletrólito, a oxidação do TBHQ iniciou-se em +0,6 V, atingindo corrente máxima em +0,7V.

O comportamento eletroquímico do NC (PI) foi estudado usando o sistema BIA-MPA. Dez pulsos de potenciais, 70 ms cada (0,0; -0,10; -0,20; -0,30; -0,40; -0,50; -0,60; -0,70; -0,80 e -0,90 V), foram aplicados continuamente ao eletrodo de trabalho (BDD)

posicionado no sistema BIA. A corrente de cada pulso de potencial (simultânea aquisição dos 10 amperogramas) [34] foi continuamente monitorada durante três injeções de uma solução de NC $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. O respectivo pico de corrente para cada pulso de potencial foi medido e usado na construção do voltamograma hidrodinâmico para redução eletroquímica do NC (Figura 21).

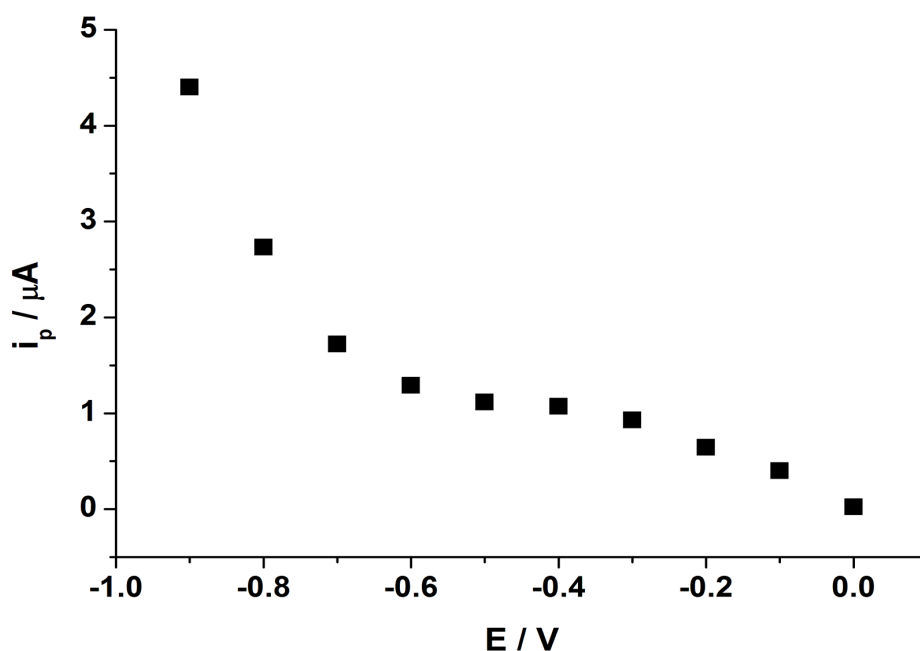


Figura 21. Voltamograma hidrodinâmico obtido pela injeção no sistema BIA-MPA de uma solução contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NC em meio de H_2SO_4 $0,20 \text{ mol L}^{-1}$.

Observa-se pelo voltamograma hidrodinâmico do NC (Figura 21) que sua redução se inicia em torno de $-0,1 \text{ V}$ e atinge um valor constante entre os potenciais $-0,4 \text{ V}$ e $-0,6 \text{ V}$, ocorrendo em seguida um novo aumento de corrente a partir de $-0,7 \text{ V}$ sem atingir um valor máximo na faixa estudada (até $-0,9 \text{ V}$).

Nos estudos para implementação do método do PI em sistemas BIA-MPA, dois pulsos de potenciais foram selecionados para cada par AM/PI. Um pulso de potencial monitora a corrente do PI e um segundo pulso de potencial monitora simultaneamente

as correntes do PI e do AM. O esquema de aplicação destes pulsos de potenciais está apresentado Figura 22.

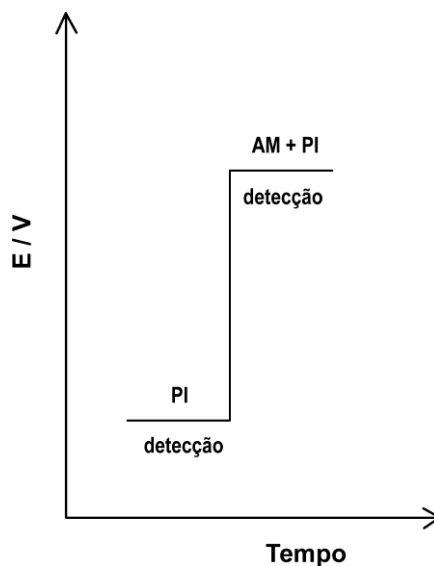


Figura 22. Escada de potencial usada na detecção MPA, aplicada ao BDD em função do tempo. PI: padrão interno. AM: analito modelo.

A estratégia proposta neste estudo é usar a normalização dos resultados (i_{PI+AM}/i_{PI}) para correção de variações provenientes do procedimento de injeção do sistema BIA. Esta nova abordagem apresenta vantagens em relação à proposta descrita no item 3.2.1 (onde analito e o PI são detectados separadamente), uma vez que apenas o composto usado como PI necessita ser detectado separadamente. Assim, há um aumento considerável na probabilidade de identificar um composto adequado para ser usado como PI. No entanto, interações químicas entre o analito e o PI podem impedir que o método do PI seja empregado. Esta interação é mais comum quando um dos compostos, analito ou PI, é detectado pela oxidação e o outro pela redução, ou vice-versa. Exemplos desta condição são apresentados nos amperogramas da Figura 23, onde injeções no sistema BIA-MPA foram feitas de soluções contendo apenas o AM, o PI e mistura AM + PI.

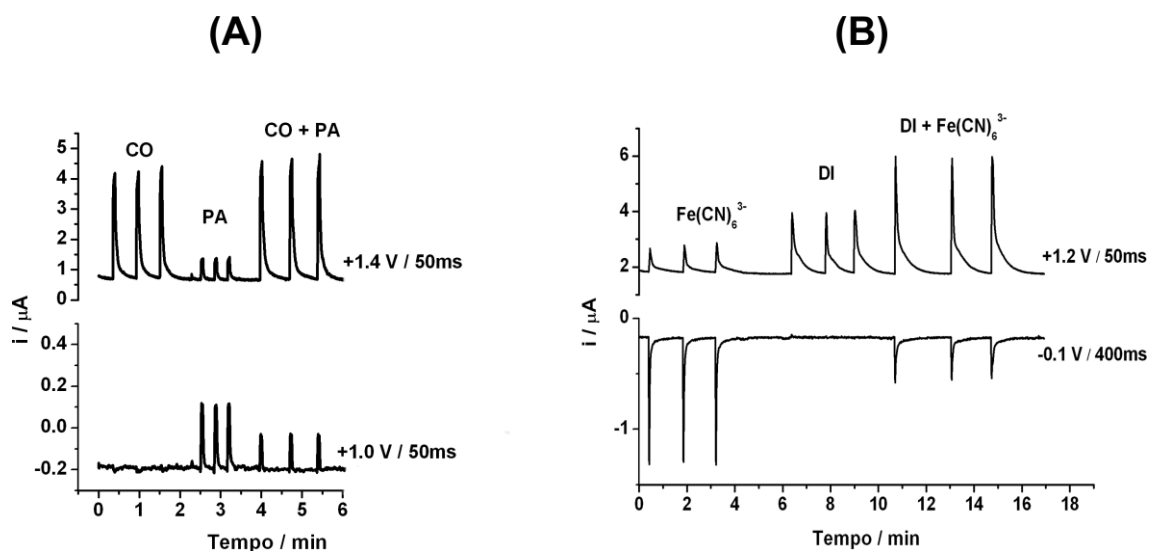


Figura 23. Amperogramas obtidos pela injeção de soluções padrão no sistema BIA-MPA contendo: (A) CO ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), PA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e CO + PA ($50 + 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente); (B) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$), DI ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ + DI ($40 + 80 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente). Eletrólito: H_2SO_4 $0,20 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de injeção: $6,0 \text{ mL min}^{-1}$. Volume injetado: $100 \mu\text{L}$.

Nos amperogramas da Figura 23 (A e B) estão representados dois pares de compostos (AM e PI) quando um PI inadequado foi utilizado. Observa-se nos amperogramas da Figura 23A, que no pulso de potencial de $+1,0 \text{ V}$ apenas o PI (PA ou $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) apresentam sinal amperométrico (oxidação e redução, respectivamente). As correntes de oxidação ou redução detectadas para estes compostos (PIs) na ausência e na presença do analito (CO e DI, respectivamente) não são similares (diminuição do sinal amperométrico), indicando que provavelmente ocorre uma interação química entre os compostos (analito e PI). Desse modo, na escolha do par AM/PI é essencial que não haja interação química entre AM e PI.

Em estudos subsequentes, outros compostos foram testados para atuarem como PI (TBHQ, NC, PA e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) e como AM (CO, PA, CA, DI e AU). Em todos os casos, para testar a viabilidade de uso do par AM/PI com este objetivo, três soluções distintas

foram injetadas no sistema BIA-MPA: AM, PI e AM+PI. Os amperogramas para este estudo estão apresentados na Figura 24.

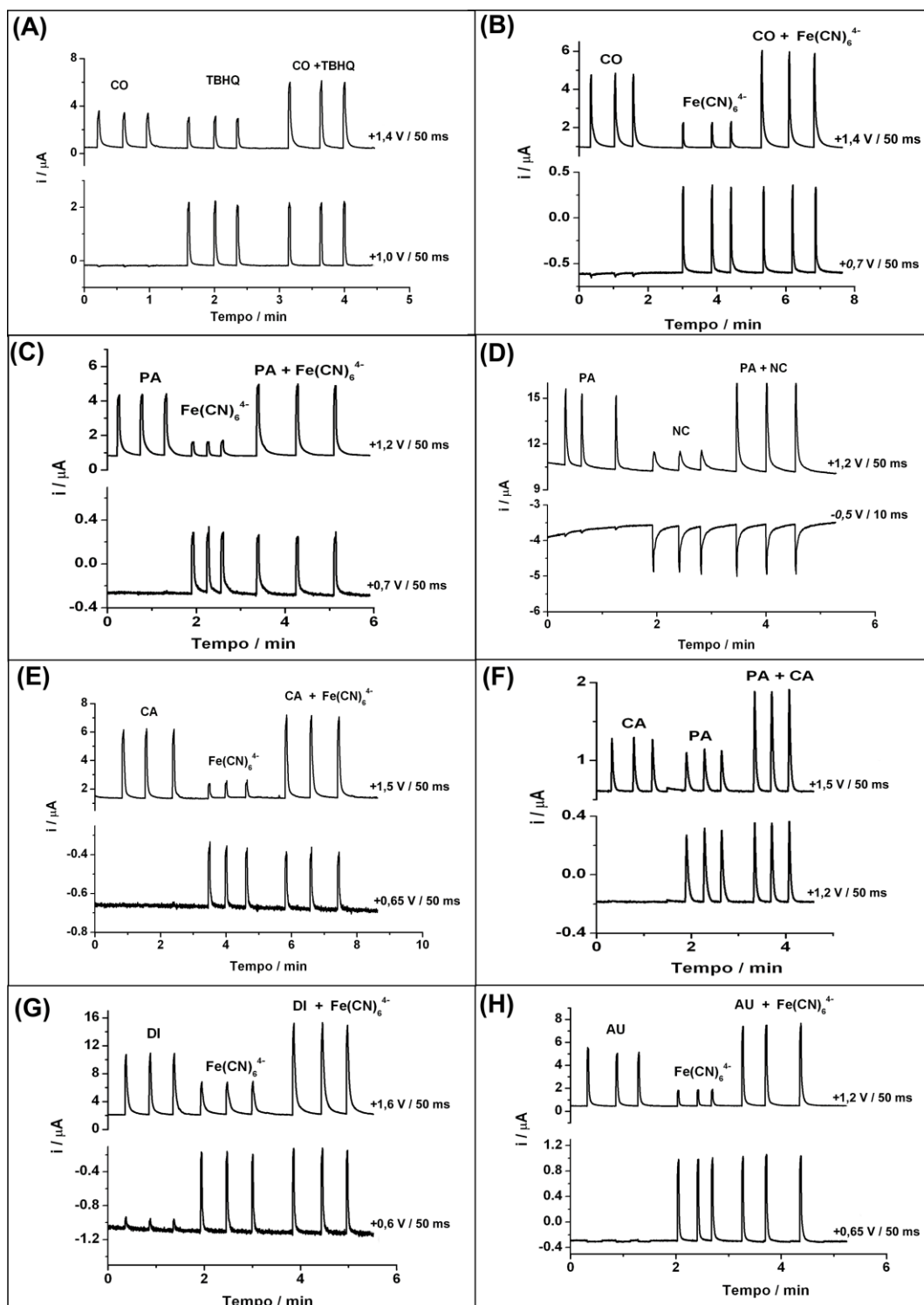


Figura 24. Amperogramas obtidos pela injeção no sistema BIA-MPA ($n = 3$) de soluções contendo somente o AM, somente o PI e AM + PI, respectivamente. Mais informações constam na Tabela 1. Demais parâmetros experimentais iguais a Figura 23.

Observa-se pelos amperogramas apresentados, que todos os compostos utilizados para atuarem como PI apresentam sinal amperométrico em potenciais menos positivos que o AM. Além disso, a intensidade do sinal amperométrico do PI é a mesma, independentemente se é injetado individualmente ou junto com AM (PI+AM), indicando que não há interação química entre os compostos. Pequenas variações de corrente podem ser consideradas decorrentes de variações do processo de injeção do sistema BIA (velocidade e/ou volume injetado) e/ou progressiva perda de sensibilidade devido à contaminação ou passivação da superfície do eletrodo de trabalho. Na Tabela 1 constam as concentrações utilizadas para os PI e os AM, assim como os pulsos de potenciais usados na detecção (PI e AM + PI).

Tabela 1. Dados de concentração e pulsos de potenciais aplicados na detecção do AM e PI.

Amperogramas	AM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	PI ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	E aplicado AM + PI (V)	E aplicado PI (V)
A	CO (50)	TBHQ (35)	+1,40	+1,00
B	CO (50)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (30)	+1,40	+0,70
C	PA (40)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (30)	+1,20	+0,70
D	PA (40)	NC (15)	+1,20	-0,50
E	CA (25)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (30)	+1,50	+0,65
F	CA (20)	PA (20)	+1,50	+1,20
G	DI (40)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (30)	+1,60	+0,60
H	AU (40)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (30)	+1,20	+0,65

3.2.2.2. Estudo da influência de alguns parâmetros no desempenho do sistema BIA

Os estudos com o sistema BIA podem ser realizados com ou sem agitação da solução presente na célula eletroquímica. Os testes foram realizados utilizando uma micropipeta motorizada mediante injeção de soluções contendo o AM + PI sem e com agitação da solução no interior da célula. Os amperogramas para este estudo utilizando a CO (AM) e o TBHQ (PI) são apresentados na Figura 25.

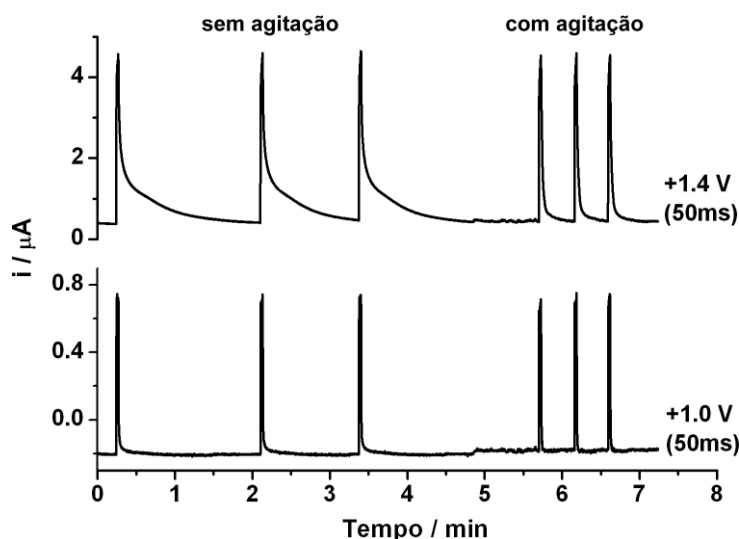


Figura 25. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA sem e com (~ 2200 rpm) agitação da solução no interior da célula. Solução injetada: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CO + $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ. Demais parâmetros experimentais: iguais a Figura 23.

Com a solução no interior da célula sob constante agitação usando um micro motor DC, uma injeção foi possível a cada 10 s, o que permite obter elevada frequência analítica (~ 360 injeções h^{-1}). Entretanto, na ausência de agitação, há uma redução considerável da frequência analítica (~ 48 injeções h^{-1}). A agitação no sistema acelera a remoção do material eletroativo da interface eletrodo/solução e a corrente gerada (pico

transiente) retorna para a linha base mais rapidamente, o que aumenta a frequência analítica do sistema. A agitação também é importante quando um pulso de potencial para constante limpeza eletroquímica é empregado, pois contribui significativamente para a remoção do contaminante da superfície do eletrodo. A frequência analítica com e sem agitação, para os outros pares estudados estão apresentados na Tabela 2. Observa-se que em todos os casos houve uma grande melhora na frequência analítica com exceção dos AM: PA (PI: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e NC) e CA (PI: PA) que não houve diferença do uso da agitação. Portanto, nos estudos que seguem foi utilizada a agitação mecânica.

Tabela 2. Frequência analítica obtida para os pares (AM + PI) estudados com e sem agitação.

AM	PI	Com agitação (injeção h^{-1})	Sem agitação (injeção h^{-1})
CO	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	103	30
PA	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	180	180
PA	NC	120	120
CA	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	180	30
CA	PA	180	180
DI	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	128	36
AU	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	277	40

O processo de injeção no sistema BIA pode ser um dos fatores responsáveis pela reprodutibilidade dos resultados, pois podem surgir variações dos resultados tanto provenientes de flutuações no volume injetado como na velocidade de injeção [73]. Para que o procedimento de injeção seja reprodutível, micropipetas motorizadas são normalmente utilizadas [28]. Desta forma, o volume e velocidade de injeção são programadas eletronicamente e operadores com pouca (ou nenhuma) experiência podem efetuar injeções no sistema de forma reprodutível. Um inconveniente é que as

micropipetas motorizadas normalmente não estão disponíveis em laboratórios químicos comuns devido ao seu alto custo (acima de R\$ 2.000,00). Micropipetas convencionais (manuais) não são precisas no procedimento de injeção em sistemas BIA.

Com o intuito de testar a viabilidade de uso do método do padrão interno para obtenção de injeções reprodutíveis no sistema BIA usando pipetas manuais, um estudo inicial foi realizado variando os parâmetros volume e velocidade de injeção usando uma pipeta motorizada. Nesta condição, o volume e velocidade de injeção podem ser precisamente variados e os resultados obtidos com e sem sua normalização mediante uso do PI (i_{AM+PI}/i_{PI}) podem ser comparados.

A Figura 26 apresenta os amperogramas obtidos em função da variação na velocidade de injeção ($1,70$ a $20,7 \text{ mL min}^{-1}$) no sistema BIA-MPA para soluções contendo $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CA (AM) e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PA (PI).

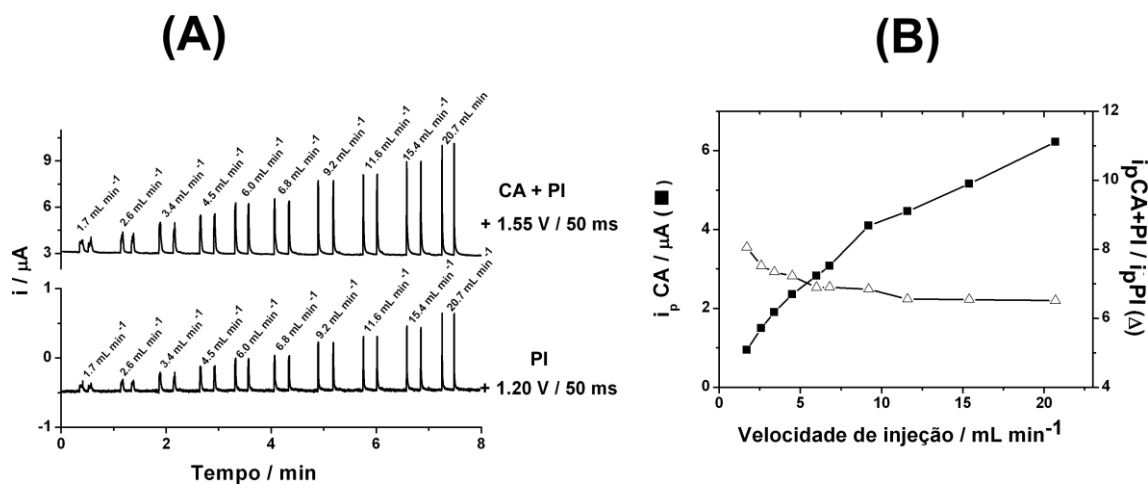


Figura 26. (A) Amperogramas obtidos para injeções ($n = 2$) de soluções contendo $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CA (AM) e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PA (PI) em função da variação na velocidade de injeção. (B) Respostas obtidas para oxidação da CA sem (■) e com (Δ) a normalização (i_{CA+PA}/i_{PA}) dos resultados. Eletrólito suporte: HAc/NaAc $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,7$). Volume injetado: $100,0 \mu\text{L}$.

Como esperado, sem o uso do padrão interno (■; Figura 26B), um aumento de resposta da CA é detectado com o aumento na velocidade de injeção de 1,7 a 20,7 mL min⁻¹. Porém, quando a normalização com o PI (i_{AM+PI}/i_{PI}) é utilizada (Δ; Figura 26B), uma resposta amperométrica relativamente constante é obtida, independente da velocidade de injeção. O desvio padrão relativo antes e após a normalização da corrente detectada (i_{CA+PA}/i_{PA}) foi igual a 16,5% e 2,2%, respectivamente.

O estudo do efeito da variação do volume injetado (10 a 200 μL) na corrente de oxidação da CA detectada para soluções contendo 20 μmol L⁻¹ de CA (AM) + 5 μmol L⁻¹ de PA (PI) é apresentado na Figura 27.

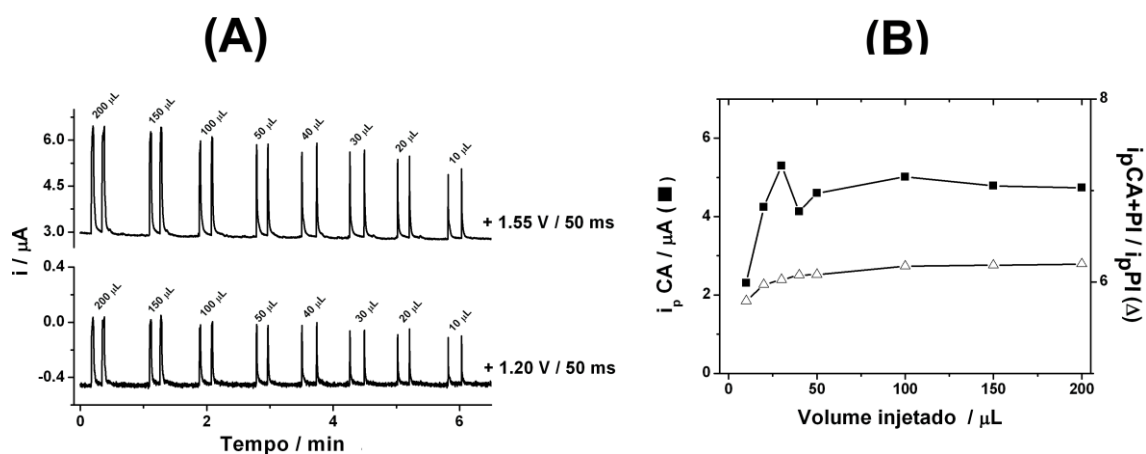


Figura 27. Amperogramas obtidos para injeções ($n = 2$) de soluções contendo 20 μmol L⁻¹ de CA (AM) + 5 μmol L⁻¹ de PA (PI) em função da variação no volume injetado no sistema BIA-MPA. (B) Respostas obtidas para oxidação da CA sem (■) e com (Δ) a normalização dos resultados (i_{CA+PA}/i_{PA}). Eletrólito suporte: HAc/NaAc 0,1 mol L⁻¹ (pH = 4,7). Velocidade de injeção: 6,0 mL min⁻¹.

Como pode ser observado, a corrente de oxidação para a CA somente varia para volumes injetados menores que 100 μL (■; Figura 27B), cujo resultado está em concordância com a literatura [73]. Porém, quando a normalização com o PI (i_{AM+PI}/i_{PI}) é utilizada (Δ; Figura 27B), uma resposta similar é obtida, independentemente do

volume injetado. O desvio padrão relativo antes e após a normalização da corrente (i_{CA+PA}/i_{PA}) calculado foi igual a 3,0 e 1,0%, respectivamente (calculado apenas para volumes injetados menores que 100 μ L).

Estes resultados demonstram que o uso do método do padrão interno pode corrigir as flutuações geradas no procedimento de injeção usando BIA-MPA.

A fim de demonstrar o potencial desta nova abordagem, estudos foram realizados para demonstrar a possibilidade de utilização de seringas descartáveis para injeções reproduzíveis no sistema BIA. Os estudos que seguem foram feitos para os todos os pares (AM e PI) apresentados na Figura 24, porém, só serão apresentados os amperogramas de um par em específico (CO e TBHQ). Os resultados para os demais pares (AM e PI) serão apresentados em forma de tabelas.

3.2.2.3. Estudos de repetibilidade do método

A precisão do sistema BIA-MPA foi avaliada comparando-se os resultados obtidos para três procedimentos diferentes de injeção de soluções no sistema BIA: (1) pipeta motorizada; (2) seringa descartável sem normalização dos resultados; (3) seringa descartável com a normalização dos resultados. A normalização dos resultados obtidos quando se utilizou a seringa descartável foi feita levando-se em consideração a razão i_{AM+PI}/i_{PI} .

Neste estudo, duas soluções de composições distintas foram injetadas no sistema BIA ($n = 6$), uma contendo 20 μ mol L⁻¹ de CO (AM) e outra contendo 20 μ mol L⁻¹ de CO (AM) + 15 μ mol L⁻¹ de TBHQ (PI). A solução contendo somente CO foi injetada usando a micropipeta motorizada (Figura 28A) e a seringa descartável (Figura 28B) e a solução contendo CO + o PI foi injetada usando somente a seringa descartável (Figura

28C). O mesmo estudo foi realizado para os outros pares de compostos (AM e PI) e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

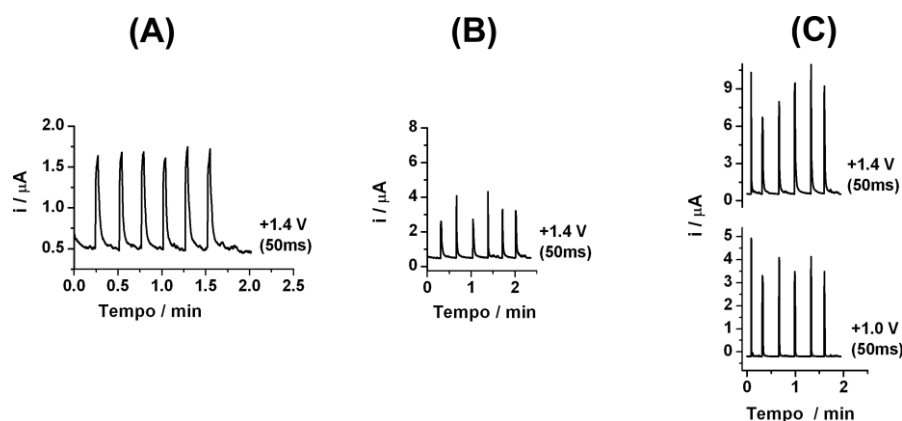


Figura 28. Amperogramas obtidos do sistema BIA-MPA para três diferentes modos de injeção: (A) micropipeta motorizada, seringa descartável sem (B) e com (C) a presença do PI. Solução injetada: $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CO (AM) e $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ (PI). Demais parâmetros experimentais iguais a Figura 23.

Tabela 3. Comparação entre os resultados para o estudo de repetibilidade ($n = 6$) obtidos por BIA-MPA para oito pares de AM/PI usando três processos diferentes de injeção: pipeta motorizada, seringa descartável sem PI e seringa descartável com normalização dos resultados usando um PI.

AM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	PI ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Pipeta motorizada	Seringa	
		DPR (%)	DPR (%)	
		Sem PI	Sem PI	Com PI
PA (40)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (30)	1,0	9,6	2,4
PA (40)	NC (15)	1,0	9,6	3,4
CO (25)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (30)	0,9	4,8	1,4
CO (20)	TBHQ (15)	0,7	5,2	1,1
CA (25)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (30)	0,8	2,8	1,3
AU (40)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (30)	0,7	4,8	1,2
DI (40)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (30)	0,4	9,3	1,9
CA(20)	PA (20)	1,2	5,1	1,5
Média		0,8	6,4	1,8

Como podemos observar, as repetibilidades obtidas utilizando a seringa descartável após normalização dos resultados (i_{AM+PI}/i_{PI}) foram muito melhores (DPR=1,8 %) do que os obtidos com a seringa descartável sem a normalização pelo PI (DPR=6,4 %). Estes resultados demonstram a capacidade do método do PI em compensar flutuações relacionadas com variações na velocidade e volume de injeção no sistema BIA. É importante salientar que os resultados usando a seringa descartável foram obtidos em triplicata ($n = 3$) sendo que cada injeção foi feita por um operador diferente. É provável que se as injeções fossem feitas pelo mesmo operador, os valores de DPR poderiam ser melhores e os resultados obtidos com o PI poderiam estar mais próximos aos obtidos com a pipeta motorizada.

3.2.2.4. Curvas de calibração utilizando o método do PI

Neste estudo, duas soluções de composições distintas foram injetadas no sistema BIA-MPA ($n = 3$), uma contendo concentrações crescentes (10 a 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de CO (AM) e outra contendo concentrações crescentes (10 a 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de CO (AM) + 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ (PI). As soluções contendo somente concentrações crescentes de CO foram injetadas usando a micropipeta motorizada (Figura 29A) e a seringa descartável (Figura 29B) e as soluções contendo concentrações crescentes de CO + o PI foram injetadas usando somente a seringa descartável (Figura 29C). Na Figura 29 além dos amperogramas (A, C e E), também estão representados as respectivas curvas de calibração obtidas para injeções nas três formas diferentes de injeção: micropipeta motorizada (B) e seringa descartável sem (D) e com (F) a presença do PI (i_{AM+PI}/i_{PI}).

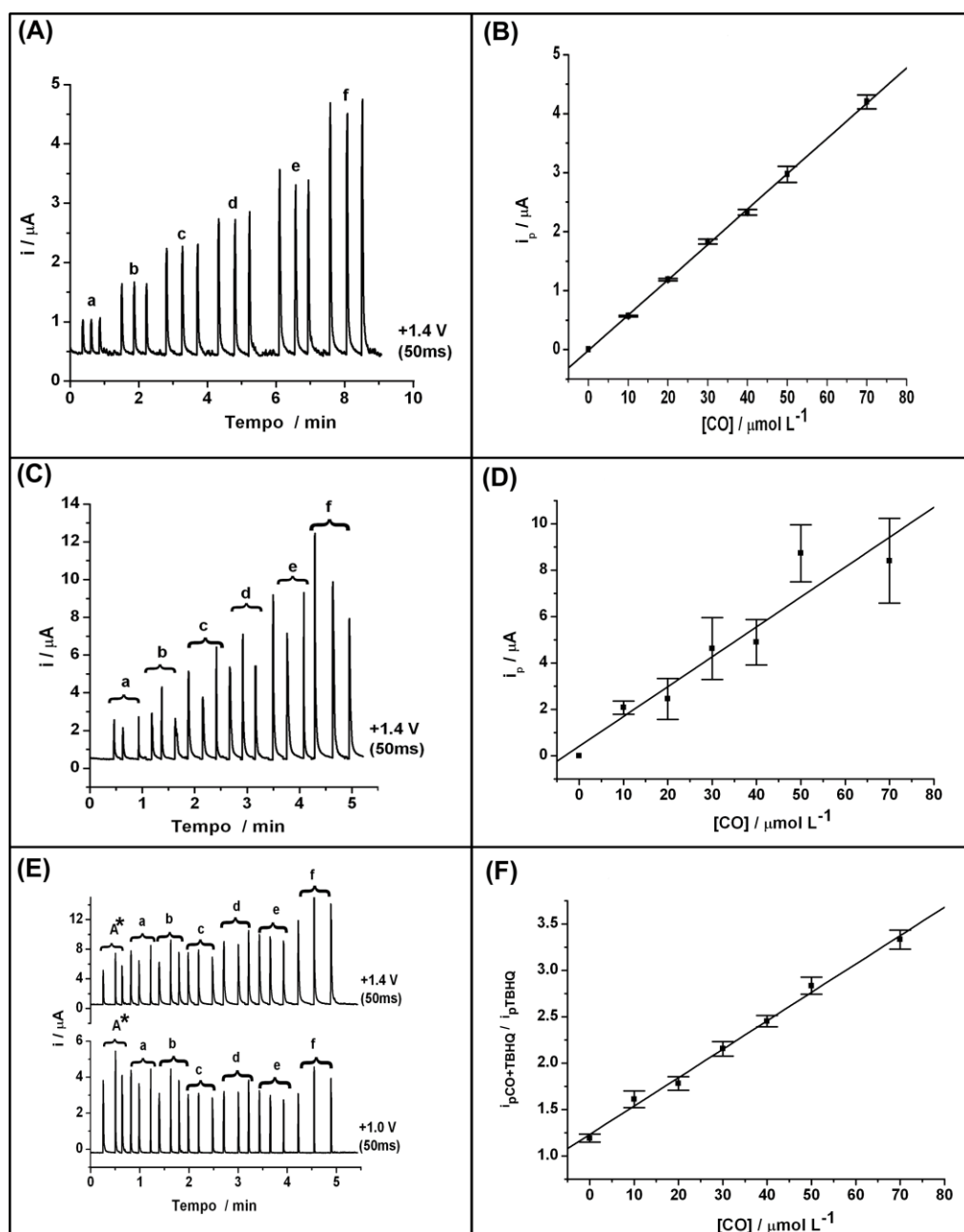


Figura 29. Amperogramas e respectivas curvas de calibração obtidas para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de CO (a)10, (b) 20, (c)30, (d) 40, (e)50, (f)70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e constantes de PI (15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ) usando três formas diferentes de injeção: micropipeta motorizada (A e B) e seringa descartável sem (C e D) e com (E e F) a presença do PI (i_{AM+PI}/i_{PI}). Para outras condições experimentais ver Figura 23.

Na faixa de concentração estudada (10 a 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$), a CO apresenta relação linear ($R = 0,999$) entre concentração e respectiva corrente de oxidação, o que pode ser

observado quando a pipeta motorizada foi usada na injeção (Figura 29B). Quando a seringa descartável foi utilizada no processo de injeção (Figura 29C) sem a normalização dos resultados (i_{AM+PI}/i_{PI}), altos desvios padrões relativos médios (média dos desvios referente aos seis pontos de concentração da curva analítica) são observados entre as replicatas (22.4%; n = 6) e o coeficiente de correlação foi calculado em 0,954. Por outro lado, quando a normalização dos resultados pelo PI foi usada (i_{AM+PI}/i_{PI} ; Figura 29E), um sensível melhora entre as replicatas (RSD = 3,7%; n = 6) e coeficiente de correlação (R = 0,997) foi obtida.

A razão de corrente detectada apenas para injeções de solução contendo o PI (Figura 29EA*) nos potenciais +1,4 e +1,1 V foi utilizada para construção da curva de calibração no ponto correspondente à concentração zero do analito.

Os resultados obtidos para os demais pares de compostos (AM/PI) estudados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA para sete pares de AM/PI estudados usando três processos diferentes de injeção: pipeta motorizada, seringa descartável sem e com o PI nas soluções.

AM	PI	PI $\mu\text{mol L}^{-1}$	Faixa linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	R		
				Pipeta Motorizada	Seringa	
				Sem PI	Sem PI	Com PI
PA	Fe(CN)_6^{4-}	30	10 - 200	0,996	0,988	0,998
PA	NC	15	10 - 50	0,999	0,950	0,998
CO	Fe(CN)_6^{4-}	30	10 - 100	0,999	0,983	0,997
CA	Fe(CN)_6^{4-}	30	10 - 200	0,999	0,980	0,996
CA	PA	20	5 - 40	0,999	0,984	0,999
AU	Fe(CN)_6^{4-}	30	5 - 40	0,998	0,947	0,998
DI	Fe(CN)_6^{4-}	30	5 - 40	0,999	0,961	0,993
Média				0,998	0,970	0,997

Como pode ser observado, o uso do método do PI (i_{AM+PI}/i_{PI}) propiciou uma melhora significativa dos resultados em todos os casos estudados.

O desempenho do sistema proposto usando os diferentes modos de injeção (micropipeta motorizada e seringa descartável com e sem a presença do PI), também foi avaliado por análises de amostras sintéticas ($n = 3$) contendo cada par AM/PI listado na Tabela 1. A média dos erros ($n = 8$) foi calculada em $2,1 \pm 0,3$, $3,5 \pm 0,7$ e $9,4 \pm 1,5\%$ para a micropipeta motorizada, a seringa descartável com e sem a normalização dos resultados (i_{AM+PI}/i_{PI}), respectivamente. Os erros calculados para cada par AM/PI pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos com a micropipeta motorizada e seringa descartável antes e após normalização usando o método do PI (i_{AM+PI}/i_{PI}), para amostras sintéticas usando BIA-MPA ($n = 3$). *Erro* = $(100 \times (\text{BIA-MPA} - \text{valor tabelado}) / \text{valor tabelado}) / n$

Amostra Sintética	PI	Erro (%)		
		Micropipeta motorizada		Seringa
		Sem PI	Sem PI	Com PI
PA	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	2,7	7,3	3,0
PA	NC	2,7	7,3	2,5
CA	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	1,9	6,7	5,1
CA	PA	1,9	6,7	2,1
CO	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	1,2	9,8	3,7
CO	TBHQ	1,2	9,8	3,8
UA	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	3,8	8,0	0,5
DI	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	1,0	19,6	7,5
Média		2,1	9,4	3,5

Estes resultados são similares aos obtidos no estudo de repetibilidade apresentado na Tabela 3. O modo de injeção proposto (usando o método do padrão interno) mantém a precisão dos resultados obtidos com um sistema BIA mesmo quando se utiliza uma seringa manual e descartável. É provável que os resultados aqui apresentados podem também ser obtidos utilizando uma pipeta manual na etapa de injeção.

3.2.2.5. Conclusões parciais – PI em sistemas BIA com detecção amperométrica

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram pela primeira vez que o método do padrão interno pode ser utilizado com sucesso para melhorar a precisão dos resultados obtidos com um sistema BIA com detecção amperométrica. A eficácia do método foi demonstrada utilizando seringas descartáveis (extensível a pipetas manuais) no procedimento de injeção, sem perda considerável em termos de precisão provenientes de flutuações na velocidade e/ou volume de injeção. Além disso, a abordagem aqui proposta apresenta avanços sobre o uso do método do PI em sistemas FIA proposto na seção 3.2.1, uma vez que foi demonstrado que apenas o composto utilizado como PI necessita ser detectado seletivamente (não o par analito/PI). Portanto, a seleção de um composto candidato para utilização como PI torna-se uma tarefa muito mais simples. Adicionalmente, o método do PI pode ser usado para minimizar uma das principais limitações de eletrodos sólidos, que é a variação da resposta em função do tempo devido à passivação gradual ou contaminação da superfície do eletrodo de trabalho, especialmente quando um pulso de potencial para limpeza eletroquímica não é eficaz para contornar o problema. Finalmente, a abordagem aqui proposta faz com que

aumente o potencial de sistemas BIA com detecção amperométrica, principalmente para aplicações que requerem análises em campo (“*on-site*”).

3.3. Parte II – Determinação de DCF e análise simultânea de DCF e CO

3.3.1. Determinação de DCF (DCF)

3.3.1.1. Comportamento eletroquímico do DCF em diferentes eletrodos

Os estudos existentes na literatura envolvendo a determinação de DCF usando métodos eletroquímicos fazem uso de eletrodos modificados e informam sobre a existência de problemas de contaminação quando eletrodos não modificados são empregados para este fim [26, 118, 139-144]. Estes resultados foram confirmados experimentalmente usando BDD como eletrodo de trabalho em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} (Fig. 30).

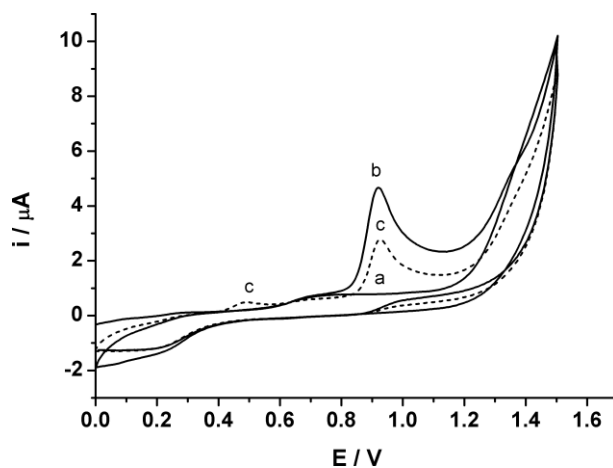


Figura 30. Voltamograma cíclico obtido em H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} sem (a) e com a presença de 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF: (b) ciclo 1; (c) ciclo 2. ET: BDD; Faixa de trabalho: 0,0 a +1,5V vs Ag/AgCl; velocidade de varredura = 50 mV s^{-1} .

Como o objetivo inicial deste trabalho era a determinação de DCF por FIA com detecção amperométrica, o comportamento eletroquímico do DCF também foi estudado neste sistema usando eletrodos de trabalho não modificados (GC, Au e BDD) em meio de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 . Neste caso, a opção foi obter voltamogramas hidrodinâmicos mediante a aplicação de dez pulsos de potenciais em função do tempo utilizando o sistema FIA-MPA. A sequência de aplicação (escada de potencial) dos dez pulsos de potenciais selecionados está representada na Figura 32A. A Figura 32B apresenta os amperogramas obtidos com injeções sucessivas ($n = 10$) de solução contendo $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF no sistema FIA-MPA usando BDD como eletrodo de trabalho. O mesmo estudo foi feito usando GC e Au como eletrodos de trabalho. Os voltamogramas hidrodinâmicos (Figura 32C) foram obtidos plotando a corrente de picos detectada (amperogramas) em função do pulso de potencial correspondente.

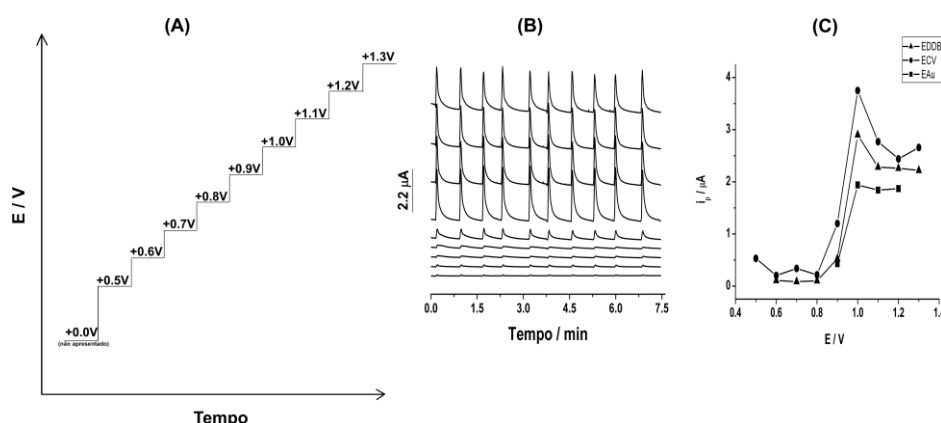


Figura 32. A) Escada de potencial aplicada ao eletrodo de BDD posicionado no sistema FIA-MPA. B) Amperogramas detectados para sucessivas injeções ($n = 10$) de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF. C) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos plotando a corrente detectada (média de 10 injeções) em função do pulso de potencial do correspondente; Eletrodos de trabalho: (■)Au, (▲) BDD e (●) GC. Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 70 ms. A resposta a 0,0 V não foi apresentada. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; Vazão: $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume injetado: $50 \text{ } \mu\text{L}$.

Como pode ser observado, nos três eletrodos de trabalho estudados, a corrente de oxidação do DCF se inicia próximo de +0,9 V e atinge um valor máximo perto de +1,0V. Estes resultados estão em concordância com estudos apresentados acima empregando voltametria cíclica e em trabalho publicado anteriormente [139] em que o comportamento do DCF foi avaliado usando um eletrodo de grafite em meio de HClO_4 (pH = 1,0).

Baseado nos resultados obtidos por voltametria hidrodinâmica, uma sequência de dois pulsos de potenciais (aplicados alternadamente em função do tempo) foi selecionada e aplicada ao eletrodo de trabalho posicionado no sistema FIA.

- +1,2 V / 50 ms (BDD e GC) e +1,0 V / 50 ms (Au): oxidação e quantificação de DCF;
- 0,0 V / 50 ms: para limpeza da superfície eletródica.

Aplicando esta sequência de pulsos de potenciais, a estabilidade de resposta do sistema FIA foi avaliada para determinação de DCF. Injeções sucessivas ($n = 10$) de soluções contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF foram feitas no sistema FIA-MPA usando cada eletrodo separadamente. A Figura 33A apresenta os amperogramas obtidos para cada eletrodo de trabalho. A Figura 33B foi construída a partir das correntes detectadas com cada eletrodo de trabalho e apresentados na Figura 33A.

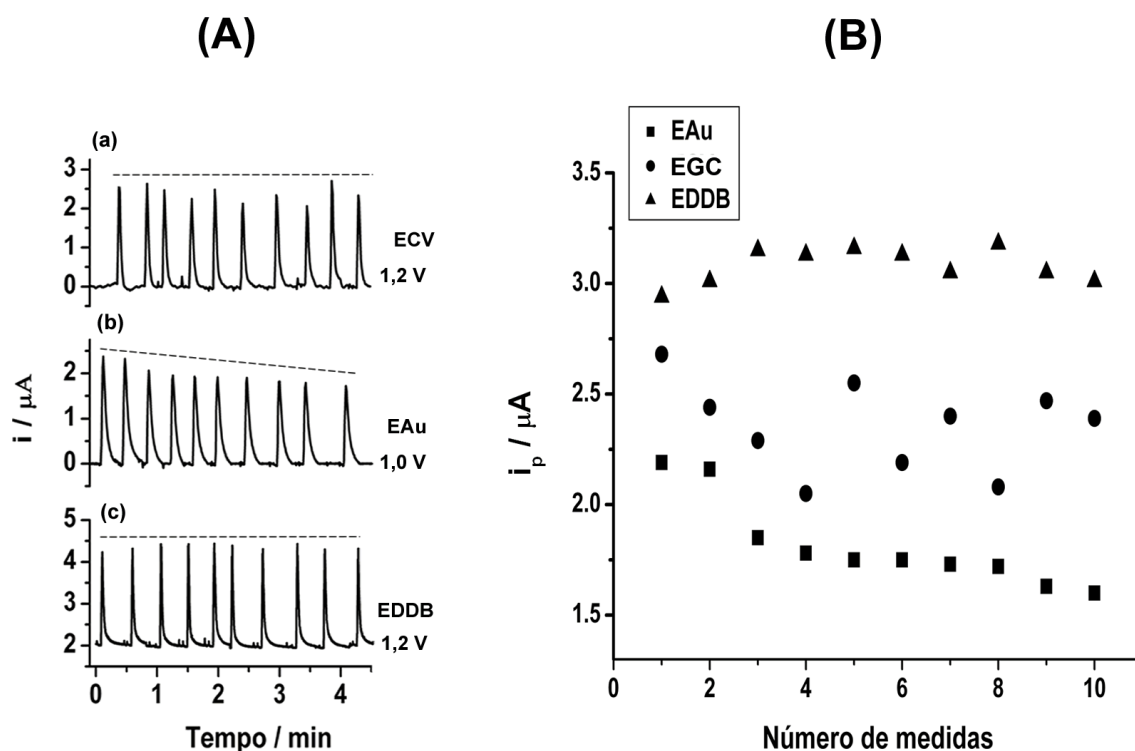


Figura 33. (A) Amperogramas obtidos para 10 injeções sucessivas de uma solução contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF usando GC, Au ou BDD como eletrodos de trabalho. (B) Respectivas correntes de oxidação detectados nos eletrodos de GC (●), Au (■) ou BDD (▲). Pulsos de potenciais aplicados: $+1,2 \text{ V} / 50\text{ms}$ (●,▲), $+1,0 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ (■) e $0,0 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ para todos os eletrodos (etapa de limpeza eletroquímica). Demais parâmetros experimentais iguais a Figura 32.

Como pode ser observado, a oxidação de DCF usando o eletrodo de Au (■) decresce gradativamente após cada injeção no sistema FIA, mesmo com a aplicação do pulso de potencial de $0,0 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ para constante limpeza eletroquímica da superfície deste eletrodo. Usando o eletrodo de GC (●), a resposta amperométrica oscilou consideravelmente e apresentou um desvio padrão relativo de 2,7% ($n = 10$). O melhor resultado foi obtido usando o BDD (▲) como eletrodo de trabalho, onde uma boa estabilidade de resposta foi observada ($\text{DPR} = 1,0\%$; $n = 10$). Portanto, o BDD foi escolhido para ser o eletrodo de trabalho nos estudos a seguir.

Como os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de resposta para a oxidação do DCF utilizando o eletrodo de BDD foram satisfatórios, um estudo foi feito com o objetivo de verificar se o pulso de potencial de limpeza seria ou não necessário. Uma solução contendo $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF foi sucessivamente injetada no sistema FIA utilizando na detecção, ora a amperometria convencional ($E_{\text{cte}} = +1,2 \text{ V}$), ora a MPA ($+1,2 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ e $0,0 \text{ V} / 50 \text{ s}$). Os amperogramas e o gráfico de corrente *versus* número de medidas para esta comparação estão apresentados na Figura 34.

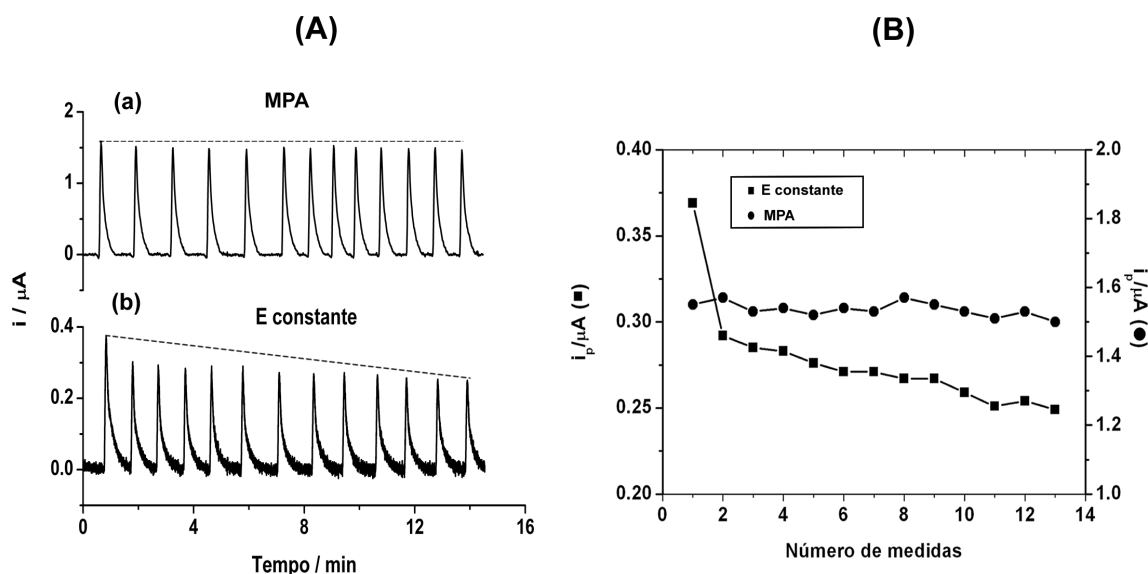


Figura 34. (A) Amperogramas para injeções de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF no sistema FIA utilizando a detecção MPA ($+1,2 \text{ V}$ e $0,0\text{V}$) e amperometria convencional ($+1,2\text{V}$). (B) Respectivas correntes de oxidação do DCF para MPA (●) e amperometria convencional (■). Demais parâmetros experimentais iguais a Figura 32.

Observa-se pelos resultados da Figura 34 que quando a amperometria convencional é utilizada ($E_{\text{cte}} = +1,2 \text{ V}$), a corrente de oxidação do DCF decresce significativamente após cada injeção no sistema FIA indicando que há uma progressiva contaminação do eletrodo de trabalho. Este decréscimo de corrente não ocorre quando se utiliza o mesmo potencial de análise ($+1,2 \text{ V}$) acrescido da aplicação de um pulso de potencial de limpeza eletroquímica ($0,0 \text{ V}$) empregando MPA. Portanto, a amperometria

convencional não é indicada para a detecção de DCF usando um eletrodo de trabalho não modificado.

3.3.1.2. Estabilidade de resposta para a oxidação de DCF em diferentes eletrólitos

Apesar dos estudos realizados inicialmente por voltametria cíclica terem demonstrado que o fenômeno de adsorção é mais intenso em meio de tampão acetato e fosfato, os estudos de repetibilidade empregando o sistema FIA-MPA também foram realizados nos seguintes meios: ácido perclórico, tampão acetato pH 4,7 e fosfato pH 7,0. Os amperogramas e os dados de corrente de oxidação do DCF para este estudo são apresentados na Figura 35.

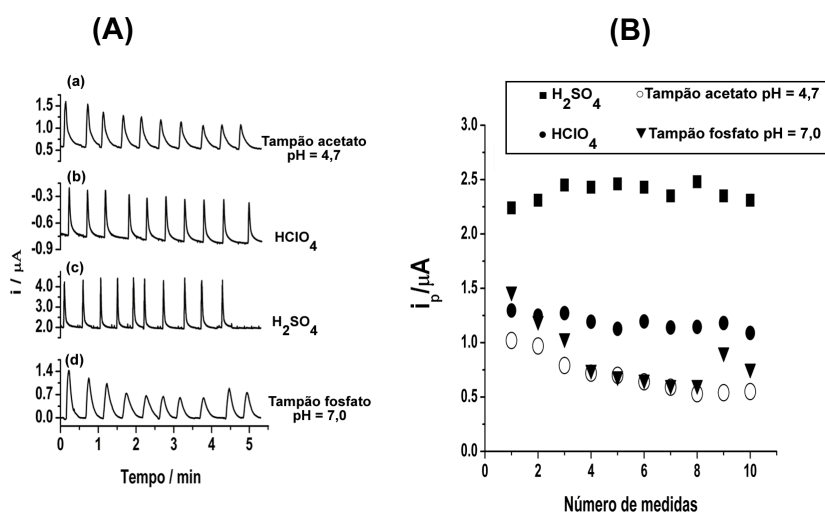


Figura 35. (A) Amperogramas obtidos para injeções no sistema FIA de soluções contendo $50 \mu mol L^{-1}$ de DCF, usando como eletrólito H_2SO_4 , $HClO_4$, tampão fosfato e acetato ($0,1 mol L^{-1}$ cada). (B) Respectivas correntes de oxidação do DCF para (■) H_2SO_4 , (●) $HClO_4$, tampões (▼) fosfato e (○) acetato Pulsos aplicados: $+1,2 V / 50 ms$ e $0,0 V / 50 ms$. Demais parâmetros experimentais iguais a Figura 32.

Como pode ser visto, utilizando o tampão acetato ou fosfato como eletrólito suporte, a corrente de oxidação do DCF diminuiu a cada injeção, com desvio padrão relativo calculado de 7,9% e 10,4%, respectivamente. Provavelmente, a gradativa queda no sinal analítico é devido à adsorção irreversível do DCF ou dos produtos de oxidação deste na superfície do eletrodo, mesmo usando o pulso potencial de limpeza, o que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente por voltametria cíclica. Quando o HClO_4 e H_2SO_4 foram usados como eletrólito suporte, os dados de repetibilidade calculados podem ser considerados adequados em ambos os casos ($\text{DPR} = 1,7$ e $1,1\%$, respectivamente; $n = 10$). Baseado nestes experimentos, o H_2SO_4 foi confirmado como eletrólito suporte para determinação de DCF. O HClO_4 também poderia ser utilizado, no entanto, é mais caro e seu manuseio requer cuidados especiais.

3.3.1.3. Otimizações de parâmetros do sistema FIA

A influência dos parâmetros como vazão e volume injetado na resposta do sistema FIA também foi avaliada a fim de obter as melhores condições de sensibilidade e frequência analítica. A influência da vazão da solução carregadora ($1,0$ a $4,0 \text{ mL min}^{-1}$) e o volume injetado (50 a $300 \text{ }\mu\text{L}$) foram estudados com as otimizações feitas até o momento:

- (1) Aplicação de dois pulsos de potenciais: $+1,2 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ para oxidação do DCF e $0,0 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ para constante limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo;
- (2) Eletrodo de trabalho: BDD;
- (3) H_2SO_4 como eletrólito suporte.

A Figura 36 apresenta o amperograma obtido para injeções de solução contendo $50 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF em função da variação na vazão do sistema FIA.

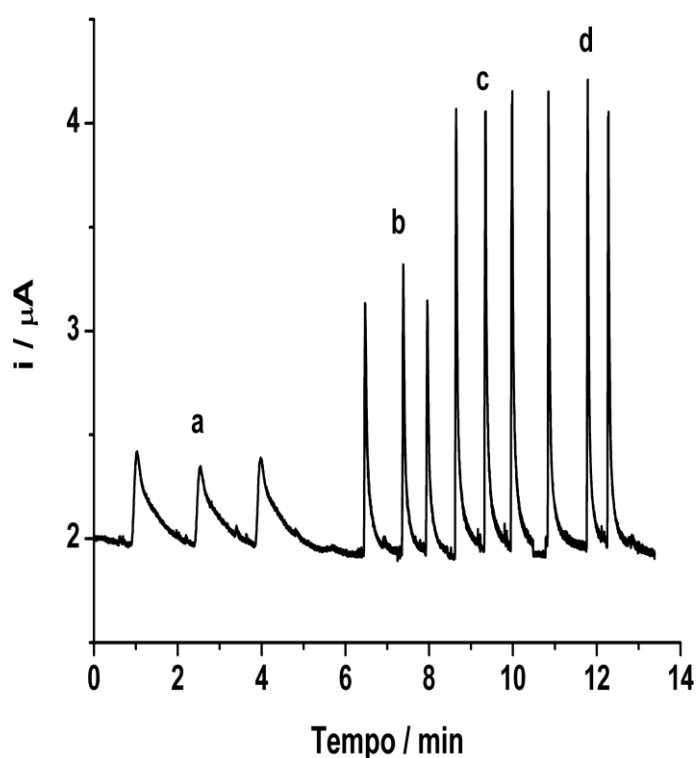


Figura 36. Amperogramas obtidos para injeções de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF em função da variação na vazão do sistema FIA (a) 1,0 (b) 2,0 (c) 3,0 e (d) 4,0 mL min^{-1} . Alça de amostragem: 300 μL . Eletrólito suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$.

Como pode ser visto, a corrente máxima e constante de oxidação do DCF é atingida a partir de vazões iguais a $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 36c). Em vazões inferiores, a corrente detectada é menor, assim como a frequência analítica. Logo, a vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionada para os demais estudos.

A Figura 37 apresenta o amperograma para a oxidação de DCF em função da variação do volume injetado no sistema FIA.

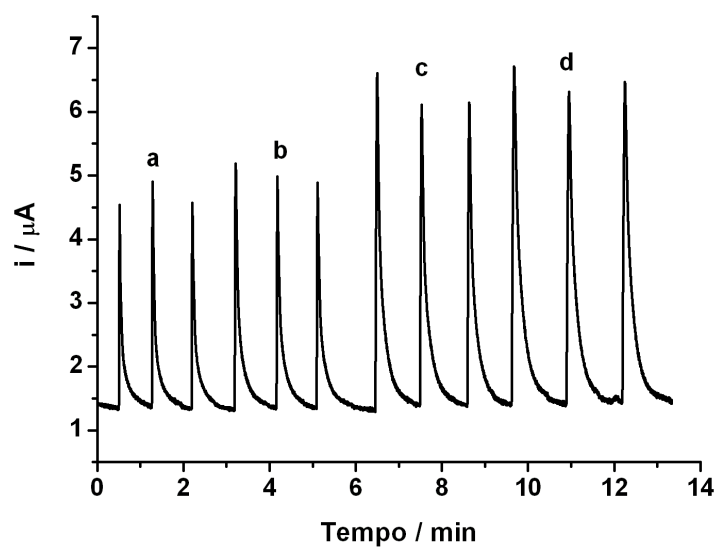


Figura 37. Amperogramas obtidos para injeções de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF variando o volume injetado no sistema FIA: (a) 50,0 (b) 100,0 (c) 200,0 e (d) 300,0 μL . Vazão: $3,0 \text{ mL min}^{-1}$. Eletrólito suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$.

A corrente de oxidação do DCF aumenta com o aumento no volume injetado até atingir 300 μL (Figura 37c). No entanto, o volume de injeção de 50 μL foi selecionado com o objetivo de reduzir o consumo de amostras e reagentes, aumentar a frequência de amostragem e diminuir a probabilidade de contaminação do eletrodo de trabalho. Tudo isto sem perda significativa de sensibilidade.

3.3.1.4. Precisão do método proposto

A precisão do método proposto foi avaliada em termos de repetibilidade intra e entre-dias. A repetibilidade intra-dias foi determinada por medidas sucessivas no mesmo dia ($n=10$) de soluções contendo DCF em duas concentrações diferentes. Já a repetibilidade entre-dias também foi determinada através da análise de soluções com

duas concentrações diferentes em 3 dias distintos ($n = 3$). Os desvios padrões relativos (DPR) obtidos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos no estudo de repetibilidade intra e entre-dias na determinação de DCF por FIA-MPA.

Concentração de DCF ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	intra-dias DPR ^a (%)	entre-dias DPR ^b (%)
40	1,1	8,7
50	2,0	10,3

^a($n = 10$); ^b($n = 3$);

Os resultados da repetibilidade intra e entre-dias obtidos podem ser considerados satisfatórios com DPR menores que 2,0% e 10,3%, respectivamente.

3.3.1.5. Determinação de DCF em amostras farmacêuticas

O desempenho do método FIA-MPA foi avaliado na quantificação de DCF em amostras farmacêuticas. A Figura 38B apresenta o amperograma para injeções de 50 μL em triplicata de soluções padrões de DCF em concentrações crescentes (a-f: 5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e decrescentes (f-a: 50 a 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras farmacêuticas adequadamente diluídas em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} (1 e 2).

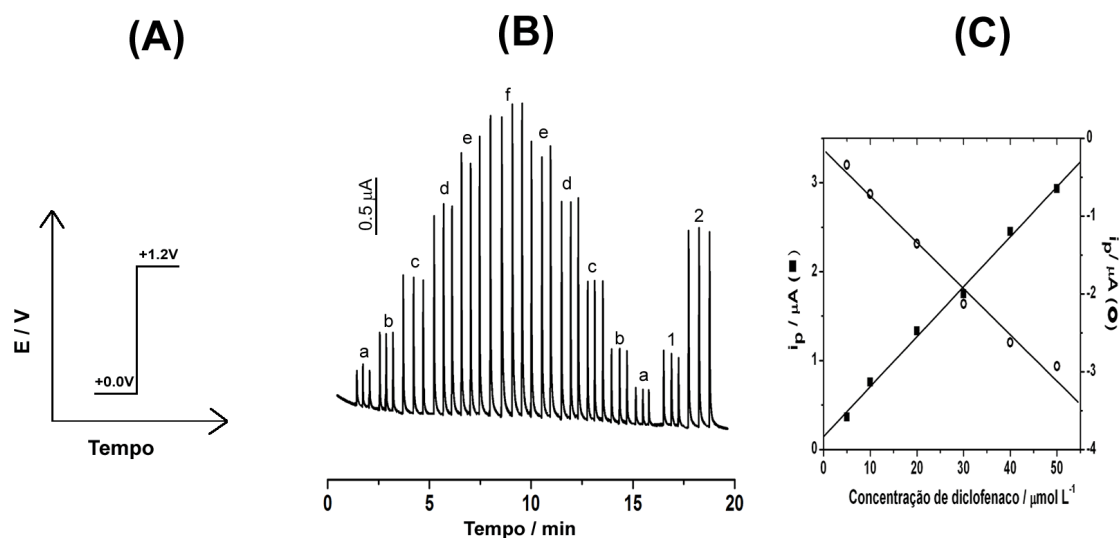


Figura 38. (A) Escada de potencial aplicado ao eletrodo de BDD (forma cíclica) em função do tempo. (B) Amperogramas obtidos para sucessivas injeções ($n = 3$) de solução contendo concentrações crescentes e decrescentes de DCF (a-f: 5 – 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras farmacêuticas (1,2). (C) Respectiva curva de calibração. Demais parâmetros experimentais iguais a Figura 32.

Conforme apresentado na Figura 38C, as curvas de calibração obtidas no sentido crescente (■) e decrescente (○) foram lineares na faixa de concentração estudada e apresentaram sensibilidades similares (inclinação da curva) com as seguintes equações de reta:

a) sentido crescente (■):

$$i (\mu\text{A}) = 0,08999 (\pm 0,0577) + 0,05774 (\pm 0,0018) c; \quad R = 0,997$$

b) sentido decrescente (○):

$$i (\mu\text{A}) = -0,14748 (\pm 0,1209) - 0,05947 (\pm 0,0040) c; \quad R = 0,991$$

Os limites 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) e quantificação ($LQ = (10 \times DP_{\text{Branco}} - C_L) / S$) para o DCF por FIA-MPA foram calculados em 1,44 e 4,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$,

respectivamente. A frequência analítica do método foi calculada em 135 injeções por hora.

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos na determinação de DCF em 6 amostras farmacêuticas. Os resultados são apresentados com seus respectivos desvios padrões ($n = 3$) e são comparados aos resultados obtidos por cromatografia líquida (HPLC). Estudos de adição e recuperação também foram realizados com a adição de duas concentrações diferentes de DCF às amostras adequadamente diluídas. As amostras foram analisadas antes e após adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (amostras A, B e C) e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (amostras D e E). Os dados de recuperação (média \pm DPR; $n = 3$) também são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Comparação dos resultados (média \pm DPR; $n = 3$) obtidos na determinação de DCF em amostras farmacêuticas usando FIA-MPA e HPLC.

Amostra	Valor rotulado (mg/tablete)	Valor encontrado (mg/tablete)		Teste- t^b	Teste- F^c	Recuperação (%)
		FIA ^a	HPLC			
A	50	46 ± 3	49 ± 4	1,04	2,0	104 ± 2
B	50	57 ± 6	54 ± 3	0,80	4,0	110 ± 4
C	50	52 ± 2	52 ± 1	0,00	4,0	109 ± 7
D	50	44 ± 3	44 ± 1	0,00	9,0	94 ± 4
E	50	48 ± 2	47 ± 2	0,66	1,0	105 ± 2

^a FIA: método proposto; ^b $t_{\text{tabelado}} = 4,30$; ^c $F_{\text{tabelado}} = 19,0$

Como pode ser observado na Tabela 7, não há diferenças significativas entre os dois métodos (FIA e HPLC), o que indica a ausência de erros sistemáticos. Para avaliar a concordância dos resultados obtidos pelos dois métodos aplicou-se o teste t . Sendo que os resultados obtidos para as concentrações de DCF obtidos pelos dois métodos não

apresentam diferenças significativas a um nível de confiança de 95%, e em todos os casos o $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}} = 4,30$. O teste F foi utilizado com o objetivo de avaliar a precisão entre os dois métodos e nenhuma diferença significativa foi detectada nos desvios padrões entre os resultados dos dois métodos a um nível de confiança de 95% (em todos os casos $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}} = 19,0$).

3.3.1.6. Determinação de DCF usando BIA e o método do padrão interno

Nas sessões anteriores (item 3.2.1 e item 3.2.2) foi demonstrado que o método do padrão interno pode ser utilizado nos sistemas FIA e BIA para corrigir eventuais oscilações em parâmetros destes sistemas. Diante disso, a determinação de DCF por BIA usando uma seringa descartável no procedimento de injeção também foi proposta. Propõe-se anular as flutuações no volume e velocidade de injeção empregando o método do padrão interno (i_{DCF+PI}/i_{PI}).

As condições otimizadas em FIA (eletrólito, eletrodo de trabalho de BDD e faixa linear de resposta) foram mantidas no sistema BIA, porém, foi necessário selecionar novos pulsos de potenciais para detecção simultânea de DCF e PI. Inicialmente, com auxílio de uma pipeta motorizada, três soluções distintas foram injetadas no sistema BIA: (i) $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (PI), (ii) $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF e, (iii) mistura de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} + \text{DCF}$ (30 e $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente). Os amperogramas para este estudo são apresentados na Figura 39.

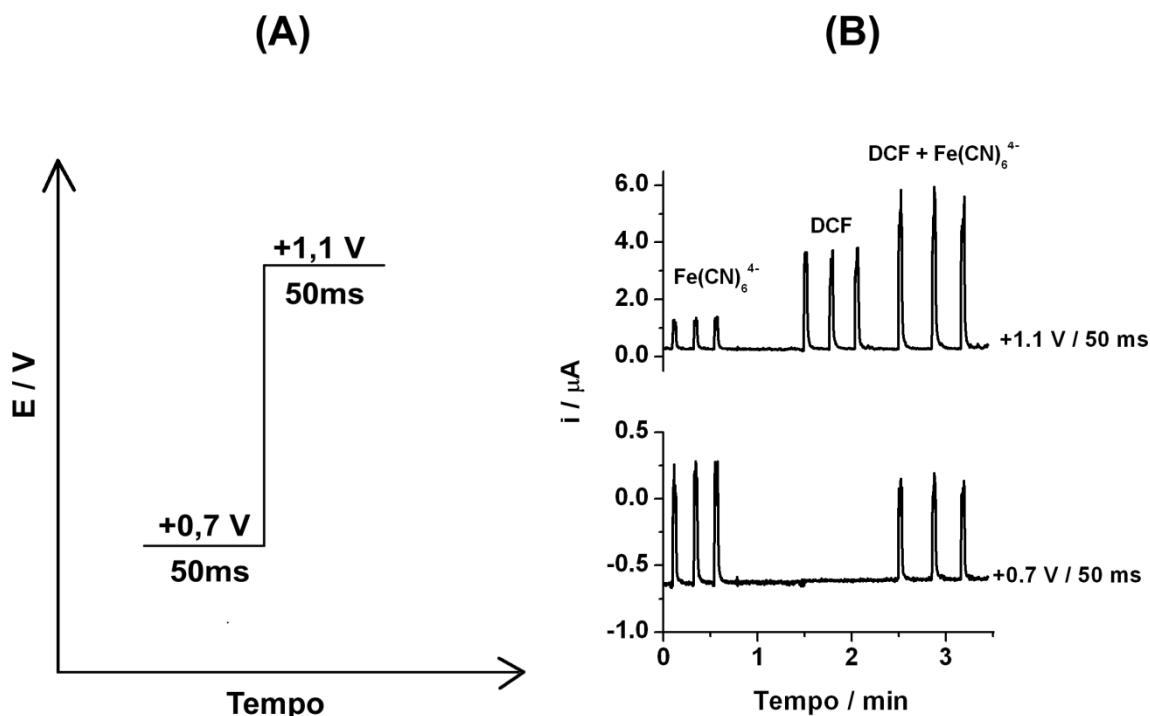


Figura 39. (A) Escada de potencial aplicado ao eletrodo de BDD em função do tempo. (B) Amperogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo $30\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe(CN)_6^{4-} (PI), $40\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF e PI + DCF ($30 + 40\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente). Eletrólito suporte: $\text{H}_2\text{SO}_4\text{ }0,1\text{ mol L}^{-1}$; Volume injetado; $150\text{ }\mu\text{L}$; Velocidade de injeção: $4,5\text{ mL min}^{-1}$.

Observa-se pelo amperograma da Figura 39B que no pulso de potencial $+0,7\text{ V}$, apenas o $[\text{Fe(CN)}_6]^{4-}$ (PI) é oxidado e a corrente detectada apresenta a mesma magnitude do que a solução contendo $[\text{Fe(CN)}_6]^{4-} + \text{DCF}$. No pulso de potencial de $+1,1\text{ V}$, os dois compostos (DCF e $[\text{Fe(CN)}_6]^{4-}$) são oxidados. Assim, como demonstrado na seção 3.2.2, a normalização dos resultados pode ser feita pela razão das correntes detectadas em ambos os pulsos de potenciais ($i_{\text{DCF+PI em } +1,1\text{ V}} / i_{\text{PI em } +0,7\text{ V}}$).

Para este estudo, uma curva de calibração foi feita a partir de injeções de soluções contendo concentrações crescentes de DCF ($10 - 50\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) e constantes de PI ($30\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe(CN)_6^{4-}). A Figura 40 apresenta os amperogramas para estas injeções e as respectivas curvas de calibração com e sem o uso do PI.

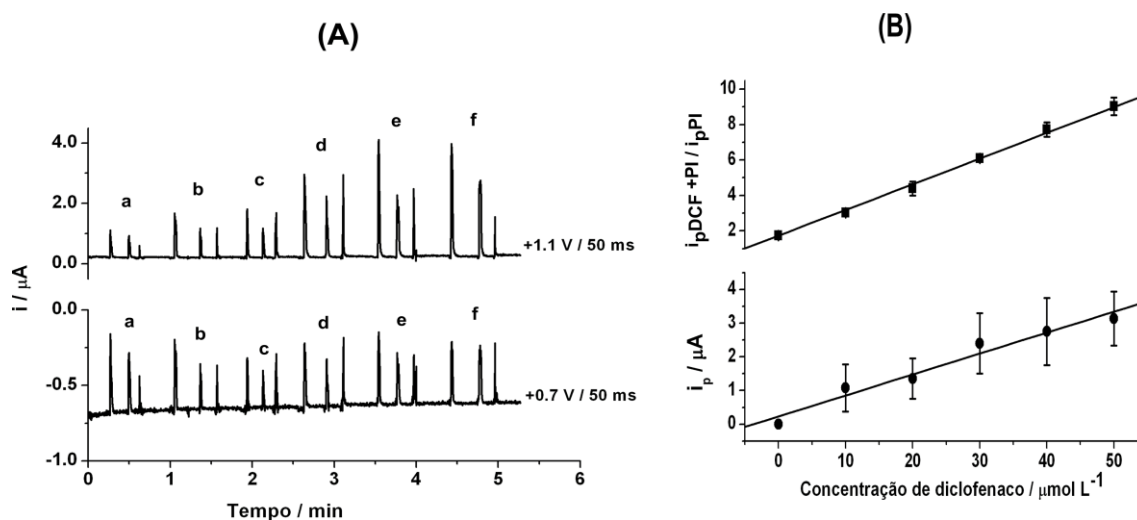


Figura 40. (A) Amperogramas obtidos para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de DCF (b) 10, (c) 20, (d) 30, (e) 40, (f) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e constantes do PI (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$). (B) Curvas de calibração para o DCF com (\blacksquare ; i_{DCF+PI}/i_{PI}) e sem (\bullet ; i_{DCF}) o uso do método do PI. Para outras condições experimentais ver Figura 39.

Como pode ser visualizado, a curva de calibração para o DCF, sem normalização dos resultados, apresenta um coeficiente de correlação ruim ($R = 0,982$) e altos desvios padrões entre as medidas ($n = 3$), uma vez que as injeções (volume e velocidade) com a seringa descartável não são reprodutíveis. Com a normalização dos resultados (i_{DCF+PI}/i_{PI}), uma melhora significativa no coeficiente de correlação é alcançada ($R = 0,999$) e pequenos desvios entre as replicatas são observados, indicando que o método do PI pode ser utilizado em determinações de DCF em sistemas BIA com o procedimento de injeção sendo efetuado usando uma seringa descartável (originalmente usada na aplicação de insulina).

3.3.1.7. Conclusões parciais – determinação de DCF

Demonstrou-se pela primeira vez que um eletrodo não modificado (BDD) pode ser usado para determinação de DCF por FIA com detecção amperométrica. O pré-tratamento das amostras se restringe a uma simples dissolução e posterior diluição da amostra no eletrólito suporte. O método também é rápido (135 injeções h^{-1}), preciso ($\text{RSD} = 1,0\%$; $n = 10$), sensível ($\text{LD} = 0,14 \mu\text{mol L}^{-1}$) e pode ser facilmente adaptado para procedimentos de rotina. O desempenho analítico do sistema FIA foi avaliado pela determinação de DCF em formulações farmacêuticas, com a obtenção de resultados similares aos obtidos por HPLC. Adicionalmente, também foi demonstrado que o DCF pode ser determinado por BIA-MPA utilizando no procedimento de injeção uma seringa descartável. Neste caso, as flutuações no volume e velocidade de injeção são anuladas empregando o método do padrão interno.

3.3.2. Determinação de DCF e CO

3.3.2.1. Comportamento eletroquímico do DCF e CO

Inicialmente, o comportamento eletroquímico da CO e do DCF foram estudados utilizando BDD como eletrodo de trabalho e voltametria cíclica. A varredura foi registrada na faixa de trabalho entre 0,0 V e +1,5 V vs Ag/AgCl em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} . A Figura 41 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para este estudo.

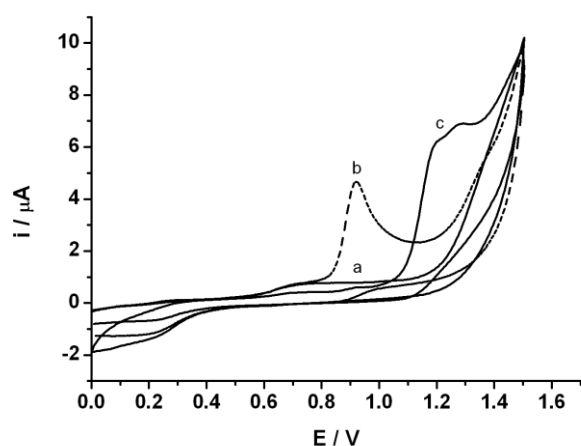


Figura 41. Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sem (a) e com a presença de (b) $60 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF e (c) $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de CO. ET: BDD. Faixa de trabalho: 0,0 a 1,5 V vs Ag/AgCl; velocidade de varredura = 50 mV s^{-1} .

O comportamento do DCF neste meio já foi descrito na sessão anterior (item 3.3.1.1). A CO (Figura 41c) apresenta um comportamento irreversível, com pico máximo de oxidação em +1,2 V. Como pode ser observado, há uma boa separação (cerca de 0,30 V) entre os picos de oxidação do DCF (+0,9 V) e da CO (+1,2 V). O mecanismo de oxidação da CO foi descrito anteriormente [164, 185, 186] e presume-se que a bis-codeína é o único produto de oxidação (Figura 42).

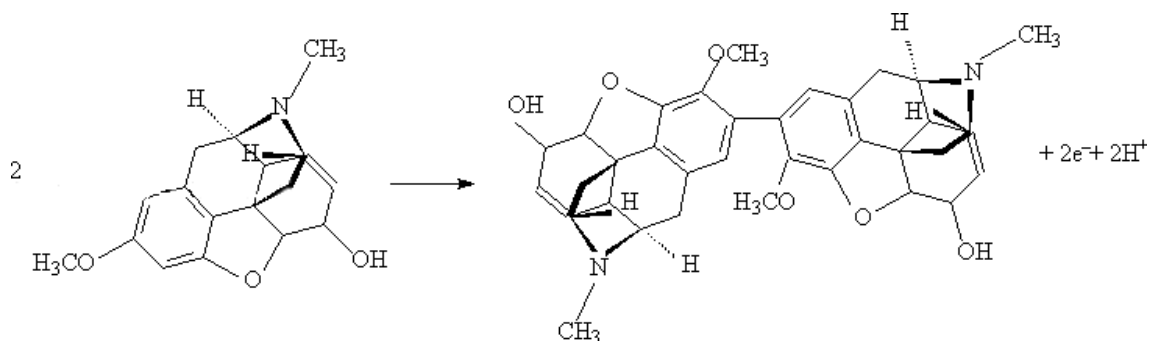


Figura 42. Reação de oxidação eletroquímica da codeína.

Os estudos apresentados foram feitos no modo estacionário, sendo que o intuito deste trabalho é realizar as análises sob condições hidrodinâmicas. Assim, outro estudo foi realizado para avaliar o comportamento eletroquímico do DCF e CO em condições hidrodinâmicas (BIA), as quais são similares às usadas na análise (Figura 43B). Neste estudo, dez pulsos de potenciais, 70 ms cada (+0,80; +0,90; +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5; +1,6 e +1,7) foram aplicados continuamente ao eletrodo de trabalho de BDD (Figura 43A). A corrente de cada pulso de potencial (simultânea aquisição dos 10 amperogramas) foi continuamente monitorada durante três injeções de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CO. A corrente de pico detectada em cada pulso de potencial foi usada na construção do voltamograma hidrodinâmico para oxidação do DCF e CO (Figura 43B).

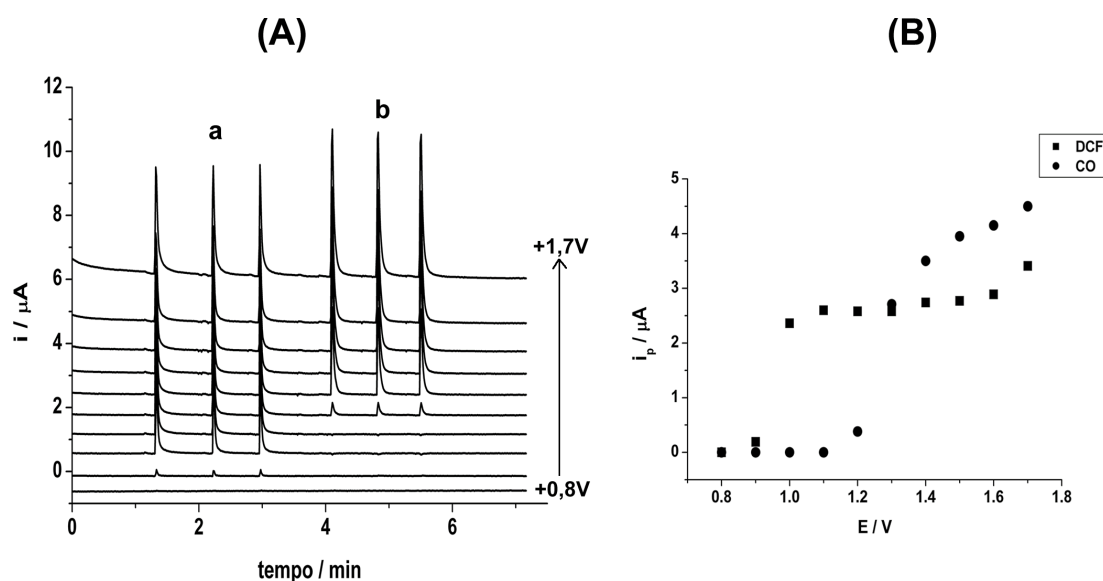


Figura 43. (A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF (a) e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CO (b). (B) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para o DCF (■) e CO (●). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 70 ms; Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; Vazão: $6,0 \text{ ml min}^{-1}$; Volume injetado: $100 \mu\text{L}$.

Como pode ser observado, em condições hidrodinâmicas, a oxidação do DCF se inicia em torno de +0,9 V e atinge um valor máximo próximo de +1,0 V e a oxidação da

CO se inicia +1,2 V e vai aumentando sem alcançar um valor máximo de corrente no intervalo de pulsos de potencial estudados (+0,8 V a +1,8 V).

3.3.2.2. Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de DCF e CO

Com base nos resultados apresentados nas Figuras 41 e 43, os seguintes pulsos de potenciais foram selecionados para determinação simultânea de DCF e CO:

- +1,1 V/50 ms: oxidação de DCF sem a interferência da CO;
- +1,4 V/50 ms: oxidação de ambos os analitos (DCF e CO)

A Figura 44B apresenta os amperogramas obtidos nos pulsos de potenciais +1,1 V e +1,4 V para injeções no sistema BIA-MPA em triplicata de soluções contendo DCF, CO e DCF + CO.

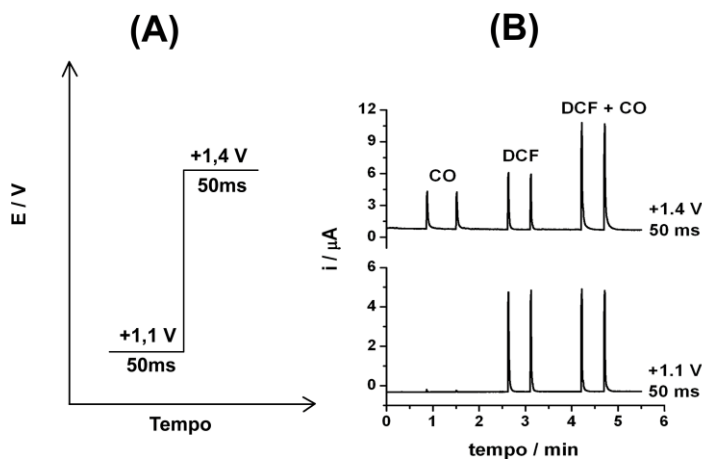


Figura 44. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD posicionado no sistema BIA-MPA. (B) Amperogramas obtidos para injeções de soluções contendo: $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CO; $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF e DCF + CO ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$ cada). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms. Demais condições experimentais iguais a Figura 43.

Como podem-se observar pelos amperogramas da Figura 44B, apenas o DCF é oxidado em +1,1 V, sendo que corrente detectada é a mesma na presença ou ausência de CO, indicando que não há interação química entre DCF e CO e destes com os produtos de oxidação. Em +1,40 V, tanto o DCF como a CO são oxidados. Na injeção de uma solução contendo ambos os analitos (DCF + CO), o sinal de oxidação em +1,40 V corresponde à soma das correntes individuais do DCF e da CO neste pulso de potencial. Um fenômeno que deve ser observado é que a oxidação do DCF não gera a mesma magnitude de corrente em ambos os pulsos de potenciais (+1,10 e +1,40 V), o que impede o uso de uma subtração simples do sinal amperométrico ($i_{+1,40\text{ V}} - i_{+1,1\text{ V}}$) para ter acesso à corrente de oxidação relacionado somente com a CO. No entanto, este problema pode ser contornado através do uso de um fator de correção (FC), que é obtido pelo cálculo da razão entre a corrente de oxidação do DCF obtida em +1,40 V pela corrente de DCF em +1,10 V mediante a injeção de solução contendo apenas DCF [34]. Assim, quando uma solução contendo os dois compostos é injetada, a corrente de oxidação da CO pode ser obtida pela subtração entre a corrente detectada em +1,40 V e a corrente detectada em +1,10 V multiplicada pelo FC . As equações 1 e 2 serão usadas nos cálculos para obtenção das correntes relacionadas com a oxidação de CO e do FC , respectivamente.

$$I_{CO} = i_{+1,40\text{ V}} - (FC \times i_{+1,1\text{ V}}) \quad (1)$$

$$FC = i_{DCF\text{ em }1,4\text{ V}} / i_{DCF\text{ em }1,1\text{ V}} \quad (2)$$

Assim, com os dois amperogramas adquiridos simultaneamente (em 1,1 e 1,4 V) e as equações acima é possível detectar seletivamente as correntes de oxidação do DCF e da CO quando presentes na mesma solução.

3.3.2.3. Influência da agitação mecânica no sistema BIA-MPA

Os experimentos em sistemas BIA podem ser feitos com e sem constante agitação da solução presente na célula. Para investigar o efeito deste parâmetro, injeções em duplicata de soluções contendo DCF e CO ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$ cada) foram feitas no sistema BIA na presença e ausência de agitação. Os amperogramas para este estudo são apresentados na Figura 45.

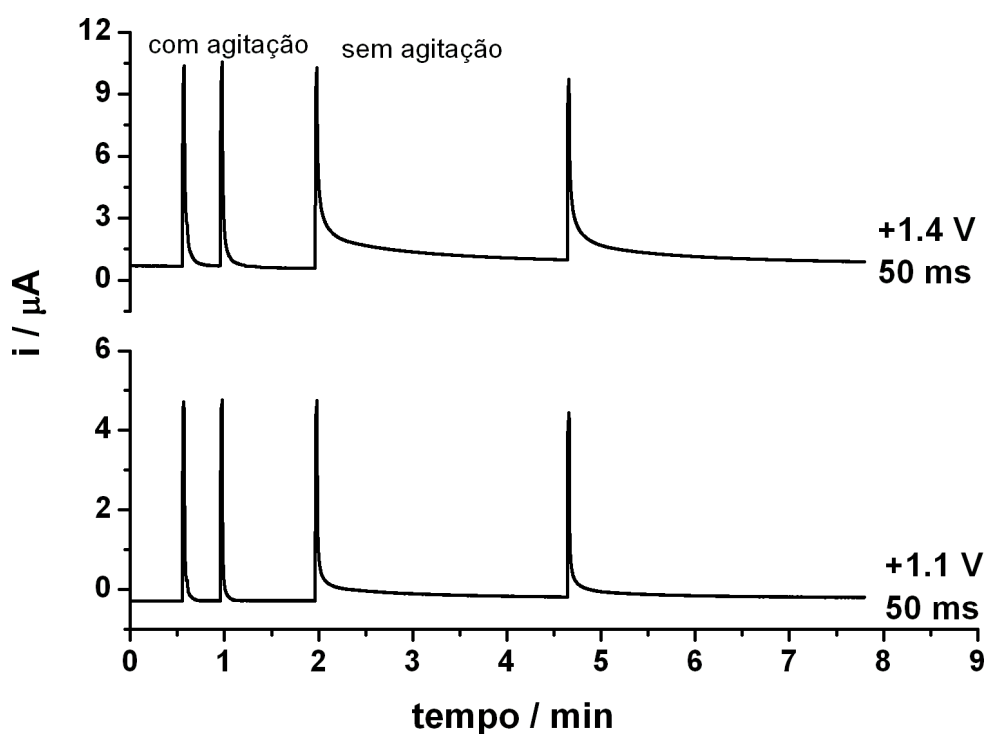


Figura 45. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA com e sem agitação da solução contida na célula. Solução injetada: $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CO + $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF. Demais parâmetros experimentais iguais a Figura 43.

Com a solução sob agitação, o pico transiente decresce rapidamente, retornando a linha base e uma excelente frequência analítica pode ser obtida (~ 300 injeções h^{-1}). Sem agitação mecânica, o pico transiente decresce lentamente a linha base e há uma diminuição da frequência analítica (~ 25 injeções h^{-1}). Isto ocorre porque, sob agitação,

ambos os compostos são facilmente removidos da superfície do eletrodo. Além disso, o procedimento de limpeza ou ativação é mais eficaz se a solução estiver sob agitação. Desse modo, a agitação foi usada nos demais testes.

3.3.2.4. Estudo do *FC*

O acesso à corrente de oxidação da CO é dependente do *FC*, portanto, este deve apresentar um valor relativamente constante durante a análise. Neste sentido, um estudo detalhado foi realizado para verificar a influência de parâmetros como volume injetado, velocidade de injeção e concentração de DCF no valor do *FC*.

Na Figura 46A e B são apresentadas as variações do *FC* em função da variação na velocidade ou volume de injeção de solução contendo DCF, respectivamente.

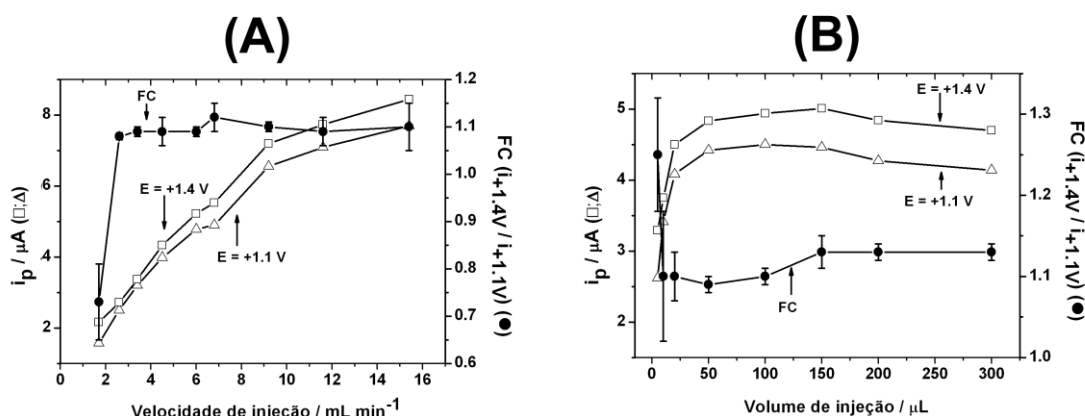


Figura 46. Sinais médios ($n=3$) de corrente de oxidação e *FC* obtidos para injeções de solução contendo $40\ \mu mol\ L^{-1}$ de DCF em função da: (A) velocidade de injeção e (B) volume injetado. Condições: Volume injetado: $100\ \mu L$ em (A); Velocidade de injeção: $6\ mL\ min^{-1}$ em (B). Demais parâmetros experimentais iguais a Figura 43.

Na Figura 46A é possível verificar que há um aumento nas correntes de oxidação do DCF nos pulsos de potenciais de $+1,1\ V$ e $+1,4\ V$ conforme aumenta a velocidade de injeção do analito. Isto ocorre devido ao aumento na taxa de transporte de massa por

unidade de tempo para a superfície do eletrodo de trabalho. O sinal amperométrico não chegou a um valor máximo e constante, provavelmente, devido à elevada área do eletrodo de trabalho ($22,9 \text{ mm}^2$). As correntes de oxidação do DCF em $+1,1 \text{ V}$ e em $+1,4 \text{ V}$ aumentaram proporcionalmente na faixa de velocidade estudada ($1,7$ a $15,7 \text{ mL min}^{-1}$) e o FC se manteve praticamente constante ($FC = 1,100 \pm 0,004$). Assim, a velocidade de injeção de $4,5 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionada para as determinações de DCF e CO. Nesta velocidade, a análise é rápida e o DPR em estudo de repetibilidade é baixo. Na Figura 46B podemos perceber que a corrente de oxidação do DCF aumenta nos dois pulsos de potenciais aplicados ($+1,1 \text{ V}$ e $+1,4 \text{ V}$) até um volume injetado de $20 \text{ }\mu\text{L}$. A partir deste volume até $300 \text{ }\mu\text{L}$, as correntes de oxidação de DCF nos dois pulsos de potenciais são praticamente constantes e o FC também apresenta um valor constante ($1,100 \pm 0,008$). Assim o volume injetado de $150 \text{ }\mu\text{L}$ foi adotado para as injeções no sistema BIA, uma vez que sensibilidade, reprodutibilidade e alta frequência analítica são alcançadas.

O FC também foi estudado em função da variação na concentração do DCF. Este fator será usado para identificar a corrente de oxidação proveniente da CO no pulso de potencial de $+1,4 \text{ V}$ ($i_{CO} = i_{1,4V} - (\text{fator} \times i_{1,1V})$). A Figura 47 apresenta os resultados obtidos.

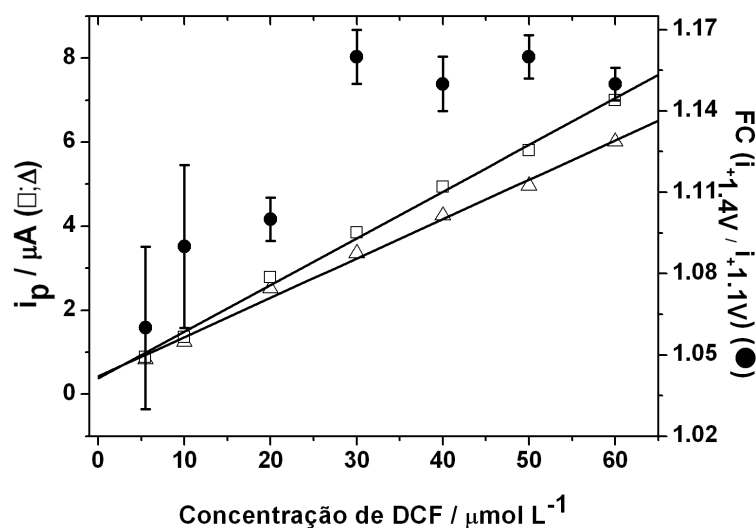


Figura 47. Curvas de calibração para injeções de concentração crescente de DCF (5,5 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$) nos potenciais + 1,1 V (Δ) e +1,4 V (\square) e respectivo FC (\bullet). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 70 ms; Eletrólito suporte: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} ; Vazão: 4,5 ml min^{-1} ; Volume injetado: 150 μL .

Como pode ser observado na Figura 47, o DCF apresenta um comportamento linear na faixa de concentração entre 5,5 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tanto no pulso de potencial de +1,1 V (Δ ; $R = 0,997$), quanto no pulso de potencial de +1,4 V (\square ; $R = 0,998$). Já o FC (\bullet), apresenta um valor médio de $1,12 \pm 0,04$ (DPR = 3,6%) indicando que na faixa de concentração estudada, o valor é relativamente constante. Na construção de uma curva de calibração, sempre é aconselhável que uma solução contendo apenas DCF seja injetada no sistema BIA (obtenção do FC). Pequenas variações na superfície do eletrodo BDD decorrentes de diferenças nos procedimentos de limpeza pode afetar o valor a ser usado com FC .

3.3.2.5. Estudo de repetibilidade do método

A estabilidade do eletrodo de BDD acoplado ao sistema BIA-MPA foi avaliada em relação a sucessivas injeções ($n=10$) de duas soluções distintas: $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF (para cálculo do FC) e DCF ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$) + CO ($43 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os amperogramas para este estudo são apresentados na Figura 48.

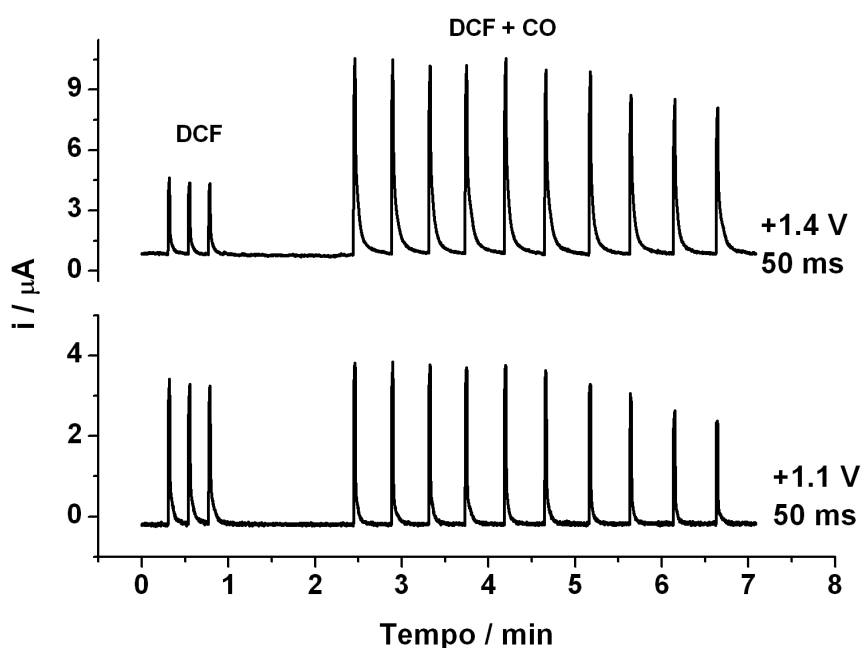


Figura 48. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de solução contendo $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF ($n=3$) ou $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF + $43 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CO ($n=10$). Para outras condições experimentais ver Figura 47.

Como podemos observar, após 5 injeções no sistema há uma diminuição do sinal analítico de oxidação tanto no potencial +1,1 V (oxidação de DCF) quanto no potencial de +1,4 V (oxidação de DCF e CO) e um alto desvio padrão relativo foi calculado, tanto para o DCF (4,7%; $n = 10$), quanto para a CO (2,4%; $n=10$). Isto provavelmente se deve à contaminação e/ou passivação da superfície do eletrodo. Uma alternativa para este problema foi selecionar um terceiro pulso de potencial para a constante limpeza

eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho. A sequência dos pulsos de potenciais aplicados, portanto, ficou da seguinte maneira:

- (1) +1,1 V / 50 ms: oxidação e quantificação de DCF;
- (2) +1,4 V / 50 ms: para oxidação simultânea de DCF e CO;
- (3) 0,0 V / 200 ms: para constante limpeza da superfície do BDD.

Selecionado o pulso de potencial para a limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de BDD, o teste de repetibilidade foi repetido com as mesmas condições usadas na Figura 48. Os amperogramas obtidos são apresentados na Figura 49.

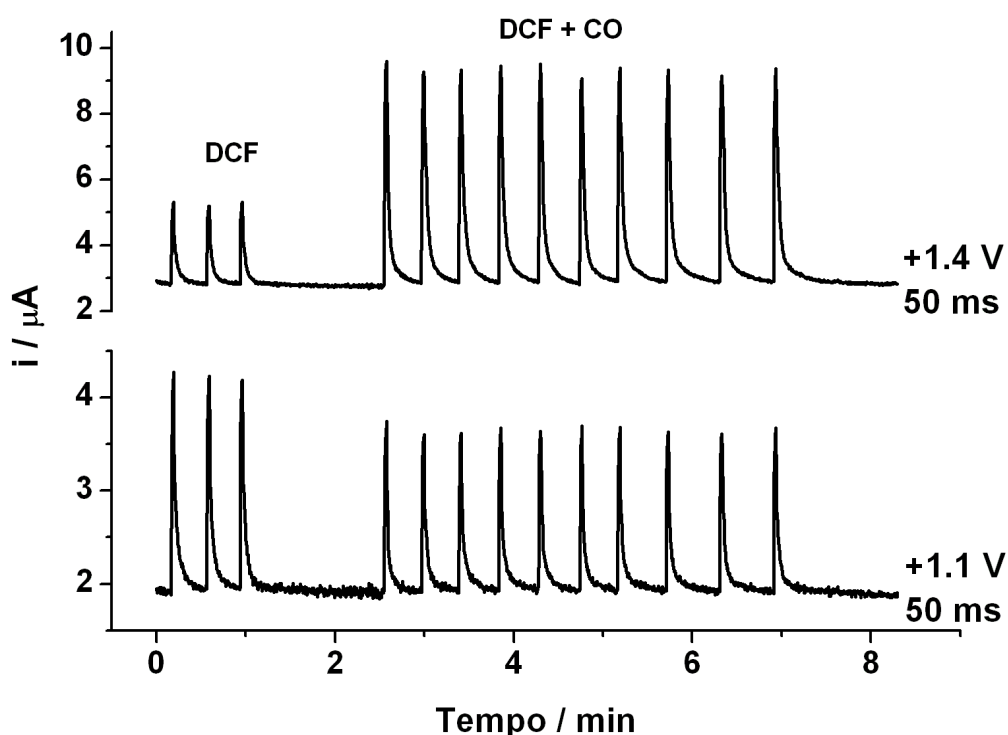


Figura 49. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de solução contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF (n=3) ou 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF + 43 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CO (n=10). O amperograma para o pulso de potencial 0,0 V/200ms não está apresentado. Para outras condições experimentais ver Figura 47.

Como pode ser observado, a inclusão de um pulso de potencial de limpeza eletroquímica possibilitou a obtenção resultados satisfatórios, uma vez que a corrente de

oxidação em ambos os potenciais (+1,1 e +1,4 V) se mantiveram constantes e baixos desvios padrões relativos foram alcançados (1,1% para DCF e 0,9% para CO; n=10), demonstrando um bom desempenho do método.

O sistema também foi avaliado em relação à repetibilidade quando soluções contendo diferentes concentrações foram injetadas. A Figura 50 apresenta os resultados obtidos quando três soluções contendo concentrações distintas foram injetadas no sistema BIA-MPA: 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF, 10 + 7 ou 50 + 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DCF + CO, respectivamente.

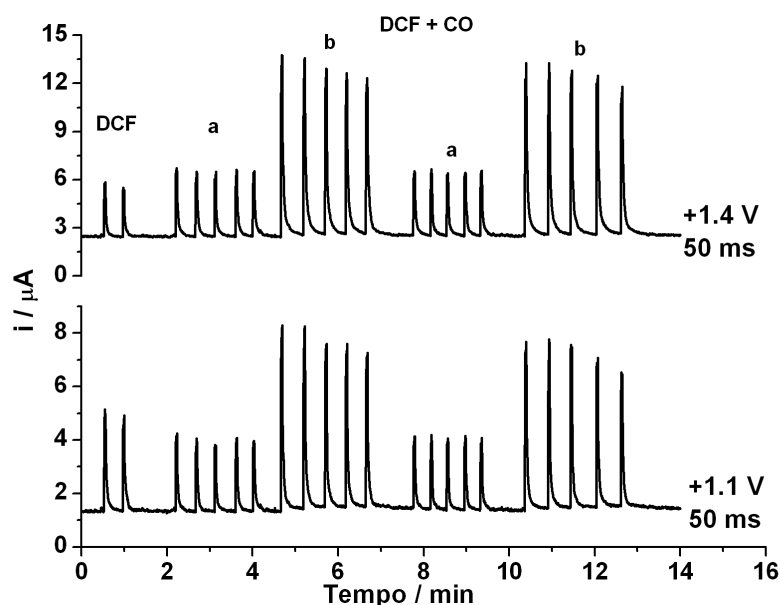


Figura 50. Amperogramas obtidos para 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF e 10 + 7 (a) ou 50 + 36 (b) $\mu\text{mol L}^{-1}$ DCF + CO, respectivamente. Para outras condições experimentais ver Figura 47.

O sistema apresentou novamente boa repetibilidade e ausência de efeito memória, pois nestas condições, o DPR (n = 10) foi calculado em 1,3 e 1,8% (Figura 50a) ou em 3,0 e 1,4 (Figura 50b) para DCF e CO, respectivamente.

3.3.2.6. Aplicações do sistema BIA-MPA na análise de formulações farmacêuticas

O desempenho do método proposto foi avaliado na quantificação de DCF e CO em formulações farmacêuticas comerciais. As curvas de calibração para ambos os compostos foram obtidas levando-se em consideração a faixa de concentração onde o fator de correção (*FC*) é constante e a proporção molar de concentração encontrada em amostras de formulações farmacêuticas (aproximadamente 1,4 vezes mais DCF do que CO). A Figura 51 apresenta os amperogramas obtidos em +1,1 V e +1,4 V para injeções em triplicata de soluções em ordem crescente (c-g) e decrescente (g-c) de concentração. Duas amostras de formulações farmacêuticas previamente diluídas no eletrólito suporte (1 e 2) e duas soluções contendo somente DCF (a, b; cálculo do *FC*) também foram injetadas.

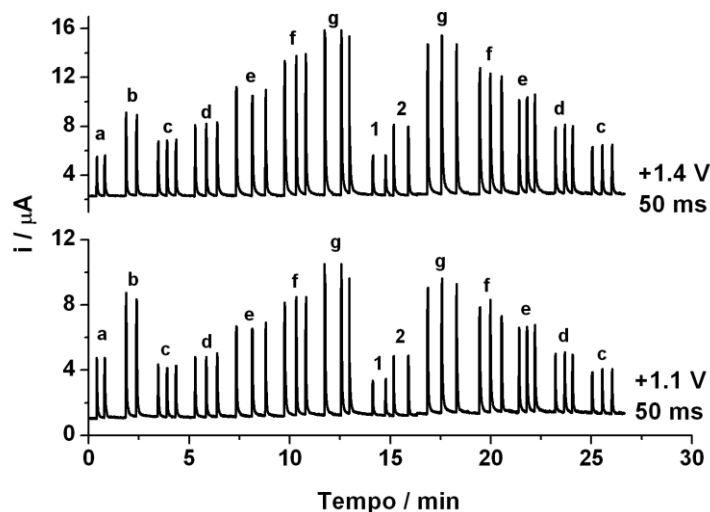


Figura 51. Amperogramas obtidos para injeções de duas soluções contendo somente DCF ($a = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$; $b = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$), cinco soluções (c-g) contendo simultaneamente DCF ($10 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$) + CO ($7,1 - 35,7 \mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras adequadamente diluídas (1 e 2). Para outras condições experimentais ver Figura 47.

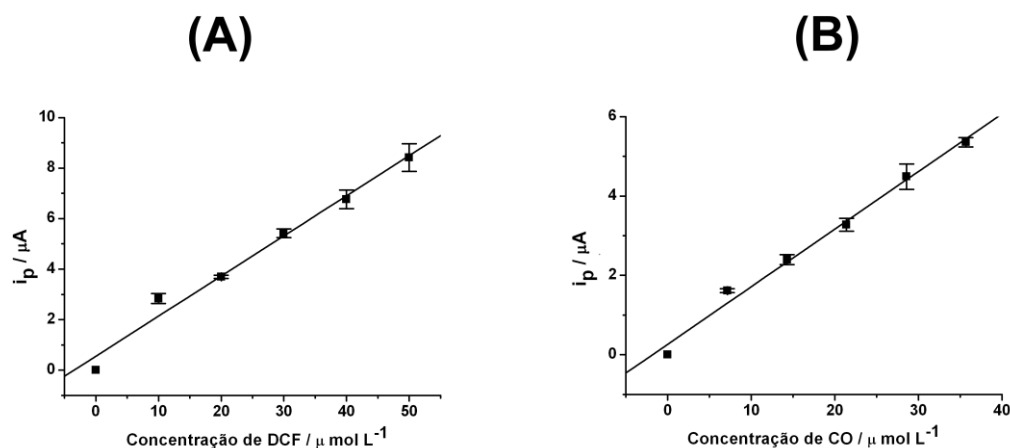


Figura 52. Curvas de calibração obtidas para DCF (A) e CO (B) a partir dos dados analíticos da Figura 51.

Conforme apresentado na Figura 52, as curvas de calibração obtidas a partir das correntes de oxidação de DCF (Figura 52A) e CO (Figura 52B) apresentaram boa linearidade ($R_{DCF} = 0,991$; $R_{CO} = 0,995$). Foram obtidas as seguintes equações de reta.

$$CO: i (\mu A) = 0.263 + 0.145c (\mu mol L^{-1})$$

$$DCF: i (\mu A) = 0.550 + 0.159c (\mu mol L^{-1})$$

O LD e LQ foram calculados, respectivamente, em 1,1 e 3,7 $\mu mol L^{-1}$ para DCF e em 1,0 e 3,3 $\mu mol L^{-1}$ para CO. Além disso, também pode ser observado que as soluções padrões injetadas em ordem crescente ou decrescente apresentaram respostas semelhantes, o que confirma que o fenômeno da contaminação do eletrodo ou efeito de memória está ausente, mesmo usando um eletrodo de trabalho sem modificação.

O método BIA proposto foi usado para determinar CO e DCF em duas amostras de produtos farmacêuticos. Para comparação, as amostras farmacêuticas também foram analisadas por HPLC, no entanto, a CO e o DCF foram determinados em procedimentos cromatográficos diferentes, pois usando uma coluna C18, a determinação simultânea

por HPLC não é possível. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos para a análise destas amostras com os respectivos desvios padrão ($n = 3$).

Tabela 8. Comparação dos resultados (média \pm DPR; $n = 3$) obtidos para a determinação de DCF e CO em amostras farmacêuticas usando a metodologia proposta *versus* HPLC.

Amostras	Compostos	Valor rotulado (mg/tablete)	Valor encontrado (mg/tablete)		Teste- t^a	Teste- F^b
			BIA	HPLC		
A	DCF	50	$49,7 \pm 2,0$	$49,8 \pm 1,0$	0,08	4,0
	CO	50	$51,9 \pm 2,4$	$50,4 \pm 2,0$	0,83	1,4
B	DCF	50	$45,9 \pm 1,0$	$47,2 \pm 1,0$	2,02	1,0
	CO	50	$49,6 \pm 1,7$	$46,2 \pm 2,0$	2,15	1,2

^a $t_{\text{tabelado}} = 4,30$; ^c $F_{\text{tabelado}} = 19,0$

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, não há diferenças significativas entre o método proposto (BIA-MPA) e o método de referência (HPLC), o que comprova a exatidão do método proposto. No nível de confiança de 95%, os valores do teste t calculados foram menores do que o valor crítico teórico (4,30, $n = 3$), o que indica que não houve diferenças significativas entre os resultados. De acordo com o teste estatístico F , não foi observada diferença significativa nos desvios padrões entre os resultados dos dois métodos a um nível de confiança de 95% (em todos os casos, F calculado < crítico $F = 19,0$).

A precisão e a exatidão do método BIA-MPA proposto também foi avaliada por testes de adição e recuperação utilizando amostras contendo DCF e CO. A recuperação média foi de $98 \pm 4\%$ ($n = 3$) e de $112 \pm 3\%$ ($n = 3$) para o DCF e CO, respectivamente. Com base nestes resultados, o método proposto não possui efeitos significativos de matriz para a determinação simultânea de CO e DCF em formulações farmacêuticas.

3.3.2.7. Aplicação do método do padrão interno na determinação simultânea de DCF e CO

A possibilidade de análise de DCF e CO utilizando uma seringa descartável no procedimento de injeção em sistemas BIA-MPA também foi proposta. As imprecisões na resposta amperométrica devido a flutuações na velocidade e volume de injeção podem ser anuladas usando método do padrão interno, tanto para o DCF (i_{DCF+PI}/i_{PI}), quanto para a CO ($i_{DCF+CO+PI}/i_{PI}$).

As condições utilizadas anteriormente (eletrólito, eletrodo de trabalho, faixa linear de resposta, FC) foram mantidas nesta nova proposta. Porém, a seleção de novos pulsos de potenciais foi necessária. No estudo inicial, com auxílio de uma pipeta motorizada, foram injetados no sistema BIA quatro soluções contendo $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (PI), $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF, $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CO e mistura de $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} 30 \mu\text{mol L}^{-1} + \text{DCF } 40 \mu\text{mol L}^{-1} + \text{CO } 40 \mu\text{mol L}^{-1})$. Os amperogramas para este estudo estão representados na Figura 53.

Na Figura 53B podemos observar o seguinte:

- (i) $+0,7 \text{ V}/50 \text{ ms}$: apenas o $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ é oxidado e a magnitude deste sinal é o mesmo na presença ou ausência de DCF + CO, indicando que não há interação química entre estes compostos ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, DCF e CO);
- (ii) $+1,1 \text{ V}/50 \text{ ms}$: somente o DCF e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ são oxidados;
- (iii) $+1,4 \text{ V}/50 \text{ ms}$: os três compostos em estudo apresentam eletroatividade (oxidação).

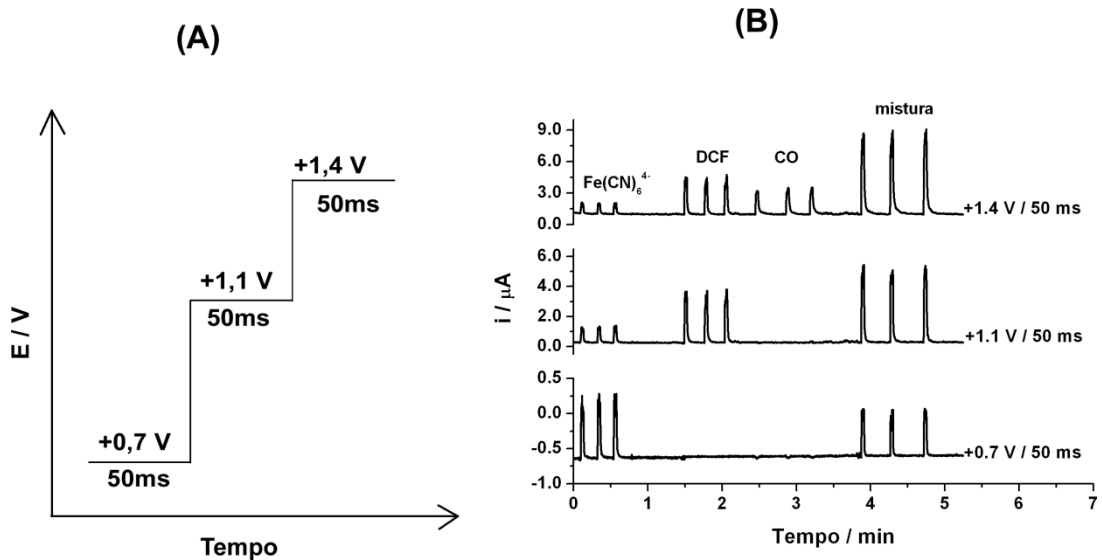


Figura 53. (A) Escada de potencial aplicado ao eletrodo de BDD em função do tempo. (B) Amperogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (PI), $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF, $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CO e mistura ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} + \text{DCF} + \text{CO}$, $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente). Para outras condições experimentais ver Figura 47.

Neste estudo propõe-se que o DCF pode ser quantificado com precisão no pulso de potencial +1,1V através da normalização dos resultados ($i_{\text{DCF+PI em } +1,1\text{V}} / i_{\text{PI em } +0,7\text{V}}$). Os acessos às correntes provenientes da oxidação da CO podem ser obtidas através do rearranjo das equações 1 e 2 descritas anteriormente neste trabalho (seção 3.3.2.2).

$$i_{\text{CO}} = i_{+1,40\text{ V}} / i_{\text{PI } +0,7\text{ V}} - (FC \times (i_{1,1\text{ V}} / i_{\text{PI } +0,7\text{ V}})) \quad (1')$$

$$FC = (i_{\text{DCF} + \text{PI em } 1,4\text{ V}} / i_{\text{DCF} + \text{PI em } 1,1\text{ V}}) \quad (2')$$

Neste estudo, o FC foi calculado usando a equação 2' mediante injeção no sistema BIA-MPA da seguinte solução: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (PI) + DCF ($30 + 30 \mu\text{mol L}^{-1}$). A curva de calibração foi obtida com a injeção no sistema BIA-MPA de soluções contendo concentrações crescentes de DCF + CO (10 a 50 e 7,14 a 35,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$,

respectivamente) e constantes de (PI) ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$). A Figura 54 apresenta os amperogramas obtidos neste estudo e as respectivas curvas de calibração.

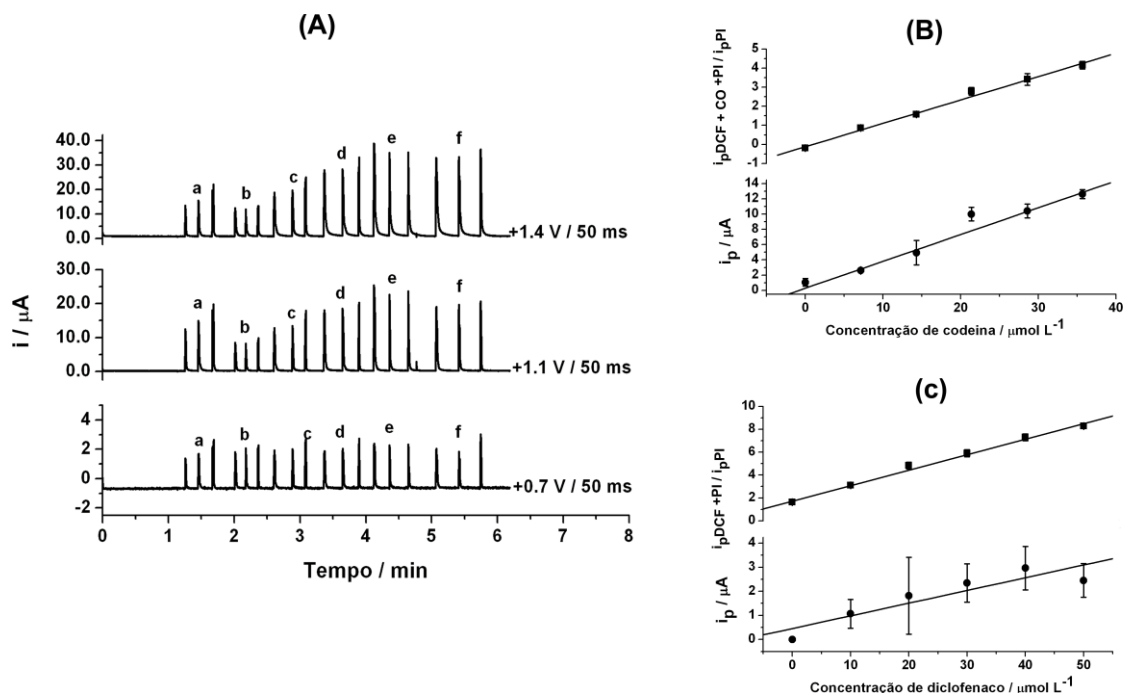


Figura 54. (A) Amperogramas obtidos através da injeção de solução contendo (a) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (PI) + DCF ($30 + 30 \mu\text{mol L}^{-1}$) e soluções contendo concentrações crescentes de DCF + CO e constantes de PI ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$): (b) 10+ 7,14, (c) 20 + 14,3, (d) 30 + 21,4, (e) 40 + 28,6 e (f) 50 + 35,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF + CO, respectivamente. (B) Curvas de calibração para o DCF e CO com (■) e sem (●) normalização (razão $i_{\text{AM} + \text{PI}} / i_{\text{PI}}$). Para outras condições experimentais ver Figura 47.

Como pode ser visualizado na Figura 54, a curva de calibração para o DCF e CO, sem normalização dos resultados usando o PI, apresentam baixos coeficientes de correlação ($R = 0,913$ e $0,987$, respectivamente), além de altos desvios padrões relativos médios (média dos desvios referente aos cinco pontos de concentração da curva analítica) entre as replicatas (37,5% e 12,5 % para DCF e CO, respectivamente; $n = 5$). Isto ocorreu por não haver reprodutibilidade no procedimento de injeção usando a

seringa descartável. Com a normalização dos resultados ($i_{DCF + PI}/i_{PI}$ ou $i_{CO+DC+PI}/i_{PI}$), uma melhora significativa nos coeficientes de correlação é alcançada ($R = 0,999$ e $0,996$ para DCF e CO, respectivamente), além de desvios padrões relativos médios menores entre as replicatas de cada solução padrão injetada (4,1% e 6,3% para DCF e CO, respectivamente; $n = 5$). Estes resultados indicam novamente que o método do padrão interno pode ser utilizado para manter a precisão dos resultados em sistemas BIA-MPA quando seringas descartáveis são usadas no procedimento de injeção.

3.3.2.8. Conclusões parciais – determinação simultânea de DCF e CO

Uma estratégia simples para determinação simultâneas de CO e DCF foi demonstrada pela primeira vez com o uso da análise por injeção em batelada e detecção amperométrica de múltiplos pulsos (BIA-MPA). A única etapa de preparo da amostra consiste na dissolução e posterior diluição na solução de eletrólito suporte. O método é rápido, (300 injeções h^{-1}), preciso (RSD 1,1% e 0,9% para DCF e CO, respectivamente, $n = 10$) e apresenta baixos limites de detecção (1,1 e 1,0 $\mu mol L^{-1}$ para DCF e CO, respectivamente). O desempenho analítico do sistema BIA foi avaliado pela determinação de DCF e CO em amostras farmacêuticas, com obtenção dos resultados similares aos obtidos por HPLC. Cabe salientar que por HPLC não é possível a análise em um único cromatograma de DCF e CO. Também foi demonstrado que o DCF e a CO podem ser determinados por BIA-MPA utilizando no processo de injeção uma seringa descartável cujas flutuações no volume e velocidade de injeção são anuladas empregando o método do padrão interno.

Conclusões e Perspectivas

A presente tese demonstrou a potencialidade da detecção por amperometria de múltiplos pulsos acoplada às técnicas FIA e BIA no desenvolvimento de novos métodos de análise. Pela primeira vez foi demonstrada a possibilidade de uso do método do padrão interno em sistemas FIA e BIA com detecção amperométrica. Além disto, novos métodos para determinação de DCF e determinação simultânea de DCF e CO foram propostos.

O método proposto baseado no uso do padrão interno em FIA com detecção MPA demonstrou que tanto o analito quanto o PI são afetados de forma similar por oscilações em parâmetros físicos do sistema e pela falta de estabilidade na corrente detectada devido à gradativa contaminação da superfície do eletrodo. Uma melhora considerável na precisão dos resultados pode ser obtida mediante normalização dos resultados através do uso do PI. Imprecisões geradas por oscilações em diversos parâmetros, como velocidade de injeção, volume injetado e força iônica, assim como na inserção acidental de bolhas de ar no sistema ou presença de passivação ou contaminação gradual da superfície do eletrodo de trabalho podem ser anuladas.

A potencialidade do método do padrão interno também foi demonstrada em sistemas BIA-MPA para melhorar a precisão no procedimento de injeção na ausência de pipetas motorizadas. A eficiência do método do PI foi demonstrada utilizando uma seringa descartável (extensível a pipetas manuais) no procedimento de injeção sem a perda considerável em termos de precisão devido aos erros aleatórios existentes (incontroláveis manualmente) na velocidade de injeção e no volume injetado. A abordagem aqui proposta torna o sistema BIA com detecção amperométrica mais robusto e aumenta consideravelmente seu potencial para aplicações em campo (“*on-site analysis*”) ou laboratórios com infraestrutura limitada.

Os métodos propostos para determinação de DCF por FIA e simultânea de DCF e CO por BIA (ambos com detecção amperométrica) são simples, rápidos, apresentam baixo custo e necessitam de etapas simples de preparação da amostra (somente dissolução e diluição). Os métodos apresentaram boa sensibilidade, seletividade e estabilidade para quantificação destes compostos em formulações farmacêuticas usando um eletrodo de trabalho (BDD) sem qualquer modificação química ou eletroquímica, o que torna o método mais atraente para aplicações em análises de rotina. Os métodos propostos não apresentam seletividade adequada para determinação destes compostos em amostras como sangue, urina ou águas naturais (rios e lagos).

Os novos procedimentos propostos neste trabalho (uso do método do PI em sistemas BIA e FIA e determinações simultâneas em BIA com detecção amperométrica) aumentam consideravelmente o campo de aplicação destes sistemas. Diversos métodos envolvendo determinações simultâneas de outros compostos estão em andamento no Núcleo de Pesquisa em Eletroanalítica (NUPE) do IQUFU. A possibilidade de obtenção de resultados precisos na determinação de compostos eletroativos com eletrodos sólidos na presença de fenômenos de contaminação e/ou passivação gradual da superfície também pode ser considerado um avanço proposto neste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Ruzicka, J. Hansen, E.H., *Flow injection analyses .I. new concept of fast continuous-flow analysis*. Analytica Chimica Acta, 1975, **78**(1): p. 145-157.
2. Wang, J. Taha, Z., *Batch injection-analysis*. Analytical Chemistry, 1991, **63**(10): p. 1053-1056.
3. Lira, L.F.B., dos Santos, D., Guida, M.A.B., Stragevitch, L., Korn, M.D.A., Pimentel, M.F., Paim, A.P.S., *Determination of phosphorus in biodiesel using FIA with spectrophotometric detection*. Fuel, 2011, **90**(11): p. 3254-3258.
4. El-Nemma, E.M., Badawi, N.M., Hassan, S.S.M., *Cobalt phthalocyanine as a novel molecular recognition reagent for batch and flow injection potentiometric and spectrophotometric determination of anionic surfactants*. Talanta, 2009, **78**(3): p. 723-729.
5. Hassan, R.O. , Faizullah, A.T., *Reverse-FIA with Spectrophotometric Detection Method for Determination of Vitamin C*. Journal of the Iranian Chemical Society, 2011, **8**(3): p. 662-673.
6. Mbaye, M., Seye, M.D.G., Aaron, J.J., Coly, A., , Tine, A., *Application of flow injection analysis-photo-induced fluorescence (FIA-PIF) for the determination of alpha-cypermethrin pesticide residues in natural waters*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, **400**(2): p. 403-410.
7. Zhang, J.D., Prestel, H., Gahr, A., , Niessner, R., *Development of a FIA system for the measurement of heavy metals using a fibre optic chemical sensor based on laser-induced fluorescence*, in *International Conference on Sensors and Control Techniques*. 2000, p. 32-39.
8. Wang, J., Rayson, G.D., Taha, Z., *Batch injection-analysis using fiberoptic fluorometric detection*. Applied Spectroscopy, 1992, **46**(1): p. 107-110.
9. Amini, M.K., Pourhossein, M., Talebi, M., *A chemiluminescence flow injection system for nitrite ion determination*. Journal of the Iranian Chemical Society, 2005, **2**(4): p. 305-314.
10. Asgher, M., Yaqoob, M., Waseem, A., ,Nabi, A., *Flow injection methods for the determination of retinol and alpha-tocopherol using lucigenin-enhanced chemiluminescence*. Luminescence, 2011, **26**(6): p. 416-423.
11. Chen, D.H., Wang, Z.M., Zhang, Y., Xiong, X.Y., Song, Z.H., *Study on the interaction behavior of catalase with cephalosporins by chemiluminescence with flow injection analysis*. Analytical Methods, 2012, **4**(6): p. 1485-1487.
12. Bralic, M., Buljac, M., Buzuk, M., , Brinic, S., *Interference Effect of Various Ions on Determination of Iron with Flow Injection Analysis Using the Potentiometric Technique*. International Journal of Electrochemical Science, 2012, **7**(4): p. 2928-2937.
13. Youssef, A.F.A., Issa, Y.M., Mohamed, M.S., *Carbon paste electrode modified with chromium thiopental for the potentiometric flow injection analysis of*

- chromium (III)*. Toxicological and Environmental Chemistry, 2012, **94**(2): p. 220-238.
14. Wang, J. Taha, Z., *Batch injection with potentiometric detection*. Analytica Chimica Acta, 1991, **252**(1-2): p. 215-221.
 15. Ivaska, A. Ryan, T.H., *Application of a voltametric flow-through cell to flow-injection-analysis (FIA)*. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 1981, **46**(11): p. 2865-2970.
 16. Adraoui, I., Rhazi, M.E., Amine, A., *Fibrinogen-coated bismuth film electrodes for voltammetric analysis of lead and cadmium using the batch injection analysis*. Analytical Letters, 2007, **40**(2): p. 349-367.
 17. Metelka, R. Jirkovska, D., *Amperometric Ethanol Detection Using FIA and Screen-Printed Carbon Electrodes Modified with Metal Oxides*, in *Modern Electrochemical Methods Xxi*. 2011, p. 82-85.
 18. Dejmekova, H., Vokalova, V., Zima, J., Barek, J., *Determination of Benzocaine Using HPLC and FIA with Amperometric Detection on a Carbon Paste Electrode*. Electroanalysis, 2011, **23**(3): p. 662-666.
 19. Silva, R.A.B., Montes, R.H.O., Richter, E.M., Munoz, R.A.A., *Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection*. Food Chemistry, 2012, **133**(1): p. 200-204.
 20. Pereira, P.F., Marra, M.C., Munoz, R.A.A., Richter, E.M., *Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol*. Talanta, 2012, **90**: p. 99-102.
 21. Brett, C.M.A. Brett, A.M.O., *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. 1^a ed. 1993, Oxford, New York.
 22. dos Santos, W.T.P., Azevedo, E.F., Richter, E.M., de Albuquerque, Y.D.T., *Construction and characterization of an electrochemical detector for flow analysis*. Química Nova, 2009, **32**(9): p. 2412-2416.
 23. 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): p. 1753-1761.
 24. Chailapakul, O., Ngamukot, P., Yoosamran, A., Siangproh, W., Wangfuengkanagul, N., *Recent electrochemical and optical sensors in flow-based analysis*. Sensors, 2006, **6**(10): p. 1383-1410.
 25. de Carvalho, R.M., Freire, R.S., Rath, S., Kubota, L.T., *Effects of EDTA on signal stability during electrochemical detection of acetaminophen*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, **34**(5): p. 871-878.

26. Goyal, R.N., Chatterjee, S., Agrawal, B., *Electrochemical investigations of diclofenac at edge plane pyrolytic graphite electrode and its determination in human urine*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2010, **145**(2): p. 743-748.
27. Zhang, R., Jin, G.D., Chen, D., Hu, X.Y., *Simultaneous electrochemical determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid using poly(acid chrome blue K) modified glassy carbon electrode*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2009, **138**(1): p. 174-181.
28. Barbosa, T.G.G., Richter, E.M., Munoz, R.A.A., *Flow-Injection Pulsed-Amperometric Determination of Free Glycerol in Biodiesel at a Gold Electrode*. Electroanalysis, 2012, **24**(5): p. 1160-1163.
29. 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): p. 74-78.
30. dos Santos, W.T.P., Gimenes, D.T., de Almeida, E.G.N., Eiras, S.D., 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): p. 1249-1255.
31. 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): p. 1878-1883.
32. Possari, R., Carvalhal, R.F., Mendes, R.K., Kubota, L.T., *Electrochemical detection of cysteine in a flow system based on reductive desorption of thiols from gold*. Analytica Chimica Acta, 2006, **575**(2): p. 172-179.
33. da Silva, R.A.B., Gimenes, D.T., Tormin, T.F., Munoz, R.A.A., Richter, E.M., *Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode*. Analytical Methods, 2011, **3**(12): p. 2804-2808.
34. Silva, W.C., Pereira, P.F., Marra, M.C., Gimenes, D.T., Cunha, R.R., da Silva, R.A.B., Munoz, R.A.A., and 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**(12): p. 2764-2770.
35. Tormin, T.F., Cunha, R.R., Richter, E.M., Munoz, R.A.A., *Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection*. Talanta, 2012, **99**: p. 527-531.
36. 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): p. 8658-8663.

37. 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): p. 4021-4026.
38. Barros, R.d.C.M.d., Ribeiro, M.C., An-Sumodjo, P.T., Julião, M.S.d.S., Serrano, S.H.P., Ferreira, N.G., *Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I . Histórico, produção e caracterização*. *Química Nova*, 2005, **28**: p. 317-325.
39. Deryagin, B.V., Fedoseev, D.V., Lukyanov.Vm, Spitsyn, B.V., Ryabov, V.A., Lavrente.Av, *On threadlike diamond crystals*. *Doklady Akademii Nauk Sssr*, 1968, **181**(5): p. 1094-&.
40. Angus, J.C., Will, H.A., Stanko, W.S., *Growth of diamond seed crystals by vapor deposition*. *Journal of Applied Physics*, 1968, **39**(6): p. 2915-&.
41. Pleskov, Y.V., *Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis*. *Journal of Analytical Chemistry*, 2000, **55**(11): p. 1045-1050.
42. Pleskov, Y.V., *Electrochemistry of diamond: A review*. *Russian Journal of Electrochemistry*, 2002, **38**(12): p. 1275-1291.
43. Kraft, A., *Doped diamond: A compact review on a new, versatile electrode material*. *International Journal of Electrochemical Science*, 2007, **2**(5): p. 355-385.
44. Salazar-Banda, G.R., Andrade, L.S., Nascente, P.A.P., Pizani, P.S., Rocha, R.C., Avaca, L.A., *On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments*. *Electrochimica Acta*, 2006, **51**(22): p. 4612-4619.
45. Medeiros, R.A., *Desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de antioxidantes e corantes em produtos alimentícios empregando um eletrodo de diamante dopado com boro. Tese de Doutorado*, Departamento de Química. 2011, UFSCar - São Paulo.
46. Chang, C.C., Chen, L.C., Liu, S.J., Chang, H.C., *Investigation of electro-oxidation of methanol and benzyl alcohol at boron-doped diamond electrode: Evidence for the mechanism for fouling film formation*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, **110**(39): p. 19426-19432.
47. Notsu, H., Yagi, I., Tatsuma, T., Tryk, D.A., Fujishima, A., *Surface carbonyl groups on oxidized diamond electrodes*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2000, **492**(1): p. 31-37.
48. Wangfuengkanagul, N. Chailapakul, O., *Electrochemical analysis of D-penicillamine using a boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system*. *Talanta*, 2002, **58**(6): p. 1213-1219.
49. Terashima, C., Rao, T.N., Sarada, B.V., Kubota, Y., Fujishima, A., *Direct electrochemical oxidation of disulfides at anodically pretreated boron-doped diamond electrodes*. *Analytical Chemistry*, 2003, **75**(7): p. 1564-1572.

50. Wangfuengkanagul, N., Siangproh, W., Chailapakul, O., *A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode*. Talanta, 2004, **64**(5): p. 1183-1188.
51. Sartori, E.R., Medeiros, R.A., Rocha, R.C., Fatibello, O., *Square-Wave Voltammetric Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Formulations using a Boron-Doped Diamond Electrode without the Need of Previous Alkaline Hydrolysis Step*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2009, **20**(2): p. 360-366.
52. Panizza, M. Cerisola, G., *Application of diamond electrodes to electrochemical processes*. Electrochimica Acta, 2005, **51**(2): p. 191-199.
53. Medeiros, R.A., Carvalho, A.E., Filho, R.C.R., Fatibello-Filho, O., *Determinação voltamétrica de ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando um eletrodo de diamante dopado com boro*. Química Nova, 2008, **31**: p. 5.
54. Salazar-Banda, G.R., de Carvalho, A.E., Andrade, L.S., Rocha, R.C., Avaca, L.A., *On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments*. Journal of Applied Electrochemistry, 2010, **40**(10): p. 1817-1827.
55. Yagi, I., Notsu, H., Kondo, T., Tryk, D.A., Fujishima, A., *Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1999, **473**(1-2): p. 173-178.
56. Carvalho, A.E., *Caracterização Eletroquímica de Eletrodos de Diamante Dopado com Boro em Função do seu Pré-Tratamento, Tese de Doutorado, Departamento de química*. 2007, UFSCar: São Carlos.
57. Silva, R.A.B., *Caracterizações e aplicações analíticas de eletrodos compósitos modificados com Azul da Prússia e determinações simultâneas em sistemas de análise por injeção em batelada empregando somente um eletrodo de trabalho. Tese de Doutorado, Instituto de Química*. 2012, Universidade Federal de Uberlândia.
58. dos Reis, B.F., *Chemical analysis by flow injection: Twenty years of development*. Química Nova, 1996, **19**(1): p. 51-58.
59. Matos, R.C., Gutz, I.G.R., Angnes, L., Fontenele, R.S., and Pedrotti, J.J., *A versatile and pulsation free pneumatic impeller for flow analysis systems*. Química Nova, 2001, **24**(6): p. 795-798.
60. dos Santos, W.T.P., Ceolin, M.P., de Albuquerque, Y.D.T., Richter, E.M., *Uso da pressão gerada por uma coluna de água para controle da vazão em sistemas de análises em fluxo*. Química Nova, 2007, **30**: p. 1754-1758.
61. Watanabe, Y.N., *Cinética e dinâmica molecular do processo de dispersão bidimensional em sistemas de injeção em fluxo (FI): construção e validação de*

um aparato experimental, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química. 2002, Universidade Federal da Bahia: Bahia.

62. dos Santos, W.T.P., Azevedo, E.F., Richter, E.M., de Albuquerque, Y.D.T., *Construction and characterization of an electrochemical detector for flow analysis*. Química Nova, 2009, **32**(9): p. 2412-2416.
63. Surareungchai, W., Deepunya, W., Tasakorn, P., *Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose*. Analytica Chimica Acta, 2001, **448**(1-2): p. 215-220.
64. Miranda, J.A.T., Cunha, R.R., Gimenes, D.T., Munoz, R.A.A., and Richter, E.M., *Simultaneous determination of ascorbic acid and acetyl salicylic acid using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection*. Química Nova, 2012. **35**(7): p. 1459-1463.
65. Medeiros, R.A., Lourencao, B.C., Rocha, R.C., Fatibello, O., *Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode*. Talanta, 2012, **99**: p. 883-889.
66. Wang, J. Taha, Z., *Batch injection analysis*. Analytical Chemistry, 1991, **63**(10): p. 1053-1056.
67. Wang, J. Taha, Z., *Batch injection analysis with thermistor sensing devices*. Analytical Letters, 1991, **24**(8): p. 1389-1400.
68. Chen, L.A., Wang, J., Angnes, L., *Batch injection analysis with the rotating disk electrode*. Electroanalysis, 1991, **3**(8): p. 773-776.
69. Wang, J., Rayson, G.D., Taha, Z., *Batch injection analysis using fiberoptic fluorometric detection*. Applied Spectroscopy, 1992, **46**(1): p. 107-110.
70. Wang, J., Chen, L., Angnes, L., Tian, B.M., *Computerized pipettes with programmable dispensation for batch injection analysis*. Analytica Chimica Acta, 1992, **267**(1): p. 171-177.
71. Quintino, M.D.M., *Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas, Tese de Doutorado, Instituto de Química. 2003, Universidade de São Paulo: São Paulo.*
72. Wang, J., *Injection analysis from flow-injection analysis to batch-injection analysis*. Microchemical Journal, 1992, **45**(2): p. 219-224.
73. Quintino, M.S.M., Angnes, L., *Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool*. Electroanalysis, 2004, **16**(7): p. 513-523.
74. 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): p. 26-33.

75. Ruzicka, J., Hansen, E.H., *Flow injection analyses I. New concept of fast continuous-flow analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 1975, **78**(1): p. 145-157.
76. Wang, J., Chen, L., *Small-volume batch-injection analyzer*. *Analyst*, 1994, **119**(6): p. 1345-1348.
77. da Silva, R.A.B., Cunha, R.R., da Silva, A.T.C., de Oliveira, A.L.B., Espindola, F.S., Munoz, R.A.A., Richter, E.M., *Development of a Simple and Fast Electrochemical Method to Evaluate Physical Stress in Athletes*. *Electroanalysis*, 2011, **23**(11): p. 2601-2606.
78. Karuwan, C., Mantim, T., Chaisuwan, P., Wilairat, P., Grudpan, K., Jittangprasert, P., Einaga, Y., Chailapakul, O., Suntornsuk, L., Anurukvorakun, O., Nacapricha, D., *Pulsed amperometry for anti-fouling of boron-doped diamond in electroanalysis of beta-agonists: Application to flow injection for pharmaceutical analysis*. *Sensors*, 2006, **6**(12): p. 1837-1850.
79. Johll, M.E., Williams, D.G., Johnson, D.C., *Activated pulsed amperometric detection of cysteine at platinum electrodes in acidic media*. *Electroanalysis*, 1997, **9**(18): p. 1397-1402.
80. Schiavon, G., Comisso, N., Toniolo, R., Bontempelli, G., *Pulsed amperometric detection of ethanol in breath by gold electrodes supported on ion exchange membranes (solid polymer electrolytes)*. *Electroanalysis*, 1996, **8**(6): p. 544-548.
81. Brett, A.M.O., Matysik, F.M., Vieira, M.T., *Thin-film gold electrodes produced by magnetron sputtering. Voltammetric characteristics and application in batch injection analysis with amperometric detection*. *Electroanalysis*, 1997, **9**(3): p. 209-212.
82. 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): p. 1274-1278.
83. Silva, R.A.B., Montes, R.H.O., Richter, E.M., Munoz, R.A.A., *Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection*. *Food Chemistry*, 2012, **133**(1): p. 200-204.
84. Pacheco, B.D., Valerio, J., Angnes, L., Pedrotti, J.J., *Fast batch injection analysis of H₂O₂ using an array of Pt-modified gold microelectrodes obtained from split electronic chips*. *Analytica Chimica Acta*, 2011, **696**(1-2): p. 53-58.
85. Thompson, M., *Uncertainty in an uncertain world*. *Analyst*, 1995, **120**(9): p. N117-N118.
86. Horwitz, W., *Uncertainty - A chemist's view*. *Journal of Aoac International*, 1998, **81**(4): p. 785-794.
87. Byrialsen, K., Kristiansen, J., Christensen, J.M., *Trends in quality assurance of metal determination in clinical chemistry*. *Analyst*, 1998, **123**(1): p. 7-12.

88. Thompson, M., *Towards a unified model of errors in analytical measurement*. Analyst, 2000, **125**(11): p. 2020-2025.
89. Valcarcel, M., Rios, A., *The Hierarchy and Relationships of Analytical Properties*. Analytical Chemistry, 1993, **65**(18): p. A781-A787.
90. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., *Fundamentos de Química Analítica - Tradução da 8ª edição norte-americana*, ed. C. Learning. 2010, São Paulo.
91. Correia, P.R.M. *Estudo da utilização de padrão interno em determinações multielementares por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e detecção simultânea - Tese de Doutorado*. Instituto de Química. 2004, Universidade de São Paulo- São Paulo
92. Fernandes, K.G., Moraes, M.d., Gomes Neto, J.A., Nóbrega, J.A., Oliveira, P.V., *Padronização interna em espectrometria de absorção atômica*. Química Nova, 2003, **26**: p. 249-252.
93. Monticelli, E., Aman, C.S., Costa, M.L., Rota, P., Bogdan, D., Allevi, P., Cighetti, G., *Simultaneous free and glycosylated pyridinium crosslink determination in urine: Validation of an HPLC-fluorescence method using a deoxypyridinoline homologue as internal standard*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2011, **879**(26): p. 2764-2771.
94. Czauderna, M., Kowalczyk, J., Marounek, M., Michalski, J.P., Rozbicka-Wieczorek, A.J., Krajewska, K.A., *A new internal standard for HPLC assay of conjugated linoleic acid in animal tissues and milk*. Czech Journal of Animal Science, 2011, **56**(1): p. 23-29.
95. Wan, C.W., Lee, Y.K., Kwok, C.Y., Chan, R.Y.K., Yu, P.H.F., Chan, S.W., *A validated HPLC method with dual wavelength detection for chlorogenic acid with an internal standard in plasma and its application in pharmacokinetic studies in rats* Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2010, **33**(3): p. 324-335.
96. Balsevich, J.J., Bishop, G.G., Deibert, L.K., *Use of Digitoxin and Digoxin as Internal Standards in HPLC Analysis of Triterpene Saponin-Containing Extracts*. Phytochemical Analysis, 2009, **20**(1): p. 38-49.
97. Blackwell, S., O'Reilly, D.S.J., Talwar, D.K., *HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related arginine metabolites in human plasma using a novel non-endogenous internal standard*. Clinica Chimica Acta, 2009, **401**(1-2): p. 14-19.
98. Marques, M.V., Naciuk, F.F., Mello, A.M.D., Seibel, N.M., Fontoura, L.A.M., *Fatty ester content determination in soybean methyl biodiesel by gas chromatography using ethyl oleate as internal standard*. Química Nova, 2010, **33**(4): p. 978-980.

99. Carrillo, J.D., Martinez, M.P., Tena, M.T., *Determination of phthalates in wine by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry use of deuterated phthalates as internal standards*. Journal of Chromatography A, 2008, **1181**(1-2): p. 125-130.
100. Mas, E., Michel, F., Guy, A., Bultel, V., Falquet, Y., Chardon, P., Rossi, J.C., Cristol, J.P., Durand, T., *Quantification of urinary F-2-isoprostanes with 4(RS)-F-4t-neuroprostane as an internal standard using gas chromatography-mass spectrometry - Application to polytraumatized patients*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2008, **872**(1-2): p. 133-140.
101. Ru, Q.H., Luo, G.A., *Internal standard quantitative method of tetrodotoxin by capillary electrophoresis*. Analytical Letters, 2000, **33**(14): p. 3013-3023.
102. Altria, K.D., *Improved performance in capillary electrophoresis using internal standards*. Lc Gc Europe, 2002, **15**(9): p. 588-594.
103. Paroni, R., Fermo, I., Cighetti, G., *Validation of methyl malondialdehyde as internal standard for malondialdehyde detection by capillary electrophoresis (vol 307, pg 92, 2002)*. Analytical Biochemistry, 2002, **311**(1): p. 101-101.
104. Paroni, R., Fermo, I., Cighetti, G., *Validation of methyl malondialdehyde as internal standard for malondialdehyde detection by capillary electrophoresis*. Analytical Biochemistry, 2002, **307**(1): p. 92-98.
105. Wise, D.D., Barkhimer, T.V., Brault, P.A., Kirchhoff, J.R., Messer, W.S., Hudson, R.A., *Internal standard method for the measurement of choline and acetylcholine by capillary electrophoresis with electrochemical detection*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2002, **775**(1): p. 49-56.
106. Jamali, B., Nielsen, H.M., *Development and validation of a capillary electrophoresis-indirect photometric detection method for the determination of the non-UV-absorbing 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol in active pharmaceutical ingredients, solutions and tablets using an internal standard*. Journal of Chromatography A, 2003, **996**(1-2): p. 213-223.
107. Ohnesorge, J., de Griend, C.S.V., Watzig, H., *Quantification in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Long- and short-term variance components and their compensation using internal standards*. Electrophoresis, 2005, **26**(12): p. 2360-2375.
108. Riaz, A., Chung, D.S., *Calibration of migration times of variable salinity samples with internal standards in capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2006, **27**(3): p. 553-562.
109. Liu, Y.M., Yue, H.Y., Tian, W., Chen, Y.H., Li, F.R., *Quantification of Carcinoembryonic Antigen by Capillary Electrophoresis-Chemiluminescence Detection using Internal Standard Method*. Analytical Letters, 2009, **42**(1): p. 45-57.

110. Pratt, K.W. and Koch, W.F., *High-accuracy differential-pulse anodic-stripping voltammetry with indium as an internal standard*. Analytica Chimica Acta, 1988, **215**(1-2): p. 21-28.
111. Liu, T.Z., Lai, D., Osterloh, J.D., *Indium as internal standard in square wave anodic stripping analysis of lead in blood with microelectrode arrays*. Analytical Chemistry, 1997, **69**(17): p. 3539-3543.
112. Yang, C.C., Kumar, A.S., Zen, J.M., *Precise blood lead analysis using a combined internal standard and standard addition approach with disposable screen-printed electrodes*. Analytical Biochemistry, 2005, **338**(2): p. 278-283.
113. Wang, J., Anik, U., Lu, J.M., *Stripping voltammetry with the electrode material acting as a 'built-in' internal standard*. Electrochemistry Communications, 2001, **3**(12): p. 703-706.
114. Brown, R.J.C., Roberts, M.R., Brett, D.J.L., *Stripping voltammetry using sequential standard addition calibration with the analytes themselves acting as internal standards*. Analytica Chimica Acta, 2009, **635**(1): p. 1-5.
115. Yu, J.J., Huang, W., Hibbert, D.B., *The determination of ethanol in wine by voltammetry with an internal standard*. Electroanalysis, 1997, **9**(7): p. 544-548.
116. Kormosh, Z.A., Hunka, I.P., Bazel, Y.R., *A potentiometric sensor for the determination of diclofenac*. Journal of Analytical Chemistry, 2009, **64**(8): p. 853-858.
117. Yilmaz, B., *GC-MS Determination of Diclofenac in Human Plasma*. Chromatographia, 2010, **71**(5-6): p. 549-551.
118. Daneshgar, P., Norouzi, P., Ganjali, M.R., Dinarvand, R., Moosavi-Movahedi, A.A., *Determination of Diclofenac on a Dysprosium Nanowire-Modified Carbon Paste Electrode Accomplished in a Flow Injection System by Advanced Filtering*. Sensors, 2009, **9**(10): p. 7903-7918.
119. Muller, C.R., Haas, S.E., Bassani, V.L., Guterres, S.S., Fessi, H., Peralba, M.d.C.R., Pohlmann, A.R., *Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas*. Química Nova, 2004, **27**: p. 555-560.
120. Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D., *Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout*. Aquatic Toxicology, 2004, **68**(2): p. 141-150.
121. Kuhlmann, O., Stoldt, G., Struck, H.G., Krauss, G.J., *Simultaneous determination of diclofenac and oxybuprocaine in human aqueous humor with HPLC and electrochemical detection*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1998, **17**(8): p. 1351-1356.
122. Lee, H.S., Jeong, C.K., Choi, S.J., Kim, S.B., Lee, M.H., Ko, G.I., Sohn, D.H., *Simultaneous determination of aceclofenac and diclofenac in human plasma by*

- narrowbore HPLC using column-switching*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000, **23**(5): p. 775-781.
123. Payan, M.R., Lopez, M.A.B., Fernandez-Torres, R., Bernal, J.L.P., Mochon, M.C., *HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME)*. Analytica Chimica Acta, 2009, **653**(2): p. 184-190.
 124. Abdel-Hamid, M.E., Novotny, L., Hamza, H., *Determination of diclofenac sodium, flufenamic acid, indomethacin and ketoprofen by LC-APCI-MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, **24**(4): p. 587-594.
 125. Gonzalez, L., Yuln, G., Volonte, M.G., *Determination of cyanocobalamin, betamethasone, and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations, by high performance liquid chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, **20**(3): p. 487-492.
 126. Garcia, S., Sanchez-Pedreno, C., Albero, I., Garcia, C., *Flow-injection spectrophotometric determination of diclofenac or mefenamic acid in pharmaceuticals*. Mikrochimica Acta, 2001, **136**(1-2): p. 67-71.
 127. de Souza, R.L., Tubino, M., *Spectrophotometric determination of diclofenac in pharmaceutical preparations*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2005, **16**(5): p. 1068-1073.
 128. PerezRuiz, T., MartinezLozano, C., Sanz, A., SanMiguel, M.T., *Flow extraction spectrophotometric method for the determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997, **16**(2): p. 249-254.
 129. Carreira, L.A., Rizk, M., Elshabrawy, Y., Zakhari, N.A., Toubar, S.S., *Europium(iii) ion probe spectrofluorometric determination of diclofenac sodium*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1995, **13**(11): p. 1331-1337.
 130. Damiani, P.C., Bearzotti, M., Cabezon, M.A., Olivieri, A.C., *Spectrofluorometric determination of diclofenac in tablets and ointments*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, **20**(3): p. 587-590.
 131. Samaras, V.G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Gatidou, G., Lekkas, T.D., *Determination of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewater by gas chromatography-mass spectrometry*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2010, **90**(3-6): p. 219-229.
 132. Dong, Q., Jin, W.R., *Monitoring diclofenac sodium in single human erythrocytes introduced by electroporation using capillary zone electrophoresis with electrochemical detection*. Electrophoresis, 2001, **22**(13): p. 2786-2792.
 133. Jin, W.R., Zhang, J., *Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection*. Journal of Chromatography A, 2000, **868**(1): p. 101-107.

134. Zinellu, A., Carru, C., Sotgia, S., Porqueddu, E., Enrico, P., Deiana, L., *Separation of aceclofenac and diclofenac in human plasma by free zone capillary electrophoresis using N-methyl-D-glucamine as an effective electrolyte additive*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005, **24**(4): p. 375-380.
135. Schneider, W., Degen, P.H., *Simultaneous determination of diclofenac sodium and its hydroxy metabolites by capillary column gas-chromatography with electron-capture detection* Journal of Chromatography, 1981, **217**(NOV): p. 263-271.
136. Borenstein, M.R., Xue, Y.Z., Cooper, S., Tzeng, T.B., *Sensitive capillary gas chromatographic mass spectrometric selected ion monitoring method for the determination of diclofenac concentrations in human plasma*. Journal of Chromatography B-Biomedical Applications, 1996, **685**(1): p. 59-66.
137. Chmielewska, A., Konieczna, L., Plenis, A., Bieniecki, M., Lamparczyk, H., *Determination of diclofenac in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. Biomedical Chromatography, 2006, **20**(1): p. 119-124.
138. Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., *Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain)*. Environment International, 2007, **33**(4): p. 596-601.
139. Blanco-Lopez, M.C., Lobo-Castanon, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tunon-Blanco, P., *Voltammetric response of diclofenac-molecularly imprinted film modified carbon electrodes*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, **377**(2): p. 257-261.
140. Blanco-Lopez, M.C., Fernandez-Llano, L., Lobo-Castanon, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tunon-Blanco, P., *Voltammetry of diclofenac at graphite, carbon composites, and molecularly imprinted polymer- composite electrodes*. Analytical Letters, 2004, **37**(5): p. 915-927.
141. Fernandez-Llano, L., Blanco-Lopez, M.C., Lobo-Castanon, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tunon-Blanco, P., *Determination of diclofenac in urine samples by molecularly-imprinted solid-phase extraction and adsorptive differential pulse voltammetry*. Electroanalysis, 2007, **19**(15): p. 1555-1561.
142. Manea, F., Ilios, M., Remes, A., Burtica, G., Schoonman, J., *Electrochemical Determination of Diclofenac Sodium in Aqueous Solution on Cu-Doped Zeolite-Expanded Graphite-Epoxy Electrode*. Electroanalysis, 2010, **22**(17-18): p. 2058-2063.
143. Rodriguez, J.A., Barrado, E., Castrillejo, Y., Santos, J.R., Lima, J., *Validation of a tubular bismuth film amperometric detector Determination of diclofenac sodium by multisyringe flow injection analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, **45**: p. 47-53.
144. Santini, A.O., Pezza, H.R., Pezza, L., *Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations using a potentiometric sensor immobilized in a graphite matrix*. Talanta, 2006, **68**(3): p. 636-642.

145. Elnemma, E.M., Hamada, M.A., *Plastic membrane electrodes for the potentiometric determination of codeine in pharmaceutical preparations*. Mikrochimica Acta, 1997, **126**(1-2): p. 147-151.
146. Ammon, S., Von Richter, O., Hofmann, U., Thon, K.P., Eichelbaum, M., Mikus, G., *In vitro interaction of codeine and diclofenac*. Drug Metabolism and Disposition, 2000, **28**(10): p. 1149-1152.
147. Degim, T., Akay, C., Buyukafsar, K., Cevheroglu, S., *Simultaneous determination of codeine and ethyl morphine HCL in tablet formulations using LC*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, **26**(1): p. 15-21.
148. Martindale, *The complete drug reference*, ed. 36. 2009, London; Chicago: Pharmaceutical Press.
149. Williams, D.G., Hatch, D.J., Howard, R.F., *Codeine phosphate in paediatric medicine*. British Journal of Anaesthesia, 2001, **86**(3): p. 413-421.
150. Musshoff, F., Stamer, U.M., Madea, B., *Pharmacogenetics and forensic toxicology*. Forensic Science International, 2010, **203**(1-3): p. 53-62.
151. Minotti, V., De Angelis, V., Righetti, E., Celani, M.G., Rossetti, R., Lupatelli, M., Tonato, M., Pisati, R., Monza, G., Fumi, G., Del Favero, A., *Double-blind evaluation of short-term analgesic efficacy of orally administered diclofenac, diclofenac plus codeine, and diclofenac plus imipramine in chronic cancer pain*. Pain, 1998, **74**(2-3): p. 133-137.
152. Jimenez-Andrade, J.M., Ortiz, M.I., Perez-Urizar, J., Aguirre-Banuelos, P., Granados-Soto, V., Castaneda-Hernandez, G., *Synergistic effects between codeine and diclofenac after local, spinal and systemic administration*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2003, **76**(3-4): p. 463-471.
153. Hu, Z., Zou, Q., Tian, J., Sun, L., Zhang, Z., *Simultaneous determination of codeine, ephedrine, guaiphenesin and chlorpheniramine in beagle dog plasma using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection: Application to a bioequivalence study*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2011, **879**(32): p. 3937-3942.
154. Milovanovic, V., Ciric, B., Milenkovic, J., Kilibarda, V., Curcic, M., Vucinic, S., Antonijevic, B., *Determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine in saliva of substance-abuse patients using HPLC/MS methods*. Vojnosanitetski Pregled, 2012, **69**(2): p. 141-146.
155. Shamsipur, M. Fattahi, N., *Extraction and determination of opium alkaloids in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2011, **879**(28): p. 2978-2983.
156. Suzen, S., Akay, C., Cevheroglu, S., *Simultaneous determination of guaiphenesin and codeine phosphate in tablets by high-performance liquid chromatography*. Farmaco, 1999, **54**(10): p. 705-709.

157. Ramos-Martos, N., Aguirre-Gomez, F., Molinz-Diaz, A., Capitan-Vallvey, L.F., *Application of liquid chromatography to the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, caffeine, codeine, paracetamol, pyridoxine, and thiamine in pharmaceutical preparations*. Journal of Aoac International, 2001, **84**(3): p. 676-683.
158. Huang, D.-K., Liu, C., Huang, M.-K., Chien, C.-S., *Simultaneous determination of morphine, codeine, 6-acetylmorphine, cocaine and benzoylecgonine in hair by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, **23**(7): p. 957-962.
159. Diaconu, I., Aboul-Enein, H.Y., Bunaciu, A.A., Tanase, I.G., *Estimation of uncertainty for measuring codeine phosphate tablets formulations using UV-VIS spectrophotometry*, Analytical Letters, 2010, **43**(7-8): p. 1207-1216.
160. Toral, M.I., Richter, P., Martinez, O., *Simultaneous determination of paracetamol and codeine by first order derivative spectrophotometry*. Boletin De La Sociedad Chilena De Quimica, 1996, **41**(3): p. 283-289.
161. Chen, Z.R., Reynolds, G., Bochner, F., Somogyi, A., *Direct determination of codeine-6-glucuronide in plasma and urine using solid-phase extraction and high-performance liquid-chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography-Biomedical Applications, 1989, **493**(2): p. 313-324.
162. Weingarten, B., Wang, H.Y., Roberts, D.M., *Determination of codeine in human plasma by high-performance liquid-chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography A, 1995, **696**(1): p. 83-92.
163. Pournaghi-Azar, M.H. Saadatirad, A., *Simultaneous Determination of Paracetamol, Ascorbic Acid and Codeine by Differential Pulse Voltammetry on the Aluminum Electrode Modified by Thin Layer of Palladium*. Electroanalysis, 2010, **22**(14): p. 1592-1598.
164. Pournaghi-Azar, M.H., Saadatirad, A., *Simultaneous voltammetric and amperometric determination of morphine and codeine using a chemically modified-palladized aluminum electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2008, **624**(1-2): p. 293-298.
165. Shih, Y., Zen, J.M., Yang, H.H., *Determination of codeine in urine and drug formulations using a clay-modified screen-printed carbon electrode*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, **29**(5): p. 827-833.
166. Yang, X., Feng, J., Chen, Z., Liao, R., Li, X., *Determination of Six Analgesics by CE with an Improved Electromagnetic Induction Detector*. Chromatographia, 2012, **75**(1-2): p. 71-76.
167. Yang, C.Q., Ding, L.Y., Liu, W.N., Zhang, Z.H., *Determination of diclofenac sodium and codeine phosphate in shuerfen tablets by CPA-matrix method*. Spectroscopy and Spectral Analysis, 1999, **19**(2): p. 236-237.
168. Vazquez-Roig, P., Segarra, R., Blasco, C., Andreu, V., Pico, Y., *Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and*

liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2010, **1217**(16): p. 2471-2483.

169. Gomez, M.J., Petrovic, M., Fernandez-Alba, A.R., Barcelo, D., *Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters*. Journal of Chromatography A, 2006, **1114**(2): p. 224-233.
170. Gomez, M.J., Bueno, M.J.M., Lacorte, S., Fernandez-Alba, A.R., Aguera, A., *Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast*. Chemosphere, 2007, **66**(6): p. 993-1002.
171. Dimitrova, B., Doytchinova, I., Zlatkova, R., *Reversed-phase high-performance liquid chromatography for evaluating the distribution of pharmaceutical substances in suppository base-phosphate buffer system*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000, **23**(6): p. 955-964.
172. Petrovic, M., Hernando, M.D., Diaz-Cruz, M.S., Barcelo, D., *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review*. Journal of Chromatography A, 2005, **1067**(1-2): p. 1-14.
173. da Silva, C.G.A. Collins, C.H., *Applications of high performance liquid chromatography for the study of emerging organic pollutants*. Química Nova, 2011, **34**(4): p. 665-U123.
174. Pedrotti, J.J., Angnes, L., Gutz, I.G.R., *Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions*. Electroanalysis, 1996, **8**(7): p. 673-675.
175. Bergamin, H.Z., E. A. G.; Krug, F. J.; Reis, B. F., *Merging zones in flow injection analysis .I. double proportional injector and reagent consumption*. Analytica Chimica Acta, 1978, **101**(1): p. 17-23.
176. dos Santos, W.T.P., Azevedo, E.F., Richter, E.M., and de Albuquerque, Y.D.T., *Construction and characterization of an electrochemical detector for flow analysis*. Quimica Nova, 2009. **32**(9): p. 2412-2416.
177. Granger, M.C.W., M.; Xu, J. S.; Wang, J.; Hupert, M.; Hanks, A.; Koppang, M. D.; Butler, J. E.; Lucazeau, G.; Mermoux, M.; Strojek, J. W.; Swain, G. M., *Standard electrochemical behavior of high-quality, boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes*. Analytical Chemistry, 2000, **72**(16): p. 3793-3804.
178. Bart, M.v.O., Pjhj, Kamp, B., Bult, A., Van Bennekom, W. P., *Development of a confined wall-jet flow-through cell for simultaneous electrochemical and surface plasmon resonance applications*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2002, **84**(2-3): p. 129-135.
179. Sun, Z., Schussler, W., Sengl, M., Niessner, R., Knopp, D., *Selective trace analysis of diclofenac in surface and wastewater samples using solid-phase extraction with a new molecularly imprinted polymer*. Analytica Chimica Acta, 2008, **620**(1-2): p. 73-81.

180. Manassra, A., Khamis, M., El-Dakiky, M., Abdel-Qader, Z., Al-Rimawi, F., *Simultaneous HPLC analysis of pseudophedrine hydrochloride, codeine phosphate, and triprolidine hydrochloride in liquid dosage forms*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, **51**(4): p. 991-993.
181. Aslanoglu, M., Kutluay, A., Abbasoglu, S., Karabulut, S., *A poly(3-acetylthiophene) modified glassy carbon electrode for selective voltammetric measurement of uric acid in urine sample*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2008, **56**(3): p. 282-286.
182. Xiao, L.F., Chen, J., Cha, C.S., *Elimination of the interference of ascorbic acid in the amperometric detection of biomolecules in body fluid samples and the simple detection of uric acid in human serum and urine by using the powder microelectrode technique*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2000, **495**(1): p. 27-35.
183. Silva, E.C., Araujo, M.C.U., Honorato, R.S., Lima, J., Zagatto, E.A.G., Brienza, S.M.B., *Standard additions in flow injection analysis based on merging zones and gradient exploitation: Application to copper determination in spirits*. Analytica Chimica Acta, 1996, **319**(1-2): p. 153-158.
184. Goyal, R.N., Chatterjee, S., Rana, A.R.S., *The effect of modifying an edge-plane pyrolytic graphite electrode with single-wall carbon nanotubes on its use for sensing diclofenac*. Carbon, 2010, **48**(14): p. 4136-4144.
185. Campean, A., Tertis, M., Sandulescu, R., *Voltammetric determination of some alkaloids and other compounds in pharmaceuticals and urine using an electrochemically activated glassy carbon electrode*. Central European Journal of Chemistry, 2011, **9**(4): p. 688-700.
186. Pournaghi-Azar, M.H., Kheradmandi, S., Saadatirad, A., *Simultaneous voltammetry of paracetamol, ascorbic acid, and codeine on a palladium-plated aluminum electrode: oxidation pathway and kinetics*. Journal of Solid State Electrochemistry, 2010, **14**(9): p. 1689-1695.