

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós Graduação em Química

**Uso do eletrodo de diamante dopado com boro acoplado a um
sistema BIA para determinação simultânea de princípios
ativos em medicamentos**

POLYANA FERNANDES PEREIRA

Tese de Doutorado

Uberlândia
Fevereiro/ 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós Graduação em Química

**Uso do eletrodo de diamante dopado com boro acoplado a um
sistema BIA para determinação simultânea de princípios
ativos em medicamentos**

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

Doutoranda: Polyana Fernandes Pereira

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Área de Concentração: Química Analítica

Uberlândia
Fevereiro/ 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- P436u
2016 Pereira, Polyana Fernandes, 1986-
 Uso do eletrodo de diamante dopado com boro acoplado a um sistema BIA para determinação simultânea de princípios ativos em medicamentos / Polyana Fernandes Pereira. - 2016.
 156 f. : il.
- Orientador: Eduardo Mathias Richter.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.
 Inclui bibliografia.
1. Química - Teses. 2. Análise por injeção em batelada - Teses. 3. Medicamentos - Análise - Teses. 4. Química analítica - Teses. I. Richter, Eduardo Mathias. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.



**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 47/PPQUI.**

DATA: 26/02/2016

DISCENTE: Polyana Fernandes Pereira

MATRÍCULA: 11213QMI010

TÍTULO DO TRABALHO: Uso do eletrodo de diamante dopado com boro acoplado a um sistema BIA para determinação simultânea de princípios ativos em medicamentos.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

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

Às treze horas e trinta minutos do dia vinte e seis de janeiro do ano dois mil e dezesseis, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Adelir Aparecida Saczk, da Universidade Federal de Lavras, esta por videoconferência, Dosil Pereira de Jesus, da Universidade Estadual de Campinas, Edson Nossol e Alex Domingues Batista, da UFU e Eduardo Mathias Richter, orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Regulamentar nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em 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 17 horas e 48 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Profª Dra. Adelir Aparecida Saczk
IFLA

Profª Dra. Dosil Pereira de Jesus
UNICAMP

Prof. Dr. Edson Nossol – IQUFU

Prof. Dr. Alex Domingues Batista – IQUFU

Professor(a) Orientador(a): Eduardo Mathias Richter – IQUFU

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Aivaldo e Maria Elena, pelo exemplo de vida
e por me darem como herança a coisa mais valiosa desse mundo: Educação.

Além do amor mais puro e sincero sentido nos mínimos gestos.

A minha felicidade é ver vocês felizes!

Ao Hugo Leonardo, por tantos anos ao meu lado
compartilhando os momentos mais importantes da minha vida.

...Amo vocês! ❤️

AGRADECIMENTOS

- ✚ À Deus, pela minha vida e por me guiar em todas as minhas escolhas.
- ✚ À minha família, em especial meus pais e minha irmã comadre Tatyane. Vocês são minha base. Anjos que Deus colocou em minha vida.
- ✚ À minha afilhadinha Mariana Fernandes Cintra. Mais um anjinho que Deus nos enviou para nos dar alegria. Dindinha te ama!
- ✚ À minha avó Alice Maria Pereira, mulher guerreira que, viúva aos 40 anos e recebendo 1 salário mínimo, conseguir educar com dignidade seus 8 filhos. Você é meu exemplo e me mostrou que nunca devemos desistir de nada, por mais difícil que seja a caminhada. É só erguer a cabeça e ir com fé. Obrigada por todas as orações.
- ✚ Ao meu amor Hugo Leonardo, pelo apoio e companheirismo de sempre. Ao seu lado consigo ir mais além.
- ✚ Ao meu orientador Eduardo Mathias Richter, por tantos conselhos, ensinamentos, paciência e compreensão. Você se tornou minha referência profissional!
- ✚ Ao Prof. Rodrigo Alejandro Arbaza. Munoz, sempre disposto a auxiliar em todas as dúvidas.
- ✚ Aos amigos do NUPE: André, Luis, David, Dalyelli, Gracy, Jéssica, Ana, Michelle, Rafael Melo, Rafael Dornellas, Daniela, Jhonys, Thiago Costa, Thiago Tormin, Laiz, Dudu, Banana, Pisquilha, Denise, Mariana e Weberson. Vocês são feras. Tornaram meus dias de trabalho no laboratório mais alegres. Um agradecimento especial à Mariana e ao Weberson, que me auxiliaram bastante

nesse último ano de doutorado, colaborando de forma significativa para a conclusão desse trabalho.

✚ *Às amigas de longa data: Bia, Jú, Dani, Jaque, Carol. Nossos encontros são raros, mas saibam que sempre estarei torcendo para o sucesso pessoal e profissional de cada uma de vocês.*

✚ *Aos professores do IQ-UFU que contribuíram para a minha formação.*

✚ *Aos técnicos e secretários do IQ-UFU pela ajuda sempre que necessário.*

✚ *Aos membros da banca pela aceitação e contribuições a serem concedidas para o aprimoramento deste trabalho.*

✚ *À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.*

✚ *Ao IQ-UFU pelo espaço físico concedido.*

Obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Tereza de Calcutá)

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
TRABALHOS REALIZADOS	14
ÍNDICE DE FIGURAS	16
ÍNDICE DE TABELAS	22
ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. Considerações gerais.....	25
1.2. Princípios ativos estudados.....	26
1.2.1. Nimesulida (NIM) e paracetamol (PAR).....	26
1.2.1.1. Metodologias disponíveis na literatura para determinação simultânea de NIM e PAR	27
1.2.2. Prometazina (PRO) e codeína (COD)	30
1.2.2.1. Metodologias disponíveis na literatura para determinação simultânea de PRO e COD	32
1.2.3. Amilorida (AMD) e furosemida (FMD)	33
1.2.3.1. Metodologias disponíveis na literatura para determinação simultânea de AMD e FMD	34
1.2.4. Sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP) e fenazopiridina (FZP).....	38
1.2.4.1. Metodologias disponíveis na literatura para determinação simultânea de SMX, TMP e FZP	40
1.3. Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD).....	41
1.4. Análise por injeção em batelada (BIA)	44
1.5. BIA com detecção amperométrica (BIA-MPA)	47
2. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	53
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	54
3.1. Reagentes e amostras	54

3.2. Preparo de soluções: eletrólitos de suporte, padrões, amostras e fases móveis.	55
3.2.1. Determinação simultânea de NIM e PAR	55
3.2.2. Determinação simultânea de PRO e COD	56
3.2.3. Determinação simultânea de AMD e FMD	56
3.2.4. Determinação simultânea de SMX, TMP e FZP	58
3.3. Instrumentação	59
3.3.1. Detecção eletroquímica	59
3.3.2. Eletrodos de trabalho, referência e auxiliar	60
3.3.3. Células eletroquímicas	61
3.3.4. Análises comparativas por cromatografia em líquida	64
3.4. Procedimento usados no cálculo de alguns parâmetros analíticos	64
3.4.1. Limite de detecção (LD)	64
3.4.2. Limite de quantificação (LQ)	65
3.4.3. Repetibilidade	65
3.4.4. Linearidade	66
3.4.5. Exatidão	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	69
4.1. Determinação simultânea de NIM e PAR	69
4.1.1. Comportamento eletroquímico de NIM e PAR empregando eletrodo de BDD	69
4.1.2. Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de NIM e PAR por BIA	73
4.1.3. Otimização dos parâmetros hidrodinâmicos do sistema BIA-MPA	75
4.1.4. Estudo da repetibilidade do método	78
4.1.5. Aplicação do sistema BIA-MPA na determinação simultânea de NIM e PAR em formulações farmacêuticas	79

4.1.6. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA e métodos publicados anteriormente.	82
4.2. Determinação simultânea de PRO e COD	84
4.2.1. Comportamento eletroquímico de PRO e COD empregando eletrodo de DDB	84
4.2.2. Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de PRO e COD por BIA-MPA	88
4.2.3. Otimização dos parâmetros experimentais do sistema BIA	91
4.2.4. Estudo da repetibilidade do método.....	93
4.2.5. Aplicação do sistema BIA-MPA na determinação simultânea de PRO e COD em formulações farmacêuticas	94
4.2.6. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA e métodos publicados anteriormente.	100
4.3. Determinação simultânea de AMD e FMD	102
4.3.1. Comportamento eletroquímico de AMD e FMD empregando eletrodo de BDD	102
4.3.2. Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de AMD e FMD por BIA-MPA	106
4.3.3. Otimização dos parâmetros experimentais do sistema BIA-MPA ...	108
4.3.4. Estudo da repetibilidade do método.....	110
4.3.5. Aplicação do sistema BIA-MPA na determinação simultânea de AMD e FMD em formulações farmacêuticas	111
4.3.6. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA e métodos publicados anteriormente.	114
4.4. Determinação simultânea de SMX, TMP e FZP por BIA-MPA	117
4.4.1. Comportamento eletroquímico de SMZ, TMP e FZP empregando eletrodo de BDD	117
4.4.2. Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de SMX, TMP e FZP por BIA-MPA.....	122

4.4.3.	Otimização dos parâmetros experimentais para o sistema BIA	125
4.4.4.	Estudo da repetibilidade do método.....	127
4.4.5.	Aplicação do sistema BIA-MPA na determinação simultânea de SMX, TMP e FZP em formulações farmacêuticas	129
4.4.6.	Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA e métodos publicados anteriormente.	132
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de novos procedimentos analíticos usando Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção amperométrica e diamante dopado com boro (BDD) como eletrodo de trabalho. Este procedimento foi empregado para a determinação simultânea de princípios ativos presentes em quatro formulações farmacêuticas comerciais: **(1)** nimesulida (NIM) e paracetamol (PAR); **(2)** prometazina (PRO) e codeína (COD); **(3)** amilorida (AMD) e furosemida (FMD); **(4)** sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP) e fenazopiridina (FZP). Todos os procedimentos de análise desenvolvidos mostraram-se estáveis ($DPR < 2,5\%$), lineares ($R > 0,996$), rápidos (até 74 injeções h^{-1}) e com baixos limites de detecção ($mg L^{-1}$): NIM (0,299); PAR (0,293); PRO (0,065); COD (0,135); AMD (0,130); FMD (0,940); FZP (0,050); SMX (0,200) e TMP (0,150).

Palavras-Chave: Amperometria de múltiplos pulsos (MPA), nimesulida, paracetamol, prometazina, codeína, amilorida, furosemida, fenazopiridina, sulfametoxazol, trimetoprima.

ABSTRACT

The present work describes the development of new analytical procedures using Batch Injection Analysis (BIA) with amperometric detection and boron-doped diamond (BDD) as working electrode. This procedure was used for simultaneous determination of active ingredients present in four commercial pharmaceutical formulations: **(1)** nimesulide (NIM) and paracetamol (PAR); **(2)** promethazine (PRO) and codeine (COD); **(3)** amiloride (AMD) and furosemide (FMD); **(4)** sulfamethoxazole (SMX), trimethoprim (TMP) and phenazopyridine (FZP). All developed analysis procedures remained stable ($RSD < 2.5\%$), linear ($R > 0.996$), fast (until 74 injections h^{-1}) and with low detection limits ($mg\ L^{-1}$): NIM (0.299); PAR (0.293); PRO (0.065); COD (0.135); AMD (0.130); FMD (0.940); FZP (0.050); SMX (0.200) and TMP (0.150).

Keywords: Multiple pulse amperometry (MPA), nimesulide, paracetamol, promethazine, codeine, amiloride, furosemide, phenazopyridine, sulfamethoxazole, trimethoprim.

TRABALHOS REALIZADOS

PUBLICAÇÕES EM REVISTAS CIENTÍFICAS DE ARTIGOS RELACIONADOS A PRESENTE TESE

1. Pereira PF, Marra MC, Lima AB, dos Santos WTP, Munoz RAA, Richter EM: **Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode.** *Diamond & Related Materials* 2013, **39**: 41–46.
2. Pereira PF, Marra MC, Cunha RR, da Silva WP, Munoz RAA, Richter EM: **Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine.** *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2014, **713**:32–38.
3. Pereira PF, da Silva WP, Munoz RAA, Richter EM: **Determinação rápida e simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima utilizando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica e eletrodo de diamante dopado com boro.** *Química Nova* 2015, **38** (5):663–668.
4. Pereira PF, da Silva WP, Munoz RAA, Richter EM: **A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole and trimethoprim on boron-doped diamond electrode.** *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2016, **766**:87–93.

DEMAIS PUBLICAÇÕES EM REVISTAS CIENTÍFICAS

5. Gimenes DT, Pereira PF, Cunha RR, da Silva RAB, Munoz RAA, Richter EM: **A Simple Strategy to Improve the Accuracy of the Injection Step in Batch Injection Analysis Systems with Amperometric Detection.** *Electroanalysis* 2012, **24** (9):1805–1810.
6. Gimenes DT, Cunha RR, Ribeiro MMAC, Pereira PF, Munoz RAA, Richter EM: **Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac** *Talanta* 2013, **116**:1026–1032.

7. Lima AM, Chaves SC, da Silva LM, Pereira PF, Richter EM, dos Santos, WTP:
Determinação de nimesulida por análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos. *Química Nova* 2013, **XY** (00):1–7.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula molecular da NIM.	26
Figura 2. Fórmula molecular do PAR.	27
Figura 3. Fórmula molecular da PRO	31
Figura 4. Fórmula molecular da COD	31
Figura 5. Fórmula molecular da AMD (A) e da FMD (B).....	33
Figura 6. Fórmula molecular do SMX.....	38
Figura 7. Fórmula molecular da TMP.....	39
Figura 8. Fórmula molecular da FZP	39
Figura 9. Etapas de operação de um sistema BIA com detecção eletroquímica e respectivo pico transiente obtido. (A) antes da injeção; (B) durante a injeção; (C) final da injeção; (D) dispersão e (E) equilíbrio final.	45
Figura 10. Efeito do volume injetado na corrente detectada no sistema BIA com detecção amperométrica. Velocidade de injeção: $113 \mu\text{L s}^{-1}$ [153].	50
Figura 11. Efeito da velocidade de injeção na corrente detectada no sistema BIA com detecção amperométrica. Volume de injeção: $150 \mu\text{L}$ [153].	51
Figura 12. Cromatograma obtido experimentalmente com a injeção de uma solução padrão contendo uma mistura de TMP (10 mg L^{-1}) + SMX (50 mg L^{-1}) + FZP ($6,3 \text{ mg L}^{-1}$).....	59
Figura 13. Imagem da célula eletroquímica utilizada nos experimentos de voltametria cíclica.	61
Figura 14. (A) Diagrama esquemático do sistema BIA usado nos estudos. (B) Imagem do sistema BIA usado nos estudos.....	62
Figura 15. Imagem do sistema de agitação para a célula BIA.	63

Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de H_2SO_4 0,10 mol L^{-1} em água/EtOH (70:30), antes (—) e após a adição de 263,0 mg L^{-1} de PAR (····) ou 370,0 mg L^{-1} de NIM (----). Eletrodo de trabalho: BDD; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Incremento de potencial: 5 mV	70
Figura 17. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica do PAR.	71
Figura 18. Esquema do mecanismo da redução eletroquímica da NIM.	72
Figura 19. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos com o sistema BIA-MPA para PAR (○; 35 mg L^{-1}) e NIM (■; 70 mg L^{-1}) plotando a média dos picos de corrente em função do pulso de potencial aplicado correspondente. Eletrólito de suporte: 0,10 mol L^{-1} de H_2SO_4 /EtOH (70:30); Velocidade de injeção: 57 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 150 μL . 73	73
Figura 20. (A) Esquema dos pulsos de potenciais; (B) Respostas (n = 3) obtidas com o sistema BIA-MPA para injeção de soluções contendo somente NIM (20 mg L^{-1}), somente PAR (100 mg L^{-1}) e uma mistura de NIM + PAR (20 + 100 mg L^{-1} , respectivamente). Velocidade de agitação: 2700 rpm; Volume de injeção: 150 μL ; Velocidade de injeção: 57 $\mu\text{L s}^{-1}$	74
Figura 21. Ampliação de dois picos transientes obtidos com a injeção de uma solução contendo NIM + PAR (20 + 100 mg L^{-1} , respectivamente) no sistema BIA-MPA com a identificação de seus respectivos pontos de aquisição de corrente. Volume de injeção: 150 μL ; Velocidade de injeção: 57 $\mu\text{L s}^{-1}$; Velocidade de agitação da solução: 2700 rpm.	76
Figura 22. Comparação entre os resultados obtidos por BIA sem e com agitação da solução no interior da célula. Velocidades de agitação: (a) 1400 rpm e (b) 2700 rpm. Solução injetada: NIM + PAR (20 + 100 mg L^{-1} , respectivamente); outras condições ver Fig. 20.	77
Figura 23. Estudo de repetibilidade obtida através de injeções sucessivas de soluções contendo 10 + 50 mg L^{-1} (a) ou 50 + 250 mg L^{-1} (b) de NIM + PAR, respectivamente. Outras condições ver Fig. 20	78
Figura 24. (A) Amperogramas obtidos por BIA-MPA após injeções em triplicatas de cinco soluções padrão contendo, simultaneamente, concentrações crescentes de PAR (a	

– e: 50 a 250 mg L⁻¹) e NIM (a – e: 10 a 50 mg L⁻¹) e quatro amostras farmacêuticas devidamente diluídas em eletrólito de suporte (f – i); **(B)** Curva de calibração do PAR ($r = 0,999$); **(C)** Curva de calibração da NIM ($r = 0,999$). Outras condições ver Fig. 20.

..... 80

Figura 25. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando BDD como eletrodo de trabalho em meio de solução tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH = 4,7), antes (—) e após a adição de 160 mg L⁻¹ de PRO (···) ou 203 mg L⁻¹ de COD (----). Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹; Incremento de potencial: 5 mV 85

Figura 26. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica da COD [173]..... 85

Figura 27. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica da PRO [177]. 86

Figura 28. **(A)** Amperogramas obtidos no sistema BIA-MPA após injeções em duplicatas de uma solução contendo 50 mg L⁻¹ de PRO ou 80 mg L⁻¹ de COD. **(B)** Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos plotando a média dos valores de corrente em função dos pulsos de potencial aplicados. Eletrólito de suporte: 0,10 mol L⁻¹ de solução tampão acetato (pH = 4,7); velocidade de injeção: 75 µL s⁻¹; volume de injeção: 150 µL. 87

Figura 29. **(A)** Esquema de aplicação dos pulsos de potenciais; **(B)** Respostas obtidas ($n = 3$) com o sistema BIA-MPA para injeções de soluções contendo somente PRO (25 mg L⁻¹), somente COD (40 mg L⁻¹) e a mistura de PRO + COD (25 + 40 mg L⁻¹, respectivamente). Pulso de potencial de limpeza: 0,0 V/ 200 ms; Velocidade de agitação: 1400 rpm; Volume de injeção: 150 µL; Velocidade de injeção: 75 µL s⁻¹. 89

Figura 30. Picos transientes, com seus respectivos pontos de amostragem de corrente obtidos após a injeção de uma solução contendo PRO + COD (25 + 40 mg L⁻¹, respectivamente) no sistema BIA-MPA. Outras condições ver Fig. 29 91

Figura 31. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA com e sem a agitação da solução no interior da célula. Velocidade de agitação: 1400 rpm; solução injetada: 25 mg L⁻¹ de PRO + 40 mg L⁻¹ de COD. Outras condições ver Fig. 29. 92

Figura 32. Estudo de repetibilidade. amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo 10 + 16 mg L⁻¹ (a) ou 50 + 80 mg L⁻¹ (b) de PRO + COD, respectivamente. Outras condições ver Fig. 29. 93

Figura 33. (A) Amperogramas obtidos por BIA-MPA após injeções ($n = 3$) de solução contendo PRO (15 mg L^{-1}), cinco soluções padrão contendo simultaneamente concentrações crescentes de PRO (a – e: $5 - 25 \text{ mg L}^{-1}$) e COD (a – e: $8-40 \text{ mg L}^{-1}$), quatro amostras farmacêuticas devidamente diluídas (f, g, h e i) e etanol 99% (j) para limpeza do eletrodo após a injeção das amostras. Curvas de calibração sobrepostas (ordem ascendente e descendente) para COD (B) e PRO (C). Outras condições ver Fig. 29. ... 95

Figura 34. (A) Amperogramas obtidos por BIA-MPA após injeções, em triplicatas, de solução contendo PRO (15 mg L^{-1}), cinco soluções padrão contendo simultaneamente concentrações crescentes de PRO (a – e: $5 - 25 \text{ mg L}^{-1}$) e COD (a – e: $8-40 \text{ mg L}^{-1}$) e quatro amostras farmacêuticas devidamente diluídas (f, g, h e i). Curvas de calibração sobrepostas (ordem ascendente e descendente) para COD (B) e PRO (C). Outras condições ver Fig. 29. 97

Figura 35. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n = 10$) de soluções contendo PRO e COD (160 e 203 mg L^{-1} , respectivamente) e lítio como padrão interno ($4,86 \text{ mg L}^{-1}$); (*) pico desconhecido. Solução tampão de corrida: $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido oxálico + 10 mmol L^{-1} de trietanolamina ($\text{pH} = 8,4$); potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $0,6 \text{ s}$; comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm , respectivamente [182]. 99

Figura 36. (A) Influência do pH nos potenciais de oxidação da AMD e FMD. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo BDD em meio de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão BR ($\text{pH} = 10$) preparado em água/MetOH (70:30) antes (—) e após a adição de $200,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AMD (····) ou $800,0 \text{ mg L}^{-1}$ de FMD (- - -). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Incremento de potencial: 5 mV 102

Figura 37. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica da FMD. 104

Figura 38. Esquema do provável mecanismo da oxidação eletroquímica da AMD.... 105

Figura 39. (A) Amperogramas obtidos com o sistema BIA-MPA após injeções em triplicata de solução contendo 30 mg L^{-1} de AMD ou 120 mg L^{-1} de FMD. (B) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos após plotar a média dos valores de corrente em função do pulso de potencial correspondente. Eletrólito de suporte: $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de

solução tampão borato em água/ MetOH (70:30); velocidade de injeção: $75 \mu\text{L s}^{-1}$;
 volume de injeção: $150 \mu\text{L}$ 106

Figura 40. (A) Esquema de aplicação dos pulsos de potenciais; (B) Amperogramas obtidos com o sistema BIA-MPA para injeções em triplicata de soluções contendo somente AMD (30 mg L^{-1}), somente FMD (120 mg L^{-1}) e AMD + FMD ($30 + 120 \text{ mg L}^{-1}$). Pulso de potencial de limpeza: $+ 0,50 \text{ V/ } 200 \text{ ms}$; Velocidade de agitação: 1400 rpm ; Volume de injeção: $150 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção: $75 \mu\text{L s}^{-1}$ 107

Figura 41. Picos transientes, com seus respectivos pontos (~ 47 pontos/pico), obtidos após a injeção de uma solução contendo AMD + FMD ($18 + 72 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente) no sistema BIA-AMP. Outras condições ver Fig. 28. 109

Figura 42. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA com e sem a agitação da solução contida no interior da célula. Velocidade de agitação: 1400 rpm ; solução injetada: 18 mg L^{-1} de AMD + 72 mg L^{-1} de FMD. Outras condições ver Fig. 40. 110

Figura 43. Estudo de repetibilidade. Amperogramas obtidos após injeções de soluções contendo somente AMD (18 mg L^{-1}) para o cálculo do FC, (a) 6 e 24 mg L^{-1} ou (b) 30 e 120 mg L^{-1} de AMD e FMD, respectivamente. Outras condições ver Fig. 40..... 111

Figura 44. (A) Amperogramas obtidos no sistema BIA-MPA após a injeção em triplicata de AMD (a: 18 mg L^{-1} ; para o cálculo do FC), cinco soluções padrão contendo simultaneamente concentrações crescentes de AMD (b – f: 6 a 30 mg L^{-1}) e FMD (b – f: 24 a 120 mg L^{-1}), e quatro amostras farmacêuticas (g, h, i e j) devidamente diluídas em eletrólito de suporte; Curvas de calibração de (B) FMD e (C) AMD. Outras condições ver Fig. 40. 112

Figura 45. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de BDD e solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,0$) em água/MetOH (70:30) antes (—) e após a adição de 250 , 253 ou 290 mg L^{-1} de FZP (\cdots), SMX ($- - -$) ou TMP (\cdots), respectivamente. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Incremento de potencial: 5 mV ..118

Figura 46. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica do SMX. 118

Figura 47. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica da TMP. 119

Figura 48. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica da FZP.	120
Figura 49. (A) Amperogramas obtidos com o sistema BIA-MPA após injeções em triplicatas de soluções contendo somente TMP (10 mg L ⁻¹), somente SMX (50 mg L ⁻¹) ou somente FZP (6,3 mg L ⁻¹); (B) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos plotando a média dos valores dos picos de corrente em função dos correspondentes pulsos de potenciais aplicados. Eletrólito de suporte: 0,05 mol L ⁻¹ de solução tampão fosfato (pH = 7,0) em água/MetOH (70:30); velocidade de injeção: 75 µL s ⁻¹ ; volume de injeção: 150 µL..	121
Figura 50. (A) Esquema de aplicação dos pulsos de potenciais; (B) Amperogramas obtidos por BIA-MPA após injeção de soluções (n = 2) contendo somente TMP (10 mg L ⁻¹), somente SMX (50 mg L ⁻¹), somente FZP (6,3 mg L ⁻¹) e TMP + SMX + FZP (10 + 50 + 6,3 mg L ⁻¹ , respectivamente). Pulsos de potenciais de limpeza: + 1,80 V/ 200 ms e + 0,20 V/ 100 ms; Velocidade de agitação: 1400 rpm; Volume de injeção: 150 µL; Velocidade de injeção: 75 µL s ⁻¹	123
Figura 51. Picos transientes, com seus respectivos pontos de amostragem de corrente (~33 pontos/pico), obtidos após a injeção de uma solução contendo TMP + SMX + FZP (10 + 50 + 6,3 mg L ⁻¹ , respectivamente) no sistema BIA-MPA. Outras condições ver Fig. 50.....	126
Figura 52. Respostas (n = 3) obtidas com o sistema BIA com a solução no interior da célula com e sem a agitação. Velocidade de agitação: 1400 rpm; solução injetada: TMP + SMX + FZP (10 + 50 + 6,3 mg L ⁻¹ , respectivamente). Outras condições ver Fig. 50...	127
Figura 53. Amperogramas obtidos após injeções de soluções contendo somente SMX (30 mg L ⁻¹) para o cálculo do FC ₃ , somente FZP (3,8 mg L ⁻¹) para o cálculo do FC ₁ e FC ₂ e duas soluções de composições diferentes: (a) 1,3 + 2,0 + 10 mg L ⁻¹ e (b) 6,3 + 10 + 50 mg L ⁻¹ de FZP + TMP + SMX, respectivamente. Outras condições ver Fig. 50. ...	128
Figura 54. (A) Amperogramas obtidos com o sistema BIA-MPA após a injeção de soluções contendo SMX (30 mg L ⁻¹), FZP (3,8 mg L ⁻¹), cinco soluções padrão contendo simultaneamente concentrações crescentes de FZP (a – e: 1,3 a 6,3 mg L ⁻¹), TMP (a – e: 2,0 a 10,0 mg L ⁻¹) e SMX (a – e: 10,0 a 50,0 mg L ⁻¹), e quatro amostras farmacêuticas (f, g, h e i) devidamente diluídas no eletrólito de suporte; Curvas de calibração: (B) TMP; (C) SMX e (D) FZP. Outras condições ver Fig. 50.....	130

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Lista de reagentes utilizados nos trabalhos com suas procedências.	54
Tabela 2. Características analíticas do método BIA-MPA para NIM e PAR	81
Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos para determinação simultânea de NIM e PAR por BIA-MPA e HPLC (n = 3).....	81
Tabela 4. Comparação entre as características analíticas do método proposto e métodos analíticos anteriores para a determinação simultânea de NIM e PAR.....	83
Tabela 5. Características analíticas do método BIA-MPA para PRO e COD.....	98
Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de PRO e COD por BIA e HPLC (n = 3).....	98
Tabela 7. Comparação entre as características analíticas do método proposto e métodos analíticos publicados anteriormente para a determinação simultânea de PRO e COD.	100
Tabela 8. Características analíticas do método BIA-MPA para AMD e FMD.	113
Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos para determinação simultânea de AMD e FMD por BIA e HPLC (n = 3).	114
Tabela 10. Comparação entre as características analíticas do método proposto e métodos analíticos anteriores para a determinação simultânea de AMD e FMD.	115
Tabela 11. Características analíticas do método BIA-MPA para SMX, TMP e FZP..	131
Tabela 12. Comparação dos resultados obtidos para determinação simultânea de TMP, SMX e FZP por BIA e HPLC (n = 3).	132
Tabela 13. Comparação entre as características analíticas do método proposto e métodos analíticos anteriores para a determinação simultânea de SMX, TMP e FZP.	133

ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ACN	→ Acetonitrila
AMD	→ Amilorida
b	→ Coeficiente angular ou sensibilidade da calibração
BDD	→ Diamante dopado com boro, do inglês, “ <i>Boron-doped diamond</i> ”
BIA	→ Análise por injeção em batelada, do inglês, “ <i>Batch injection analysis</i> ”
BR	→ Solução tampão Britton-Robbinson
COD	→ Codeína
DPb	→ Desvio padrão do branco
DPR	→ Desvio padrão relativo
DPx	→ Desvio padrão da concentração
EtOH	→ Etanol
FC	→ Fator de correção
FMD	→ Furosemida
FZP	→ Fenazopiridina
HAc	→ Ácido acético
HPLC	→ Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, “ <i>High performance liquid chromatography</i> ”
LD	→ Limite de detecção
LQ	→ Limite de quantificação
MetOH	→ Metanol
MPA	→ Amperometria de múltiplos pulsos, do inglês, “ <i>Multiple pulse amperometry</i> ”
NIM	→ Nimesulida
PAR	→ Paracetamol
PRO	→ Prometazina
r	→ Coeficiente de correlação linear
SMX	→ Sulfametoxazol
TMP	→ Trimetoprima

\bar{x} → Média da concentração

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

O controle de qualidade dos medicamentos é de grande importância para garantir a sua eficácia e diminuir a ocorrência de efeitos indesejados provocados pela presença de princípios ativos em maior ou menor quantidade, impurezas e/ou produtos de degradação. Para este fim, técnicas analíticas têm sido recomendadas nas Farmacopéias, envolvendo métodos clássicos e instrumentais, principalmente para a quantificação de princípios ativos em formulações farmacêuticas.

A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é bastante utilizada no controle de qualidade de medicamentos [1]. No entanto, a utilização dessa técnica requer um investimento inicial elevado (aquisição do equipamento) e uso de reagentes (solventes) de custo elevado (alta pureza). Além disso, um número restrito de laboratórios possui este tipo de equipamento, o que se deve, principalmente, ao seu alto custo de aquisição, operação e manutenção.

Nesse contexto, estudos para o desenvolvimento de métodos que possibilitem análises a um custo menor, com maior frequência analítica e com a manutenção da qualidade dos resultados são de grande importância. O sucesso desses estudos pode permitir que empresas com menor poder aquisitivo (farmácias de manipulação, por exemplo) possam implantar estas metodologias de controle de qualidade, pois os custos de aquisição, de operação e de manutenção são consideravelmente inferiores. Metodologias de controle de qualidade usando Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção amperométrica apresentam características apropriadas para o desenvolvimento de métodos de análise com as seguintes características: portabilidade (implementável em laboratórios com

pouca infraestrutura), baixo custo, elevada seletividade e sensibilidade nas determinações, elevada frequência analítica, consumo mínimo de reagentes e amostras e, portanto, geração de resíduos em menor volume. Assim, o emprego de sistemas BIA pode se tornar uma promissora ferramenta para contornar os problemas citados acima.

1.2. Princípios ativos estudados

1.2.1. Nimesulida (NIM) e paracetamol (PAR)

A nimesulida (NIM) ou N-(4-nitro-2-fenoxifenil)metanossulfonamida, cujo modelo molecular pode ser observado na Figura 1, é um anti-inflamatório não esteroide (AINE), pertencente à classe das sulfonamidas, com excelentes propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas [2]. No entanto, o uso de excesso de NIM pode causar efeitos colaterais graves, incluindo problemas hepáticos, renais e gastrointestinais [3].

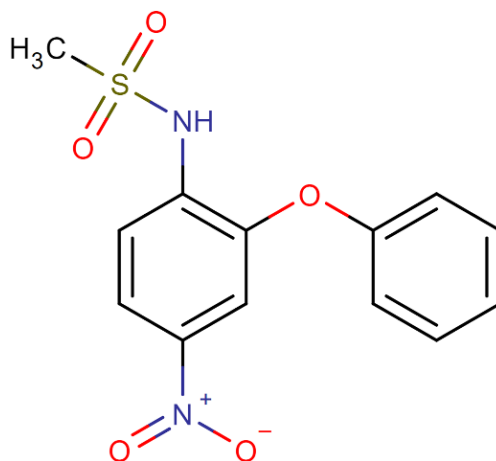


Figura 1. Fórmula molecular da NIM.

O paracetamol (PAR) ou N-acetil-p-aminofenol (Fig. 2) é uma droga popular com propriedades analgésicas e antipiréticas [4] utilizada principalmente no alívio de dores de cabeça ou outras pequenas dores, e de sintomas relacionados a gripes e resfriados.

Geralmente o PAR não apresenta efeitos colaterais nocivos, uma vez que pode ser rapidamente e completamente metabolizado [5]. No entanto, sua sobredosagem (máximo 4,0 g diárias) pode causar hepatotoxicidade fatal, nefrotoxicidade, doenças hepáticas, erupções cutâneas e inflamação do pâncreas [6-9].

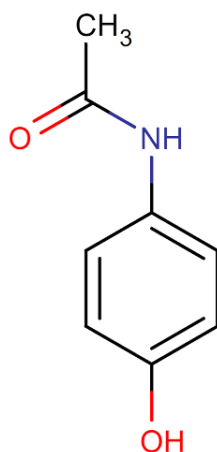


Figura 2. Fórmula molecular do PAR.

De acordo com alguns estudos, se NIM é combinada com PAR em formulações farmacêuticas, uma menor dosagem de NIM é necessária (efeito sinérgico) e os efeitos colaterais podem ser prevenidos [10]. Portanto, algumas empresas introduzem NIM e PAR combinados em comprimidos numa proporção de 1:3 ou 1:5 (m/m), e afirmam que esta combinação acelera e prolonga os efeitos analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios quando comparado com qualquer um dos fármacos individualmente [11].

1.2.1.1. Metodologias disponíveis na literatura para determinação simultânea de NIM e PAR

Alguns métodos analíticos têm sido relatados para a determinação simultânea de NIM e PAR, incluindo cromatografia em camada delgada [12], espectrofotometria UV-VIS [2, 13] e cromatografia em fase líquida [14-18].

O uso da cromatografia em camada delgada para determinação simultânea de PAR, NIM e clorzoxazona foi descrito por Sane e Gadgil em 2002 [12]. A fase estacionária utilizada nesse estudo foi constituída de sílica gel, a fase móvel por clorofórmio: metanol: tolueno (6: 1: 1,5; v/v) e as placas de separação foram avaliadas por densitometria. Neste estudo, diclofenaco foi usado com padrão interno. O método proposto apresentou valores de desvios padrão relativo (DPRs) menores que 0,75% ($n = 5$) e um tempo de aproximadamente 45 minutos foi requerido por análise. Os valores de limites de detecção (LDs) não foram informados pelo autor.

Chandratrey e Sharma, em 2009, propuseram o uso da espectrofotometria UV na determinação simultânea de NIM, PAR e tizanidina (TZN) em comprimidos [13]. Os estudos foram realizados utilizando dois métodos: método 1 baseado na espectrofotometria derivada e método 2 baseado na espectroscopia com multi-comprimentos de onda. A repetibilidade dos métodos apresentou DPRs menores que 0,4% ($n = 5$) e os LDs foram calculados em 0,13, 0,6 e 0,1 mg L⁻¹ (método 1) e em 0,06, 0,42 e 0,1 mg L⁻¹ (método 2) para PAR, NIM e TZN, respectivamente.

A técnica de espectrofotometria UV também foi empregada por Kirtawade *et al.*, em 2010, para determinação simultânea de NIM e PAR em amostras farmacêuticas (comprimidos) [2]. O tratamento das amostras consistia em simples dissolução em metanol e diluição em água. O método mostrou alta exatidão e precisão, com DPRs menores que 0,63% ($n = 6$). Os LDs foram calculados em 0,33 e 0,08 mg L⁻¹ para PAR e NIM, respectivamente.

HPLC também tem sido empregada na determinação de NIM e PAR usando coluna C₁₈ e detectores UV-VIS [14-18] ou espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) [14]. Nagoji *et al.*, em 2002, propôs um método empregando HPLC com detecção UV-VIS [17] para determinação de NIM e PAR em comprimidos.

Nesse estudo foi utilizado ibuprofeno como padrão interno. A fase móvel consistiu em uma mistura de acetonitrila e água (60:40; v/v) e o comprimento de onda do detector foi fixado em 230 nm. A frequência analítica foi de 4 injeções h⁻¹ (tempo de corrida de 15 min). Valores de DPRs e LDs não foram informados no trabalho.

Panusa *et al.*, em 2007, demonstrou a possibilidade de determinar sete fármacos, entre eles NIM e PAR, em preparações homeopáticas falsificadas, empregando HPLC com detecção UV-VIS e ESI-MS [14]. A fase móvel consistiu em uma mistura de acetonitrila (A) e água (B) com 0,1% de ácido acético (pH = 3,16). A razão da fase móvel foi de 15:85 (A:B; v/v) durante 3 minutos, em seguida foi levada para 30:70 (A:B; v/v) durante 7 minutos e, finalmente para 90:10 (A:B; v/v) durante 20 minutos. Na detecção por UV-VIS, o comprimento de onda foi mantido em 245 nm e por ESI-MS foi utilizado o modo de ionização negativo, com exceção do PAR que foi detectado no modo de ionização positivo. Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno e a repetibilidade apresentou DPRs menores que 1,6 e 8,0% (n = 6) utilizando detectores UV-VIS e ESI-MS, respectivamente. Os LDs foram calculados em 0,2 e 0,02 mg L⁻¹ (UV-VIS) e 0,008 e 0,02 mg L⁻¹ (ESI-MS) para NIM e PAR, respectivamente. A frequência analítica foi estimada em 2,0 injeções h⁻¹.

Battu, em 2009, também utilizou o método HPLC com detector UV-VIS para determinação simultânea de NIM e PAR em comprimidos [15]. As amostras foram analisadas utilizando como fase móvel acetonitrila:metanol:água (40:40:20; pH ajustado para 4,5 com ácido fosfórico) e o comprimento de onda do detector foi mantido em 276 nm. Os DPRs foram 0,80 e 0,60% para NIM e PAR, respectivamente, e a frequência analítica foi de aproximadamente 10 injeções h⁻¹. Os LDs foram 0,05 e 0,025 mg L⁻¹ para NIM e PAR, respectivamente.

Metanol e solução tampão acetato de amônio (80:20 v/v; pH ajustado para 7,0 com trietilamina) foi a fase móvel proposta por Gharge e Dhabale, em 2010, para a determinação de NIM e PAR utilizando HPLC com detector UV-VIS [18]. O comprimento de onda do detector foi mantido em 276 nm e a repetibilidade do método apresentou DPRs menores que 0,65% ($n = 6$). Os LDs foram calculados em $7,0 \times 10^{-4}$ e $1,1 \times 10^{-2}\%$ para PAR e NIM, respectivamente. A frequência analítica foi estimada em 10 injeções h^{-1} .

Estudos realizados por More *et al.*, em 2012, mostraram a aplicação de HPLC com detecção UV-VIS para a determinação simultânea de NIM, PAR e clorzoxazona (CHZ) em amostras farmacêuticas [16]. A fase móvel foi constituída por água: acetonitrila (55:45 v/v) e a detecção foi realizada a 275 nm. A repetibilidade do método proposto apresentou DPRs menores que 1,30% ($n = 6$) e a frequência analítica foi de aproximadamente 5 injeções h^{-1} . Os LDs encontrados foram de 1,08, 1,43 e 0,30 $mg L^{-1}$ para PAR, CHZ e NIM, respectivamente.

1.2.2. Prometazina (PRO) e codeína (COD)

A prometazina (PRO) ou N, N-dimetil-1-fenotiazin-10-il-propan-2-amina (Fig. 3) é um anti-histamínico com propriedades sedativas, anti-psicóticas, analgésicas e anticolinérgicas. No entanto, a PRO também pode causar efeitos adversos, tais como alterações endócrina, cardíaca e reprodutivas [19].

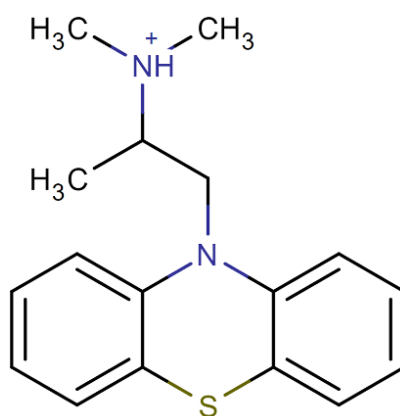


Figura 3. Fórmula molecular da PRO

A codeína (COD) ou 7,8-didehidro-4,5 α -epoxi-3-metoxi-17-metilmorfinan-6-ol (Fig. 4) é utilizada como um analgésico eficaz e também como um agente contra a tosse [20-22]. A sobredosagem com COD pode causar sérios efeitos adversos como diarreia, náuseas, vômitos, constipação, boca seca, coceira, confusão, sedação e depressão respiratória. Além disso, a COD pode ser utilizada como uma droga de abuso, mas muito menos frequente do que os outros opioides [23].

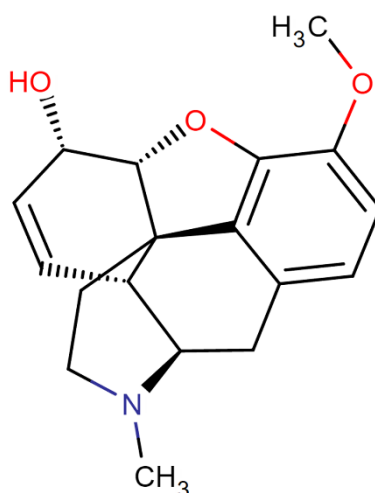


Figura 4. Fórmula molecular da COD

PRO e COD são encontrados comercialmente combinados na proporção de 1:1,6 (m/m) em formulações farmacêuticas (xaropes). A atividade sinérgica entre os dois

compostos é comumente usada no tratamento de resfriados ou de sintomas alérgicos, como corrimento nasal, espirros e tosse.

1.2.2.1. Metodologias disponíveis na literatura para determinação simultânea de PRO e COD

Existem alguns métodos analíticos na literatura que enfocam a determinação simultânea de PRO e COD, tais como eletroforese capilar de zona com detecção amperométrica [24], cromatografia eletrocínética micelar [25], cromatografia em camada delgada [26] e espectrometria UV [26].

Em 1975, Curea e Martinivici publicaram um trabalho [26] demonstrando o uso da cromatografia em camada delgada e da espectrofotometria UV-VIS para a determinação de PRO na presença de cafeína ou COD em medicamentos. Os autores usaram placas de vidro (15/20 cm) com sílica gel G (0,25 mm), um sistema de solventes de migração (hexano:dietilamina:etanol; 2,5:0,5:1,0 v/v) e reveladores químicos no estudo por cromatografia em camada delgada. Na aplicação do método espectrofotometria UV-VIS, 10 misturas binárias contendo PRO e COD (ou cafeína) foram previamente separadas dos excipientes por filtração e utilizando uma coluna de troca iônica (R-Cl). A absorbância foi medida com o espectrômetro em 275 e 252 nm. O método mostrou-se estável com DPRs menores que 2,25%.

O uso da eletroforese capilar de zona com detecção amperométrica foi proposto por Zhou *et al.*, em 2003, para a separação e determinação de efedrina (EFD), PRO e COD em xaropes [24]. A detecção foi realizada utilizando disco de carbono como eletrodo de trabalho (+1,0 V) empregando uma configuração do tipo wall-jet. Os três analitos foram separados em 16 min (3,7 injeções h⁻¹) e os LDs foram $1,2 \times 10^{-8}$, $5,0 \times 10^{-9}$ e

$4,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para EFD, PRO e COD, respectivamente. Estudos de repetibilidade do método proposto mostraram DPRs menores que 2,9% ($n = 5$).

Lijun *et al.*, em 2010, propôs o uso da cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) para determinação de PRO e COD em xaropes [25]. Os dois analitos foram separados em 8 minutos ($7,5 \text{ injeções h}^{-1}$) com DPRs menores que 4,6%. Os LDs foram 0,16 e $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ para PRO e COD, respectivamente.

1.2.3. Amilorida (AMD) e furosemida (FMD)

A amilorida (AMD), ou N-amino-3,5-diamino-6-cloropirazino-2-carboxamida (Fig. 5A), e a furosemida (FMD), ou 4-cloro-2- (amino-furan-2-ilmetil) -5-sulfamoilbenzoico (Fig. 5B), são diuréticos utilizados em indicações terapêuticas, tais como hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e cirrose hepática [27]. Estas espécies estão incluídas, pelo Comitê Olímpico Internacional, na lista de drogas proibidas [28] uma vez que podem ser usadas para mascarar o uso de outras substâncias dopantes.

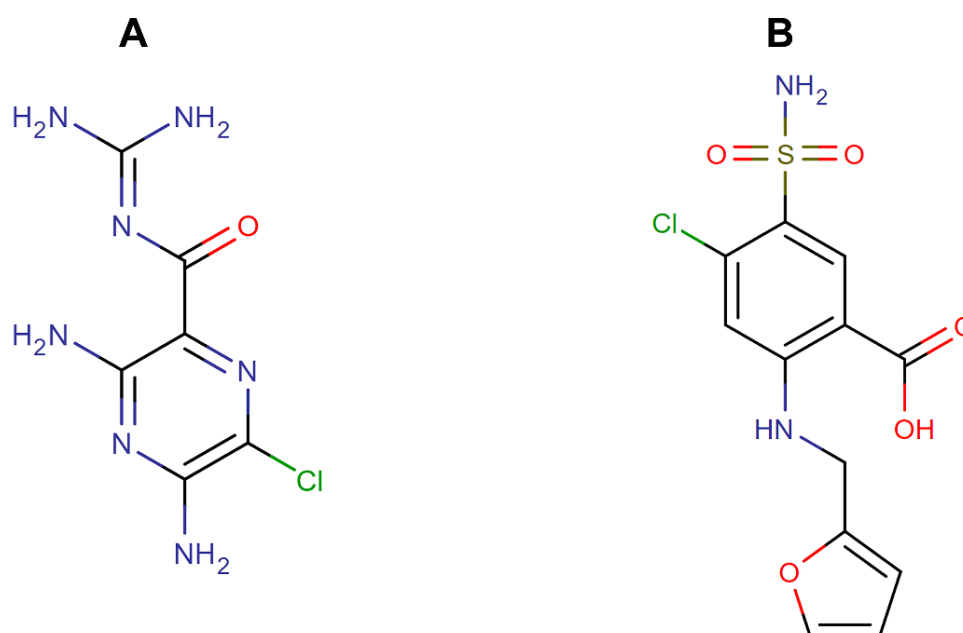


Figura 5. Fórmula molecular da AMD (A) e da FMD (B)

A AMD atua sobre o tubo distal e promove o bloqueio da absorção de íons sódio e a excreção de íons potássio, interferindo no processo de troca catiônica [29]. A FMD tem um potencial diurético muito mais forte do que os diuréticos comuns [29]. Ela atua inibindo o co-transporte de sódio, potássio e cloreto, além de provocar uma perda excessiva de íons cálcio, magnésio, bicarbonato e, principalmente, potássio, causando, assim, a hipocalcemia [27]. Baixos níveis de potássio no plasma pode causar atividade ectópica ventricular, fibrilação ventricular e morte súbita [30].

AMD e FMD podem ser encontradas em formulações farmacêuticas combinadas na proporção de 1:4 (m/m). Essa combinação proporciona um equilíbrio diurético, reduzindo a perda de potássio e evitando possíveis distúrbios gastrointestinais associados com suplementação de potássio [31]. Além disso, o tratamento em longo prazo torna-se mais eficaz, uma vez que a FMD tem uma absorção rápida [32-36] e a AMD promove uma maior duração dos efeitos terapêuticos [33, 37-39].

1.2.3.1. Metodologias disponíveis na literatura para determinação simultânea de AMD e FMD

Na literatura estão disponíveis um grande número de métodos analíticos que centram na determinação simultânea de AMD e FMD, incluindo espectrofotometria de primeira derivada [29] e de mínimos quadrados parciais (PLS-1) [40], HPLC com detecção por fluorescência [30, 31] ou UV-VIS [31, 41-43], eletroforese e isotacoforese capilar [44, 45], espectrofluorimetria [27, 28] e cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa por impacto de elétrons [46].

O uso da espectrofotometria primeira derivada foi proposto por Toral *et al.*, em 2002, para a determinação simultânea de AMD e FMD em formulações farmacêuticas [29]. Nesse estudo houve a necessidade de etapa de pré-tratamento das amostras (extração em

0,01 mol L⁻¹ de HCl preparado em etanol). Os comprimentos de onda selecionados para determinação de FMD e AMD foram 241,4 e 343,6 nm, respectivamente. Os DPRs (repetibilidade) foram menores que 1,3% (n = 8) e os LDs foram $2,1 \times 10^{-8}$ e $2,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para AMD e FMD, respectivamente.

Um método numérico, baseado na utilização de dados espectrofotométricos acoplados a calibração multivariada PLS-1, foi relatado por Ferraro *et al.*, em 2001, para a determinação simultânea AMD e FMD em amostras sintéticas e comprimidos comerciais [40]. Os espectros de absorção eletrônica de 16 amostras de calibração de FMD e AMD foram registrados em duplicata na faixa de 250-350 nm e submetidos à modelagem PLS-1. A média dos dados foi utilizada e os modelos foram validados empregando o procedimento “*leave-one-out*”. O método proposto mostrou-se preciso com valores de DPRs menores que 1,4% (n = 12) e os LDs foram 0,062 e 0,022 mg L⁻¹ para FMD e AMD, respectivamente.

O emprego de HPLC também foi demonstrado na determinação de AMD e FMD utilizando detectores de fluorescência ou UV-VIS. Reeuwijk *et al.*, em 1992, utilizou a técnica HPLC com detecção por fluorescência para determinação simultânea de AMD e FMD em amostras de plasma [30]. O sistema foi baseado na cromatografia de par iônico de fase reversa empregando dodecil sulfato de sódio (SDS) como agente de pareamento de íons. A fase móvel foi constituída por acetonitrila: SDS: ácido perclórico (pH = 2,0; 235:35:665; m/m) e os comprimentos de onda do detector foram 360 nm (excitação) e 413 nm (emissão). Os LDs foram 100 e 7,5 ng L⁻¹ para FMD e AMD, respectivamente. Os valores dos DPRs (n = 3) calculados foram menores que 4,1%.

Jankowski *et al.*, em 1997, propôs o uso de HPLC para a determinação de AMD e FMD em sangue [31]. As drogas foram extraídas do plasma humano com acetato de etila (FMD foi extraída a pH = 1 e AMD a pH = 12). FMD foi detectada usando um detector

UV-VIS, ao passo que AMD, devido à sua faixa terapêutica muito baixa, foi detectada com um detector de fluorescência. O estudo de repetibilidade apresentou valores de DPRs menores que 11% e os LDs foram de $2,5 \times 10^{-4}$ e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ para AMD e FMD, respectivamente. A frequência analítica foi estimada em 5 injeções h^{-1} .

Outro estudo baseado no uso de HPLC para determinação de AMD e FMD em plasma humano foi proposto por Amin *et al.*, em 2010 [41]. A fase móvel foi constituída por metanol:ácido acético glacial 0,1% (43:57, v/v) e a detecção foi realizada usando um detector UV-VIS a 226 nm. O tempo de corrida foi de aproximadamente 11 minutos (5,5 injeções h^{-1}), os valores dos DPRs foram menores que 15% ($n = 5$) e os LDs foram $0,05$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ para AMD e FMD, respectivamente.

Kachare e Mohite desenvolveram, em 2013, um método baseado em HPLC com detecção UV-VIS para determinação simultânea de AMD e FMD em formulações farmacêuticas [42]. A determinação foi realizada usando uma fase móvel composta por $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de dihidrogeno fosfato de potássio:acetonitrila (60:40 v/v, pH 3,5) e o comprimento de onda do detector foi mantido em 283 nm. A frequência analítica foi estimada em 5 injeções h^{-1} , os valores de DPRs foram menores que 2,0% e os LDs foram $1,2 \times 10^{-3}$ e $5,3 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ para AMD e FMD, respectivamente.

Recentemente, um novo método para estimar AMD e FMD em formulações farmacêuticas por cromatografia de injeção sequencial (SIC) foi descrito por Idris e Elgorashe [43]. O método foi baseado em cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC) com uma fase móvel constituída por 25 mmol L^{-1} de solução tampão fosfato (pH = 4,0):acetonitrila (65:35, v/v) e o comprimento de onda do detector UV foi mantido em 283 nm. O volume consumido de fase móvel por análise foi de 3,25 mL e a frequência analítica foi de 24 amostras h^{-1} . Os valores de DPRs foram menores que 2,2% e os LDs foram $0,28$ e $0,23 \text{ mg L}^{-1}$ para FMD e AMD, respectivamente.

O uso da isotacoforese capilar para determinação de algumas drogas cardiovasculares, dentre elas AMD e FMD, em soro e urina foi proposto por Sádecká e Polonský, em 1996 [44]. A AMD foi separada como cátion e a FMD como ânion. A frequência analítica foi de aproximadamente 2,4 injeções h⁻¹ e a repetibilidade do método apresentou DPRs menores que 2,9 %. Os LDs foram calculados em 43 e 46 ng mL⁻¹, para AMD e FMD, respectivamente.

Xu *et al.*, em 2013, estudou o uso da eletroforese capilar para determinação de AMD e FMD em comprimidos [45]. Foi utilizado um detector UV e o comprimento de onda do detector foi mantido em 223 nm. As análises foram realizadas em menos de 5 minutos (12 injeções h⁻¹), com LDs de 0,31 e 0,66 mg L⁻¹ para AMD e FMD, respectivamente. O método apresentou valores de DPRs menores que 2,2%.

Peralta *et al.*, em artigos publicados em 2010 [28] e 2011 [27] propuseram a determinação fluorimétrica de AMD e FMD em amostras farmacêuticas e urina. A análise foi possível mediante separação prévia por extração em fase sólida utilizando uma membrana de nylon. A determinação fluorimétrica, em ambos os estudos, foi realizada empregando os seguintes comprimentos de onda: $\lambda_{\text{ex}} = 237 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 415 \text{ nm}$, para FMD e $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 406 \text{ nm}$, para AMD. Para as amostras farmacêuticas, a repetibilidade apresentou DPRs menores que 1,5 % (n = 6) e os LDs foram $9,6 \times 10^{-5}$ e $4,0 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$ para AMD e FMD, respectivamente. Para as amostras de urina, os DPRs foram menores que 5,2 % (n = 6) e os LDs foram $1,1 \times 10^{-4}$ e $3,5 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$ para AMD e FMD, respectivamente.

Um método baseado em cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massas foi descrito por Morra *et al.*, em 2006, para determinação de diuréticos e agentes mascarantes em amostras de urina [46]. Nesse estudo, 16 diuréticos, entre eles AMD e FMD, foram analisados empregando as seguintes etapas: (1) extração líquido/líquido dos

analitos a partir da matriz; (2) reação com iodeto de metila a 70 °C durante 2 horas – formação de derivados metila; (3) análise da mistura resultante por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/EI-MS). O tempo de análise foi de aproximadamente 4 minutos (15 injeções h⁻¹), com LDs de 2,8 e 1,1 × 10⁻³ mg L⁻¹ para AMD e FMD, respectivamente. Os DPRs foram menores que 9,6 %.

1.2.4. Sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP) e fenazopiridina (FZP)

O sulfametoxazol (SMX), ou 4-amino-N-(5-metilisoxazol-3-il)-benzenosulfonamida (Fig. 6), é um antibiótico sintético derivado do ácido sulfanílico que atua como um bacteriostático e tem sido utilizado no tratamento de infecções bacterianas, incluindo infecções no trato urinário, pneumonia, bronquite crônica, meningite meningocócica e toxoplasmose [47-49].

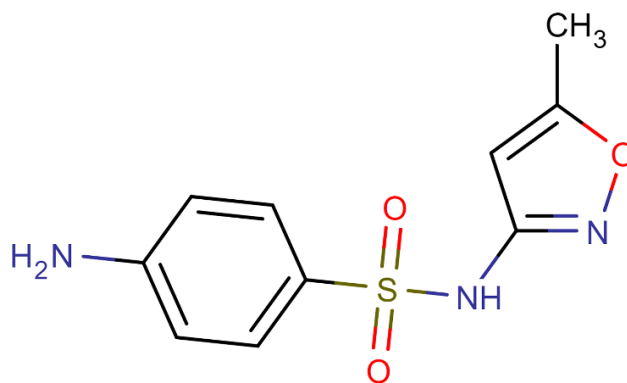


Figura 6. Fórmula molecular do SMX

A trimetoprima (TMP) ou 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidinodiamina (Fig. 7) é uma droga antibacteriana, derivada das diaminopiridinas e pertencente à classe de agentes quimioterapêuticos conhecidos como inibidores de dihidrofolato redutase. É comumente utilizada no tratamento profilático de infecções urinárias, intestinais e respiratórias [50, 51].

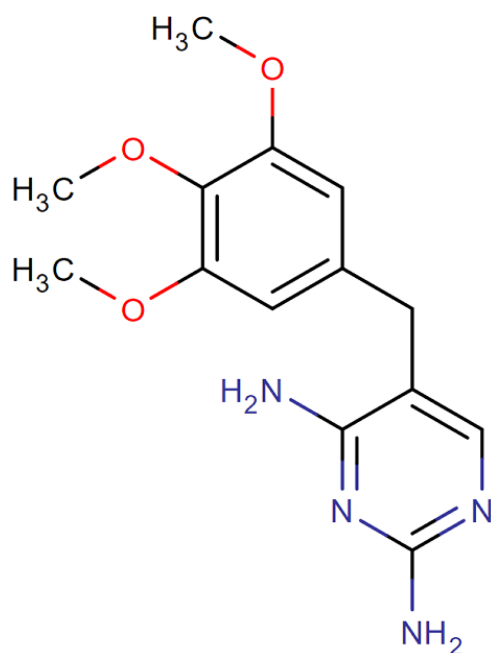


Figura 7. Fórmula molecular da TMP

A fenazopiridina (FZP) ou 2,6-piridinodiamina-3-fenilazo monohidrocloreto (Fig. 8.) é um azo composto heterocíclico aromático com características analgésicas. É geralmente utilizada para reduzir desconfortos relacionados a infecções do trato urinário (uretrite, prostatite, cistite, etc.) ou irritações causadas por infecções, traumas, cirurgias, procedimentos endoscópicos ou a passagem de sondas ou cateteres [52-59].

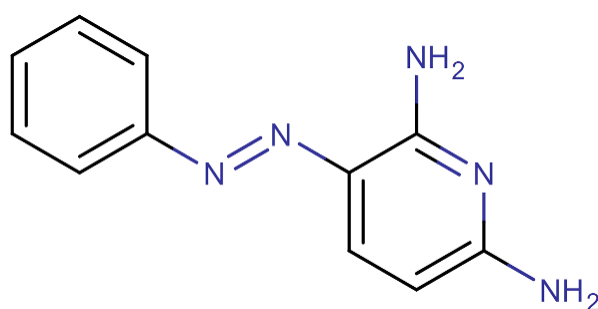


Figura 8. Fórmula molecular da FZP

A FZP é frequentemente usada em formulações farmacêuticas combinada com SMX e TMP, a uma razão em massa de 8:1,6:1 (SMX:TMP:FZP, respectivamente), para o

tratamento de infecções do trato urinário seguidas de dor [53, 59]. A presença de SMX e TMP em medicamentos produz uma atividade antibacteriana sinérgica, devido ao bloqueio do metabolismo do ácido fólico, que provoca uma diminuição da síntese de proteínas por bactérias [47, 60]. A presença adicional da FZP provoca um efeito anestésico local proporcionando alívio da dor durante o tratamento [61].

1.2.4.1. Metodologias disponíveis na literatura para determinação simultânea de SMX, TMP e FZP

De acordo com a literatura, existem apenas dois trabalhos que descrevem métodos analíticos para a determinação simultânea de SMX, TMP e FZP. Um é baseado em calibração espectrofotométrica multivariada com o uso da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS-1) [62] e outro na espectrofotometria de terceira derivada [63].

A análise simultânea de TMP, SMX e FZP medicamentos baseado no uso da espectrofotometria de terceira derivada foi proposto por Abdelhay e Elwalily, em 1993 [63]. O método consistiu na extração dos compostos em 0,1 mol L⁻¹ de ácido clorídrico, filtração e medição das amplitudes do espectro da derivada terceira em 242, 276 e 450 nm para determinação de TMP, SMX e FZP, respectivamente. Os valores de DPRs calculados foram menores que 1,72%, indicando boa precisão e reprodutibilidade do método proposto.

O uso da calibração espectrofotométrica multivariada foi descrita por Ribone *et al.*, em 1999, para a análise de comprimidos contendo os antibióticos SMX e TMP, e a combinação dessas duas drogas com o analgésico FZP [62]. Os analitos foram analisados sem separação prévia, derivatização ou utilização de solventes não aquosos e os estudos foram baseados no uso do método numérico de regressão por mínimos quadrados parciais

(PLS-1) dos dados espectrais de absorção eletrônica. O método apresentou DPRs menores que 1,90%.

1.3. Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

O eletrodo de diamante dopado com boro (BDD, do inglês “*boron doped diamond*”) tem sido usado com frequência em diversas determinações, tais como: princípios ativos em medicamentos [64-68], metais [69-71], antioxidantes [72], bases nitrogenadas do DNA [73, 74], corantes [75, 76], pesticidas [77-80], carboidratos [81], entre outros [82-85]. Trata-se de um material a base de carbono com elevados graus de densidade atômica, dureza e resistência mecânica.

Como descrito na literatura [86], os estudos eletroquímicos do diamante começaram relativamente tarde (cerca de 30 anos atrás), ao contrário de outros materiais a base de carbono como grafite, carbono vítreo, grafite pirolítico, etc. Sua utilização não despertava interesse pelo fato de ser um isolante e, além disso, sua preparação requeria temperatura e pressão muito elevadas (difícil acesso).

A deposição química a partir da fase vapor (CVD, do inglês “*chemical vapor deposition*”) e o crescimento a alta-pressão/alta-temperatura (HPHT, do inglês “*high-pressure/high-temperature*”) são os dois métodos mais utilizados para a produção de diamante [87]. O uso do método CVD foi descrito primeiramente por William Eversole, da Union Carbide, em 1952, e o processo HPHT foi desenvolvido pela General Electric a partir de 1955 [88]. A deposição era baseada no crescimento de grãos sobre grãos pré-existent de diamante, ou a partir de outro material à base de carbono [88].

O interesse no uso do diamante em eletroquímica aumentou com o desenvolvimento e melhoramento das técnicas de crescimento, que passaram então a produzir filmes de diamante sobre os mais variados tipos de substratos, tais como molibdênio, tungstênio, quartzo, silício, titânio, grafite, carbono vítreo, irídio e nióbio [89-91].

O diamante puro não é um material eletródico, devido as suas características isolantes (band-gap com mais de 5 eV) e alta resistividade (na ordem de $10^{16} \Omega \text{ cm}$). No entanto, este material pode adquirir características de um condutor quando é devidamente dopado, tornando-se um material promissor para ser empregado como eletrodo [92]. O boro é o dopante mais utilizado para produzir eletrodos de diamante, resultando em um semicondutor do tipo p [93], devido ao fato de possuir baixa energia de ativação como transportador de carga (0,37 eV).

CVD é o método mais utilizado para a obtenção do BDD [94] e é baseado no uso de uma fonte de gás rico em carbono (metano diluído em hidrogênio ou outras substâncias orgânicas, utilizadas juntamente com o metano, tais como metanol, acetona e etanol), a qual é ativada por reatores (plasma de micro-ondas, por exemplo), produzindo uma fina camada do filme de diamante disposta na superfície de um substrato condutor [86, 87, 95]. O boro age como um dopante mais efetivo quando incorporado durante a deposição da fase gasosa, no processo CVD, do que quando inserido no filme já crescido pelo processo de implantação iônica. Para introduzir boro no filme de diamante durante o crescimento, um reagente contendo boro, como diborano (B_2H_6), trimetilborato ($\text{C}_3\text{H}_9\text{BO}_3$) ou óxido de boro (B_2O_3), deve ser adicionado à fonte de gás de deposição [93].

As propriedades dos filmes de diamante variam de acordo com a concentração de boro, que deve ser no mínimo $1 \times 10^{19} \text{ átomos cm}^{-3}$. À medida que a concentração de boro aumenta, a resistividade do filme de diamante diminui, podendo variar de $10^4 \Omega \text{ cm}$ (para

uma concentração de boro próxima a 10^{19} átomos cm^{-3}) até décimos de $\Omega \text{ cm}$ (para uma concentração de boro próxima a 10^{21} átomos cm^{-3}) [95].

O eletrodo BDD apresenta diversas características que o difere de outros eletrodos à base de carbono, tais como: pequena e estável corrente de fundo ao longo de um amplo intervalo de potencial, ampla faixa de potencial de trabalho em meio aquoso, cinética relativamente rápida de transferência de elétrons para vários sistemas redox sem pré-tratamento convencional (polimento), alta sensibilidade, baixa adsorção molecular, estabilidade morfológica e microestrutural a altas temperaturas, resistência à corrosão e transparência óptica em regiões do UV/VIS e IV [96-105].

Os filmes de diamante recém preparados possuem terminações superficiais em hidrogênio [93, 106, 107] devido a uma atmosfera contendo hidrogênio durante o processo de produção. Essa superfície terminada em hidrogênio (apolar) proporciona ao eletrodo um caráter hidrofóbico [93, 106-108] e um potencial de banda plana quase independente do pH [109].

Pleskov *et al.*, em 1987, descreveu pela primeira vez o comportamento fotoeletroquímico de filmes de diamante [110]. Nesse trabalho foi possível observar que as propriedades superficiais dos filmes de diamante podem ser sensivelmente alteradas via pré-tratamento superficial. Após esse estudo, o comportamento eletroquímico do eletrodo BDD em função de alterações impostas à sua superfície, via tratamentos anódicos e catódicos [98, 107, 111-118], vem sendo bastante estudado.

Superfícies terminadas em hidrogênio são alteradas para oxigênio durante uma oxidação anódica. Os tratamentos anódicos aumentam a relação O/C na superfície do filme, tornando a cinética de transferência de carga de alguns pares redox mais lenta, como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e $[\text{IrCl}_6]^{2-/3-}$ [87]. Eletrodo de BDD com terminação em oxigênio

apresenta um caráter hidrofílico [107, 119] e um potencial de banda plana altamente dependente do pH [109]. A superfície do filme de diamante pode ser novamente modificada para terminação em hidrogênio via tratamento catódico (procedimento eletroquímico) [120].

A resposta eletroquímica do eletrodo de BDD é dependente do pré-tratamento realizado em sua superfície. O pré-tratamento anódico foi o mais utilizado até o ano de 2004 (método padrão) [121, 122], porém, em alguns trabalhos publicados posteriormente [96, 123] foi relatado que o pré-tratamento catódico melhora significativamente a reprodutibilidade, reversibilidade e o valor da constante de transferência de carga para alguns pares redox. Sendo assim, a escolha do pré-tratamento a ser utilizado dependerá do tipo de analito estudado.

1.4. Análise por injeção em batelada (BIA)

A análise por injeção em batelada (BIA, do inglês “*Batch Injection Analysis*”) é um procedimento de análise introduzido no início da década de 90 [124] como uma alternativa para a realização de análises simples e rápidas. Essa técnica envolve a injeção de uma alíquota de amostra ou solução padrão (comumente um volume próximo a 100 μL), com o auxílio de uma micropipeta (geralmente eletrônica), diretamente na superfície de um eletrodo de trabalho (configuração do tipo wall-jet) imerso em um grande volume de solução inerte (detecção eletroquímica). A injeção da espécie de interesse sobre a superfície do eletrodo resulta em sinais transientes semelhantes aos obtidos em sistemas FIA (Análise por Injeção em Fluxo).

Os conceitos de um sistema BIA com detecção eletroquímica podem ser explicados usando as etapas apresentadas na Figura 9.

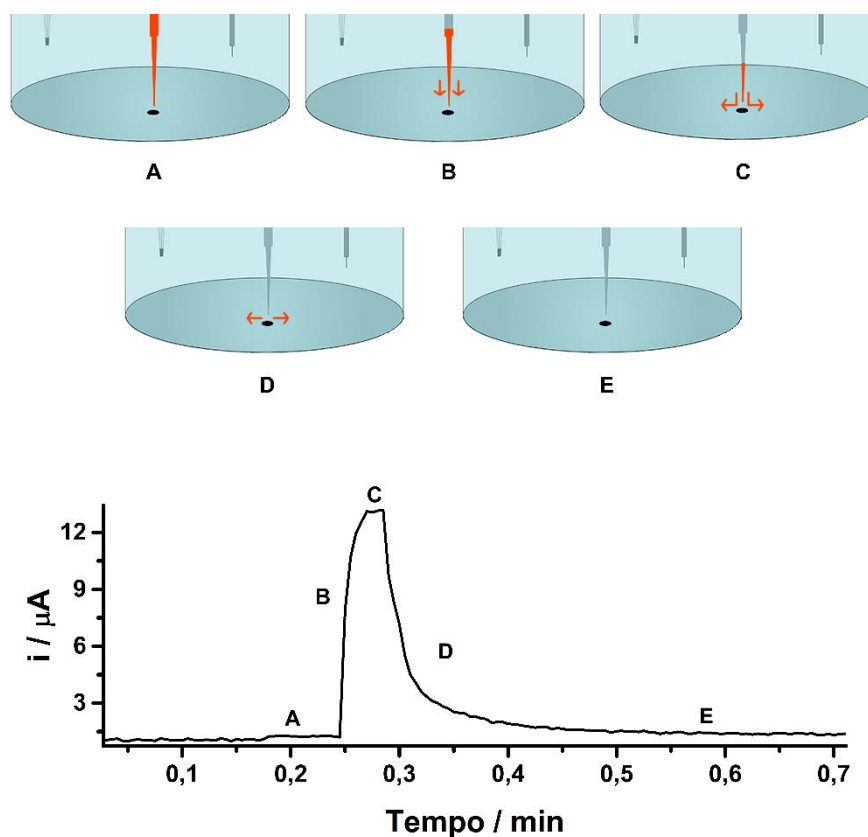


Figura 9. Etapas de operação de um sistema BIA com detecção eletroquímica e respectivo pico transiente obtido. (A) antes da injeção; (B) durante a injeção; (C) final da injeção; (D) dispersão e (E) equilíbrio final.

Antes da injeção da amostra, há a presença de uma corrente residual gerada a partir do eletrólito inerte (Fig. 9A), indicando que não existe reação de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução. Quando uma alíquota de amostra ou solução padrão (normalmente diluída em eletrólito de suporte) é injetada sobre a superfície do eletrodo de trabalho (Fig. 9B), ocorre um rápido aumento da corrente até chegar em um valor máximo, devido ao processo redox do analito de interesse (Fig. 9C). A intensidade desse sinal é proporcional à concentração do analito na amostra (quando na faixa linear de resposta). Em seguida, ocorre uma queda do sinal em direção à linha base, atingindo o equilíbrio existente antes da injeção (corrente residual; Fig. 9E), resultando em um pico de resposta transiente em virtude do efeito da dispersão e da configuração do tipo “wall-

jet” [125]. O retorno da corrente à linha base pode ser acelerada através de uso de agitação mecânica da solução presente no interior da célula [126].

Na operação de um sistema BIA (especialmente com detecção eletroquímica), o volume e velocidade de injeção são procedimentos manuais e necessitam ser reprodutíveis. Neste caso, o uso de pipetas eletrônicas, com dispersão programável [127], para a injeção das soluções no sistema BIA permite que esta operação seja altamente reprodutível. Tais pipetas podem ser substituídas por seringas de insulina descartáveis ou pipetas manuais, como descrito por Gimenes et. al., em 2012 [128]. Nesse caso, é necessário utilizar um padrão interno adequado para corrigir possíveis erros causados por variações no sistema de injeção.

A técnica BIA apresenta diversas vantagens em comparação com outras técnicas analíticas, como: o uso de instrumentação (aquisição e manutenção) de baixo custo, baixo consumo de reagentes e amostras, geração mínima de resíduos, elevada frequência analítica, simplicidade e boa repetibilidade. Quando o sistema BIA é combinado com detecção eletroquímica (amperometria, potenciometria ou voltametria), vantagens adicionais podem ser obtidas na seletividade, sensibilidade, não necessidade de utilização de reagentes de alta pureza e facilidade de uso em laboratórios com infraestrutura mínima ou em análises em campo [129]. Por outro lado, o sistema BIA apresenta limitações em relação à automação e procedimentos de derivatização (diluição ou reação em linha), quando comparado com sistemas FIA. Essas limitações, no entanto, não são consideradas desvantagens e sim, características da técnica.

1.5. BIA com detecção amperométrica (BIA-MPA)

Diferentes detectores já foram acoplados a sistemas BIA, tais como espectrofotométricos [130], fluorimétricos [131], amperométricos [132, 133], potenciométricos [134] e voltamétricos [135]. Entre estes, os detectores amperométricos são os mais frequentemente empregados e diferentes tipos de materiais como eletrodos de trabalho têm sido propostos [136-138].

Um sensor amperométrico pode ser considerado um sensor voltamétrico para um determinado potencial aplicado fixo [139], ou seja, o eletrodo de trabalho é mantido num potencial constante em função do tempo (amperometria convencional), no qual ocorre a oxidação ou redução eletroquímica de compostos eletroativos na interface eletrodo/solução.

A amperometria convencional apresenta elevada sensibilidade, pois permite a aquisição de correntes muito baixas (e, portanto, a detecção de baixas concentrações) devido a quase total ausência de corrente capacitiva. No entanto, alguns subprodutos e/ou impurezas podem adsorver na superfície do eletrodo de trabalho durante a análise, causando sua gradativa contaminação (diminuição da área do eletrodo) e comprometendo, assim, a repetibilidade do sinal analítico.

Uma alternativa para contornar tais problemas de contaminação é usar a amperometria no modo pulsado. Existem diferentes formas de implementar a amperometria pulsada, sendo que as mais comuns são conhecidas como detecção amperométrica pulsada (PAD, do inglês “*Pulsed Amperometric Detection*”) e amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês “*Multiple Pulse Amperometry*”). As técnicas amperométricas pulsadas contornam de forma simples a limitação da detecção amperométrica convencional em relação à estabilidade do sinal eletroquímico. A limpeza

eletroquímica do eletrodo pode ser realizada periodicamente durante a análise com a aplicação (de forma alternada e cíclica) de pulsos de potenciais em função do tempo com o objetivo de limpeza ou condicionamento constante do eletrodo, evitando ou diminuindo a contaminação da superfície do eletrodo. O número de pulsos de potenciais aplicáveis na PAD varia entre 2 a 6, porém, a aquisição da corrente é normalmente restrita a um único pulso de potencial. Uma alternativa a técnica PAD é a MPA, a qual permite a aplicação de até 10 pulsos de potenciais com a possibilidade de aquisição de corrente em função do tempo em cada um dos pulsos de potenciais (obtenção simultânea de até 10 amperogramas) [140].

Em 2011, Silva e colaboradores [141], demonstraram que o acoplamento de células de análise por injeção em batelada com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (BIA-MPA) possibilita a determinação simultânea de dois compostos. O objetivo foi atingido mediante a injeção de uma única alíquota de amostra e utilizando um único eletrodo de trabalho.

A estratégia usada neste trabalho foi a aplicação de dois pulsos de potenciais. Um dos compostos (A) foi seletivamente detectado em um pulso de potencial e ambos os compostos (A + B) em um segundo pulso de potencial. O acesso a corrente proveniente do composto (B) foi obtida mediante subtração entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais e com auxílio de um fator de correção (FC). A utilização do FC foi descrita primeiramente por Silva e colaboradores, em 2011 [142] em um trabalho usando análise por injeção em fluxo (FIA). Nesse trabalho foi proposto um método para a determinação simultânea de paracetamol (PAR) e cafeína (CAF) usando FIA-MPA. O PAR foi oxidado seletivamente (sem interferência da CAF) no pulso de potencial +1,20 V/50 ms e os dois compostos (PAR + CAF) foram simultaneamente oxidadas no pulso de potencial +1,55/50 ms. A corrente proveniente apenas da oxidação da CAF em

+1,55V foi obtida com auxílio da seguinte equação: $i_{CAF} = i_{+1,55\text{ V}} - (FC \times i_{+1,20\text{ V}})$. A utilização do FC foi necessário devido diferença na intensidade das correntes de oxidação do PAR em +1,55 V e +1,20 V e, então, uma simples subtração entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais não dava acesso a corrente de oxidação proveniente somente da CAF.

Vários pares de analitos foram quantificados simultaneamente utilizando o sistema BIA-MPA, como paracetamol e cafeína [141], dipirona e cafeína [141], terc-butil-hidroquinona e hidroxianisol butilado [141, 143] e codeína e diclofenaco [144]. Sistemas FIA-MPA também tem sido usados na análise de misturas contendo dois compostos, como carboidratos (glicose e frutose) [145], produtos farmacêuticos, como paracetamol e ácido ascórbico [146], dipirona e paracetamol [147], paracetamol e tramadol [148], hidroclorotiazida e enalapril [149], antioxidantes fenólicos, como hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado [150] e corantes sintéticos, como tartrazina e amarelo crepúsculo [76].

Recentemente, Freitas e colaboradores demonstraram pela primeira vez a possibilidade de determinação simultânea de três compostos (8-cloroteofilina, piridoxina e difenidramina) por BIA-MPA [151]. Nesse trabalho, uma sequência de três pulsos de potenciais (+1,25 V, +1,60 V e +1,80 V) foi aplicada com a aquisição de três amperogramas separados. A 8-cloroteofilina foi seletivamente detectada em +1,25 V, 8-cloroteofilina e piridoxina foram detectadas simultaneamente em +1,60 V e as três espécies foram detectadas em +1,80 V. A subtração entre as correntes detectadas nos três amperogramas (com a ajuda de FCs) foi utilizada para a determinação seletiva de piridoxina e difenidramina em +1,60 V e +1,80 V, respectivamente. A possibilidade de determinação simultânea de três espécies (cafeína, ibuprofeno e paracetamol empregando FIA-MPA também já foi demonstrada [152].

Geralmente, em sistemas BIA com detecção eletroquímica, a distância ideal recomendada entre eletrodo de trabalho e a ponteira da micropipeta é de aproximadamente 2 mm, como descrito por Brett *et. al.*, em 1992 [133]. Para distâncias menores que 2 mm, a corrente tende a ser menor. Com o aumento na distância, a corrente tende a aumentar atingindo seu máximo em aproximadamente 2 a 3 mm. Acima deste valor, o sinal de corrente volta a diminuir. Isso ocorre porque no emprego de distâncias muito pequenas entre a ponteira da micropipeta e a superfície do eletrodo, os efeitos de retorno (fluxo reverso) são grandes e o perfil wall-jet não é seguido. Em distâncias maiores ocorre um aumento da dispersão da amostra antes do seu contato com o eletrodo de trabalho.

Dois parâmetros principais devem ser considerados no desempenho de sistemas BIA: o volume e a velocidade de injeção. Tais parâmetros refletem diretamente na sensibilidade do método e no número de vezes de amostragem de corrente por pico e, consequentemente, na repetibilidade do sinal analítico. A Figura 10 representa a influência do volume injetado na resposta obtida com o sistema BIA com detecção amperométrica.

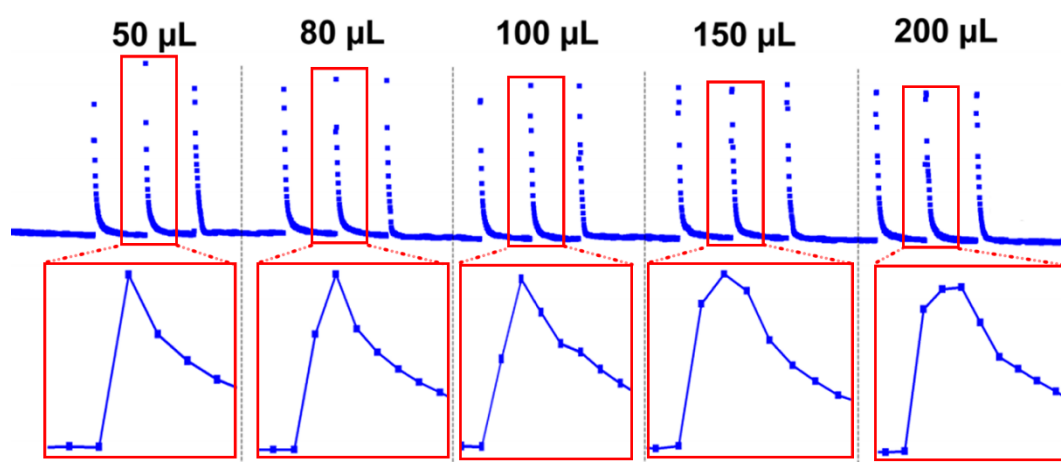


Figura 10. Efeito do volume injetado na corrente detectada no sistema BIA com detecção amperométrica. Velocidade de injeção: $113 \mu\text{L s}^{-1}$ [153].

De acordo com a literatura, um volume de injeção de 100 μL é geralmente suficiente para se conseguir a melhor sensibilidade em sistemas BIA [154]. No entanto, como pode ser observado na Figura 10, nos volumes de injeção de 150 e 200 μL , a corrente é amostrada mais vezes na região de corrente máxima de cada pico (sinal transiente) e uma melhor repetibilidade pode ser obtida. É importante que no ápice de cada pico ocorram pelo menos duas ou mais amostragens de corrente, pois na construção das curvas de calibração, a informação comumente utilizada é a altura dos picos. Nesse caso, o volume de 150 μL é suficiente e apropriado para a obtenção da melhor sensibilidade (altura máxima) e boa repetibilidade (duas ou mais amostragens de corrente na região de máximo de cada pico). Quando a detecção MPA é usada, o número de amostragens de corrente por pico em cada amperograma é um parâmetro que necessita ser observado com maior cuidado, pois o número de amostragens de corrente tende a diminuir com o aumento do número de pulsos de potenciais aplicados.

Os efeitos da velocidade de injeção sobre a resposta do sistema BIA podem ser observados na Figura 11.

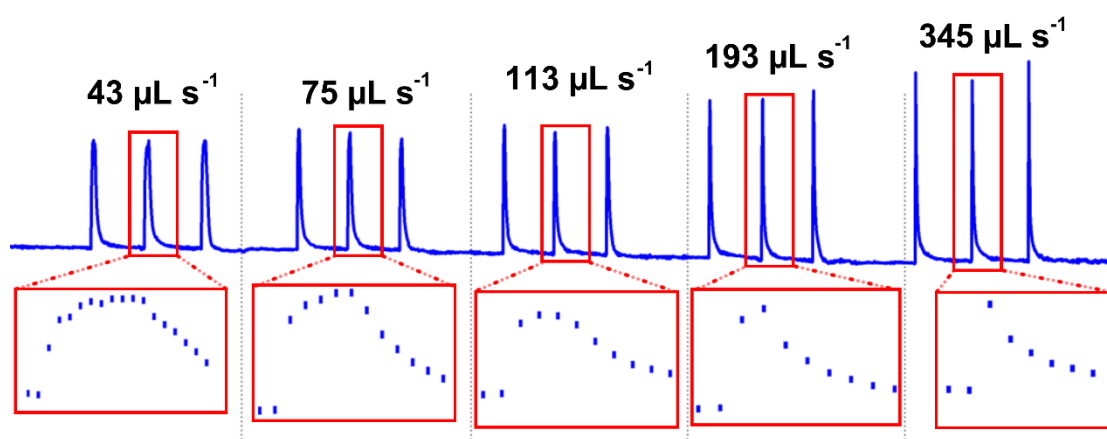


Figura 11. Efeito da velocidade de injeção na corrente detectada no sistema BIA com detecção amperométrica. Volume de injeção: 150 μL [153].

A sensibilidade aumenta com o aumento da velocidade de injeção. Isto ocorre devido ao aumento na taxa de transporte de massa para a superfície do eletrodo de trabalho. No entanto, os pontos de aquisição de corrente no ápice de cada pico diminuem com o aumento da velocidade de injeção e, conseqüentemente, a repetibilidade do sinal detectado também diminui.

A velocidade e o volume de injeção são parâmetros dependentes. Caso o volume de injeção seja muito pequeno, ou a velocidade de injeção seja muito grande, a aquisição de corrente pode ser comprometida (número de aquisição insuficiente), e conseqüentemente, a repetibilidade do método pode ser prejudicada. Desta forma, na opção pelo volume e velocidade de injeção, o número de vezes que a corrente é adquirida deve ser considerado.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

Desenvolver novos procedimentos usando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica e diamante dopado com boro (BDD) como eletrodo de trabalho para a determinação simultânea de princípios ativos presentes em formulações farmacêuticas comerciais: **(1)** nimesulida (NIM) e paracetamol (PAR), **(2)** codeína (COD) e prometazina (PRO), **(3)** amilorida (AMD) e furosemida (FMD) e **(4)** sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP) e fenazopiridina (FZP).

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e amostras

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico (PA). A Tabela 1 lista todos os reagentes utilizados nesse estudo com sua respectiva procedência.

Tabela 1. Lista de reagentes utilizados nos trabalhos com suas procedências.

Reagente	Empresa	Pureza (%)
Cloreto de prometazina (PRO)	Henrifarma	PA
Fosfato de codeína (COD)	Galena	PA
Nimesulida (NIM)	All Chemistry	PA
Paracetamol (PAR)	Synth	PA
Sulfametoxazol (SMX)	Sigma-Aldrich	PA
Trimetoprina (TMP)	Sigma-Aldrich	PA
Cloreto de fenazopiridina (FZP)	Alfa Aesar	98,0
Cloreto de amilorida (AMD)	DEG	PA
Furosemida (FMD)	Henrifarma	PA
Ácido acético (HAc)	Vetec	PA
Ácido sulfúrico	Vetec	PA
Acetonitrila (ACN)	Vetec	PA-ACS
Etanol (EtOH)	Vetec	PA-ACS
Metanol (MetOH)	Vetec	PA-ACS
Ácido fosfórico	Impex	PA
Ácido bórico	Sigma-Aldrich	99,5
Hidróxido de sódio	Synth	PA

As amostras de formulações farmacêuticas contendo os princípios ativos estudados foram obtidas em farmácias locais (Uberlândia – MG) na forma de xarope (PRO + COD e SMX + TMP), comprimidos (NIM + PAR e SMX + TMP + FZP) e cápsulas (AMD + FMD).

Os reagentes HAc, H₂SO₄, ACN, EtOH, MetOH, H₃PO₄, H₃BO₃ e NaOH foram utilizados como eletrólitos e/ou como fase móvel em análises por HPLC e foram

preparados em água deionizada (Millipore Direct-Q3) com resistividade superior ou igual a 18 M Ω cm.

3.2. Preparo de soluções: eletrólitos de suporte, padrões, amostras e fases móveis.

3.2.1. Determinação simultânea de NIM e PAR

Ácido sulfúrico (0,10 mol L⁻¹) em meio de água/EtOH (70:30; v/v) foi usado como eletrólito de suporte no estudo de determinação simultânea de NIM e PAR. Devido à baixa solubilidade de NIM em água, houve a necessidade de adicionar etanol no eletrólito para evitar sua precipitação durante as análises. No preparo desse eletrólito de suporte, 5,30 mL de H₂SO₄ comercial (98 %) foram diluídos em água em um balão volumétrico de 1,00 L. Em seguida, 350,0 mL dessa solução foram transferidos para um balão volumétrico de 500,0 mL e o volume foi completado com EtOH.

No preparo das soluções estoques, quantidades adequadas dos sais de NIM e PAR foram dissolvidas em EtOH para uma concentração final de 3080 e 6050 mg L⁻¹, respectivamente. Na análise de amostras farmacêuticas contendo NIM e PAR, 10 comprimidos foram pesados e triturados até obter um pó fino e homogêneo. Feito isso, algumas porções foram pesadas e dissolvidas em EtOH (solução estoque da amostra). Na sequência, alíquotas da solução estoque foram diluídas, para concentrações adequadas, no eletrólito de suporte para subsequente injeção no sistema BIA.

Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados aos obtidos por HPLC [15]. Nesta análise, a fase móvel era composta por ACN/MetOH/H₂O (35:40:25, v/v; pH ajustado para 4,2 com H₃PO₄). A vazão da fase móvel foi mantida em

1,00 mL min⁻¹ e o comprimento de onda do detector foi fixado em 276 nm. Os tempos de retenção foram de 2,75 e 3,90 min para PAR e NIM, respectivamente.

3.2.2. Determinação simultânea de PRO e COD

Nesse estudo foi utilizado solução tampão ácido acético/acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH = 4,7) como eletrólito de suporte. A solução foi preparada a partir de 5,7 mL do reagente comercial de HAc (99,7%) para um volume final de 1,00 L de solução. O pH foi ajustado para 4,7 com adição de solução concentrada de NaOH. As soluções estoques de PRO e COD foram preparados, separadamente, a partir da dissolução de quantidades adequadas dos respectivos sais em água deionizada para uma concentração de 3209 e 4064 mg L⁻¹, respectivamente. Nas análises de amostras farmacêuticas (xarope) contendo PRO e COD, alíquotas do xarope foram diluídas para concentrações adequadas no eletrólito de suporte para subsequente injeção no sistema BIA.

A fase móvel utilizada na determinação simultânea de PRO e COD por HPLC (método de comparação) [155] foi composta por MetOH/H₂O (60:40, v/v; pH ajustado para 2,35 com H₃PO₄). A vazão da fase móvel foi mantida em 1,00 mL min⁻¹ e o comprimento de onda do detector foi fixado em 250 nm. Os tempos de retenção foram de 2,63 e 5,57 min para COD e PRO, respectivamente.

3.2.3. Determinação simultânea de AMD e FMD

Na determinação simultânea de AMD e FMD em formulações farmacêuticas, a solução tampão borato (0,10 mol L⁻¹; pH = 10,0) em meio de água/MetOH (70:30; v/v) foi utilizado como eletrólito de suporte. Devido à baixa solubilidade da FMD em água,

houve a necessidade de adicionar um solvente orgânico (MetOH) no eletrólito para evitar a precipitação da FMD durante as análises. Utilizou-se MetOH e não EtOH, pois o EtOH levou a um aumento da corrente de fundo do sistema, interferindo na sensibilidade do método, o que não foi observado quando MetOH foi utilizado. No preparo desse eletrólito, 6,18 g do reagente comercial de H_3BO_3 foi pesado e solubilizado em água até o volume final de 1,00 L. O pH foi ajustado para 10,0 com adição de solução concentrada de NaOH. Em seguida, 350,0 mL dessa solução foram transferidos para um balão volumétrico de 500,0 mL e o volume foi completado com MetOH.

Na preparação de soluções estoque, quantidades adequadas de AMD e FMD foram dissolvidas, separadamente, em MetOH para uma concentração de 3021 e 6620 mg L^{-1} , respectivamente. Na análise de amostras contendo AMD e FMD, 10 cápsulas foram abertas, pesadas e homogeneizadas. Feito isso, algumas porções foram pesadas e dissolvidas em MetOH (solução estoque da amostra). Na sequência, alíquotas da solução estoque foram diluídas, para concentrações adequadas, no eletrólito suporte para subsequente injeção no sistema BIA.

Na determinação simultânea de AMD e FMD por HPLC, para comparação dos resultados obtidos por BIA, 0,05 mol L^{-1} de fosfato diácido de potássio/ACN (60:40; v/v; pH ajustado para 3,5 com H_3PO_4) foi utilizado como fase móvel [156]. A vazão da fase móvel foi mantida em 1,30 mL min^{-1} e o comprimento de onda do detector foi fixado em 283 nm. Os tempos de retenção foram de 1,80 e 4,57 min para AMD e FMD, respectivamente.

3.2.4. Determinação simultânea de SMX, TMP e FZP

Solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em meio de água/MetOH (70:30) foi usado como eletrólito de suporte para a determinação simultânea de SMX, TMP e FZP por BIA-MPA. Devido à baixa solubilidade de SMX e TMP em água, houve a necessidade de adicionar MetOH ao eletrólito de suporte para evitar a precipitação dos mesmos durante as análises. Utilizou-se MetOH e não EtOH pelo mesmo motivo justificado anteriormente (item 3.2.3). No preparo desse eletrólito, utilizou-se 3,40 mL do reagente comercial de H_3PO_4 (85%) para 1,00 L de solução. O pH foi ajustado para 7,0 com adição de solução concentrada de NaOH. Em seguida, 350,0 mL dessa solução foram transferidos para um balão volumétrico de 500,0 mL e o volume foi completado com MetOH.

No preparo de soluções padrões de SMX, TMP e FZP, quantidades adequadas de cada um dos sais foram pesadas e solubilizadas em MetOH para obter concentrações de 1270, 720 e 670 mg L^{-1} , respectivamente. Na análise de amostras farmacêuticas (comprimidos) contendo SMX, TMP e FZP, 10 comprimidos foram pesados, triturados (até obter um pó fino) e homogeneizados. Feito isso, algumas porções foram pesadas e dissolvidas em MetOH (solução estoque da amostra). Na sequência, alíquotas da solução estoque foram diluídas, para concentrações adequadas, no eletrólito suporte, para subsequente injeção no sistema BIA.

Neste estudo, os resultados obtidos por BIA-MPA também foram comparados aos obtidos por HPLC. No entanto, não foi localizado na literatura um método que possibilitasse a separação dos três compostos de interesse. Assim, estudos foram realizados para identificação das condições experimentais que possibilitassem a separação e quantificação dos três compostos por HPLC. A fase móvel que permitiu a separação e quantificação de SMX, TMP e FZP por HPLC foi composta por $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato/ACN (40:60; v/v; pH = 3,5). A vazão da fase

móvel foi mantida em $1,20 \text{ mL min}^{-1}$ e o comprimento de onda do detector foi fixado em 280 nm. Os tempos de retenção foram de 1,88, 2,78 e 4,30 min para TMP, SMX e FZP, respectivamente. Um cromatograma obtido nas condições otimizadas pode ser observado na Figura 12.

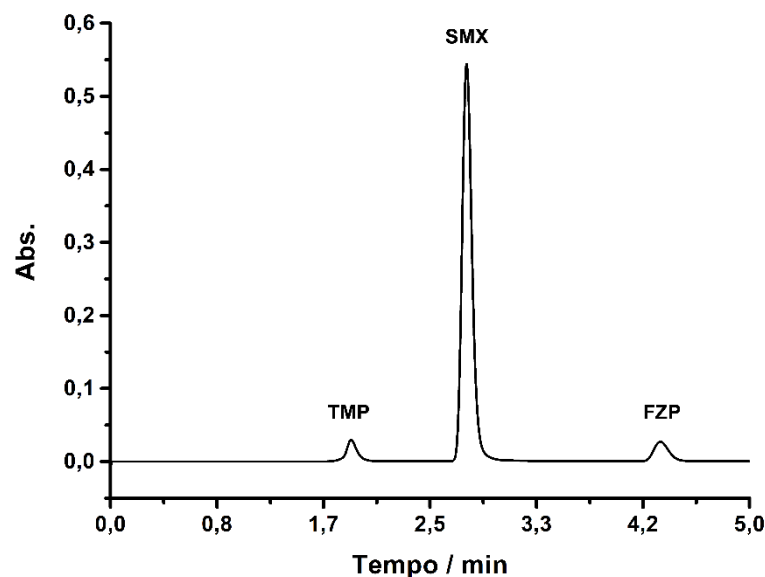


Figura 12. Cromatograma obtido experimentalmente com a injeção de uma solução padrão contendo uma mistura de TMP (10 mg L^{-1}) + SMX (50 mg L^{-1}) + FZP ($6,3 \text{ mg L}^{-1}$).

3.3. Instrumentação

3.3.1. Detecção eletroquímica

As medidas amperométricas e de voltametria cíclica foram realizadas utilizando o potenciostato/galvanostato μ Autolab Tipo III (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands - Metrohm;) interfaceado a um computador e controlado através do software GPES 4.9.007.

3.3.2. Eletrodos de trabalho, referência e auxiliar

Neste trabalho utilizou-se BDD (área geométrica = 0,2 cm²) como eletrodo de trabalho. O material foi adquirido da empresa Adamant Technologies SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça (atualmente chamada NeoCoat AS, La Chaux-de-Fonds, Suíça). Trata-se de placas a base de silício (0,7 x 0,7 cm) com espessura de aproximadamente 1,2 mm e cobertas com um fino filme de diamante (1,2 µm) com nível de dopagem de boro de 7000 a 8000 ppm. A limpeza e ativação eletroquímica desse eletrodo foi realizada diariamente no início de cada medida eletroquímica. Este procedimento pode ser realizado de duas formas:

- Limpeza anódica: aplicação de um potencial de +2,0 V ou uma corrente de +0,01 A em meio de solução tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0);
- Limpeza catódica: aplicação de 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 [96, 120]. 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 fundo de 10 µA. Após a ativação anódica, sempre foi necessário fazer também a ativação catódica. A limpeza eletroquímica era considerada adequada quando a corrente de fundo usando voltametria cíclica na faixa de potencial entre 0,0 e +1,4 V, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, em meio de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ ficava próxima a 1 µA.

Em todos os experimentos utilizou-se um fio de platina como eletrodo auxiliar e um mini eletrodo de referência Ag/AgCl ($\text{KCl}_{\text{sat.}}$), preparado no próprio laboratório. O eletrodo foi construído por eletrodeposição de AgCl em um fio de Ag através da aplicação de +0,3 V em meio de solução de HCl 0,10 mol L⁻¹ [157], durante 2 h, utilizando o potenciostato/galvanostato modelo μ Autolab tipo III.

3.3.3. Células eletroquímicas

A imagem da célula eletroquímica utilizada nos experimentos de voltametria cíclica pode ser observada na Figura 13.



Figura 13. Imagem da célula eletroquímica utilizada nos experimentos de voltametria cíclica.

Trata-se uma célula cilíndrica de polietileno com diâmetro externo de 7,30 cm, diâmetro interno de 4,90 cm, altura de 1,90 cm e volume total de 30,0 mL. Na parte inferior dessa célula, um pequeno orifício central (0,5 cm de diâmetro) foi aberto, onde é posicionado um anel de borracha (O-ring). Um pedaço de BDD (0,7 x 0,7 cm) foi pressionado sobre este anel com auxílio de uma placa metálica e parafusos colados nas extremidades da parte inferior da célula. A área útil do eletrodo foi definida pelo diâmetro interno deste anel (0,3 cm; área = 0,07 cm²). Para manter o contato elétrico, uma placa de circuito impresso de cobre foi fixada entre a placa metálica e o eletrodo BDD. A parte

superior da célula contém dois orifícios para o posicionamento dos eletrodos de referência e auxiliar.

Nos estudos em BIA utilizou-se uma célula eletroquímica cilíndrica de vidro, construída no próprio laboratório, semelhante à descrita em trabalho publicado anteriormente [158]. A Figura 14A ilustra um diagrama esquemático e a Figura 14B a imagem do sistema BIA usada nos estudos.

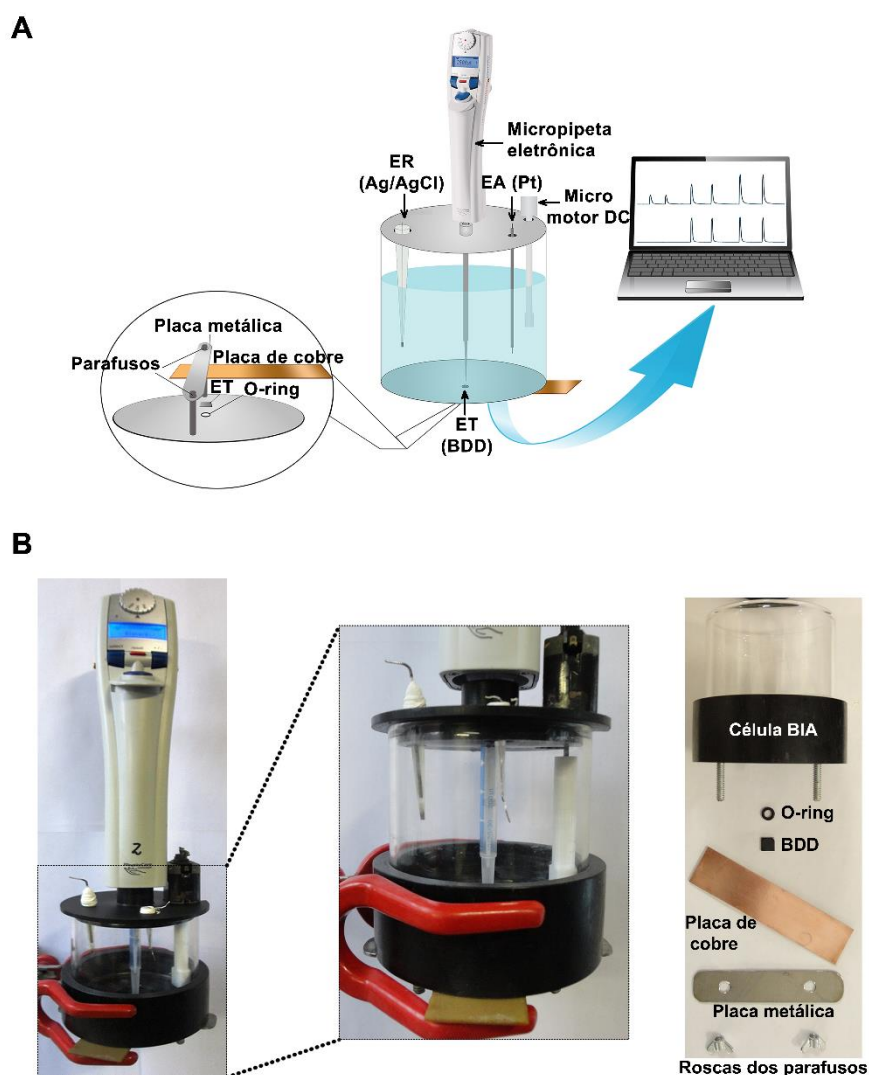


Figura 14. (A) Diagrama esquemático do sistema BIA usado nos estudos. (B) Imagem do sistema BIA usado nos estudos.

A célula possui diâmetro interno de 6,30 cm, altura de 7,80 cm e volume total de 200,0 mL. Duas tampas de polietileno foram fixadas nas duas extremidades do cilindro de vidro. A tampa de polietileno da parte inferior da célula continha um único orifício (diâmetro = 0,50 cm; área = 0,2 cm²), posicionado no centro, no qual foi posicionado um O-ring e o eletrodo BDD, de modo semelhante ao descrito para a célula utilizada nos experimentos de voltametria cíclica. A tampa superior da célula continha quatro orifícios para posicionar a ponteira da micropipeta (posicionada no centro da tampa), os eletrodos de referência e auxiliar e um sistema para agitação da solução no interior da célula BIA.

No sistema de agitação foi utilizado um micro motor DC (usado em secador de cabelo ou brinquedos elétricos), construído no próprio laboratório, com eixo adaptado com uma haste de teflon, como pode ser observado na Figura 15.

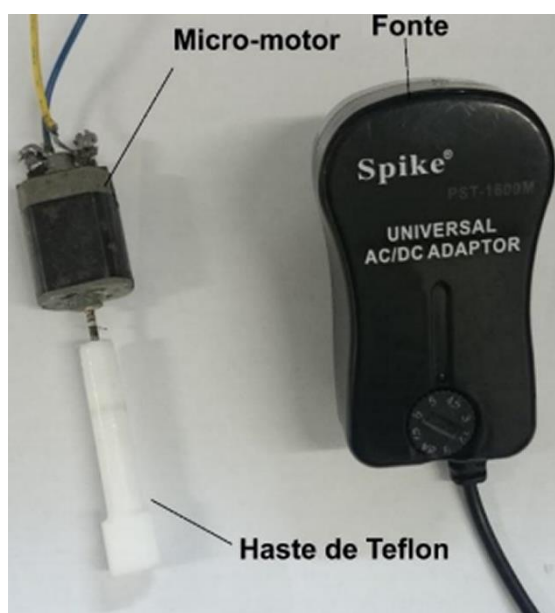


Figura 15. Imagem do sistema de agitação para a célula BIA.

O micro motor é alimentado por uma fonte universal de tensão variável (3 a 12 V) e a velocidade de agitação depende da voltagem selecionada na fonte. A agitação proposta

pode ser facilmente empregada em análises “in situ”, uma vez que a fonte de alimentação pode ser substituída por pilhas comuns (após otimização da voltagem a ser empregada).

As injeções das soluções no sistema BIA foram realizadas com uma micropipeta eletrônica 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 350 $\mu\text{L s}^{-1}$. Uma imagem da pipeta é apresentada na Figura 14. A distância entre a ponteira da micropipeta eletrônica e o centro do eletrodo de trabalho foi ajustada em torno de 2 mm, como recomendado em trabalhos anteriores (configuração do tipo wall-jet) [154].

3.3.4. Análises comparativas por cromatografia em líquida

Todos os resultados obtidos nas determinações por BIA-MPA foram comparados com os obtidos por HPLC. Nestas etapas foi utilizado um equipamento Shimadzu LC-10 VP equipado com um detector UV-VIS (SPD-10AV), uma coluna com fase estacionária C18 (Lychrispher 100 A, 250 mm x 4.6 mm, 5 μm), um injetor manual com alça de amostragem de 20 μL e uma bomba LC-10AD-VP.

3.4. Procedimento usados no cálculo de alguns parâmetros analíticos

3.4.1. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito que pode ser detectada com certeza estatística razoável, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas no método [159]. O ruído presente nos sinais de resposta precisa ser considerado a fim de que se possa expressar as diferenças passíveis de

serem detectadas [160]. Para métodos que utilizam curva de calibração, o LD pode ser calculado através da seguinte equação:

$$LD = \frac{3 \times DPb}{b}$$

Onde DPb é o desvio padrão do branco ($n = 10$) e b é a sensibilidade da curva de calibração.

3.4.2. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) é a concentração mais baixa de um analito que pode ser determinada com precisão aceitável (repetitividade) e exatidão (concordância com o valor verdadeiro correspondente) [161], sob as condições experimentais adotadas.

O LQ pode ser calculado pela expressão abaixo:

$$LQ = \frac{10 \times DPb}{b}$$

3.4.3. Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão do método e está relacionada com a concordância entre os resultados de medidas sucessivas [159]. Os ensaios de repetibilidade devem ser realizados sobre uma mesma amostra e em condições estáveis, tais como:

- Mesmo laboratório;
- Mesmo analista;

- Mesmo equipamento;
- Mesmos tipos de reagentes;
- Curtos intervalos de tempo.

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

$$DPR \% = \frac{DPx}{\bar{x}} \times 100$$

Onde DPx é o desvio padrão da concentração e \bar{x} é a média da concentração encontrada.

3.4.4. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em apresentar resultados que sejam proporcionais com a concentração da espécie de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A relação matemática entre a resposta medida (área ou altura do pico) e a concentração do analito é determinada a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas (mínimo cinco níveis de concentração) dessa espécie [162]. Essa relação matemática é representada pela equação chamada de curva analítica [159]:

$$y = a + bx$$

Onde y é a resposta medida, a é o coeficiente linear (interseção com eixo y , quando $x = 0$), b é o coeficiente angular (inclinação da curva analítica: sensibilidade) e x é a concentração.

Os coeficientes de regressão a e b são obtidos a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados [159, 163]. A partir dos pontos experimentais é possível calcular também o coeficiente de correlação linear (r), que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida [164]. Quanto mais próximo r for de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

3.4.5. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são baseados no uso de materiais de referência certificado (MRC), comparação de métodos e ensaios de recuperação [159].

O processo de avaliação por meio de MRC consiste em analisar número suficiente de replicatas desse material e comparar os resultados obtidos com o valor certificado. Um MRC possui um valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada [159].

A avaliação da exatidão por meio da comparação de métodos consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência (método com precisão e exatidão avaliadas). As análises são efetuadas em replicata, utilizando os

dois métodos em separado sobre as mesmas amostras. Após análise de diferentes amostras com ambos os métodos, as diferenças obtidas para cada amostra são calculadas e comparadas com o valor desejado. Estabelece-se, então, o nível de confiança de acordo com o intervalo de concentração.

O ensaio de recuperação (R) consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Esse estudo reflete a quantidade de determinado composto, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A recuperação é calculada segundo a equação [159]:

$$R (\%) = \frac{(C1 - C2)}{C3} \times 100$$

Onde C1 é a concentração determinada na amostra adicionada; C2 é a concentração determinada na amostra não adicionada e C3 é a concentração adicionada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O foco dos estudos apresentados nessa tese foi direcionado na análise de medicamentos disponíveis comercialmente contendo mais de um princípio ativo. Neste contexto, a redação da tese foi dividida em capítulos de acordo com a composição das amostras comerciais estudadas:

4.1 NIM e PAR;

4.2 PRO e COD;

4.3 AMD e FMD;

4.4 SMX, TMP e FZP.

4.1. Determinação simultânea de NIM e PAR

4.1.1. Comportamento eletroquímico de NIM e PAR empregando eletrodo de BDD

O comportamento eletroquímico da NIM e do PAR é bem conhecido [3]. A NIM é mais facilmente reduzida em meio ácido. O grupo nitro pode ser reduzido a um derivado hidroxilamina, o qual pode ser oxidado (comportamento quase reversível) a um derivado nitroso em potenciais mais positivos. Posteriormente, a redução do composto nitroso eletrogerado pode ser observado numa segunda varredura em direção a potenciais negativos (comportamento reversível do grupo nitroso). O sinal anódico da NIM (detectado sem redução anterior) pode ser atribuído à oxidação do grupo metilsulfonamida. O PAR pode ser oxidado a N-acetil-p-benzoquinonaimina, a qual pode ser reduzida em potenciais mais negativos (comportamento reversível ou quase reversível) [147, 165-167]. O produto de oxidação do PAR pode reagir cataliticamente

com outros componentes da amostra e, então, erros podem ocorrer durante a realização de determinações simultâneas. No entanto, se o PAR é oxidado em meio ácido, essa reação catalítica pode ser inibida (cinética lenta) [166] e, portanto, é mais apropriado para determinações simultâneas. Sendo assim, H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ / EtOH (70:30; v/v) foi escolhido como eletrólito de suporte para determinação simultânea de NIM e PAR.

A Figura 16 apresenta os voltamogramas cíclicos, na janela de potencial de -0,90 a +1,60 V, obtidos em meio solução aquosa de H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ /EtOH (70:30) antes (—) e após a adição de $263,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PAR (····) ou $370,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NIM (----).

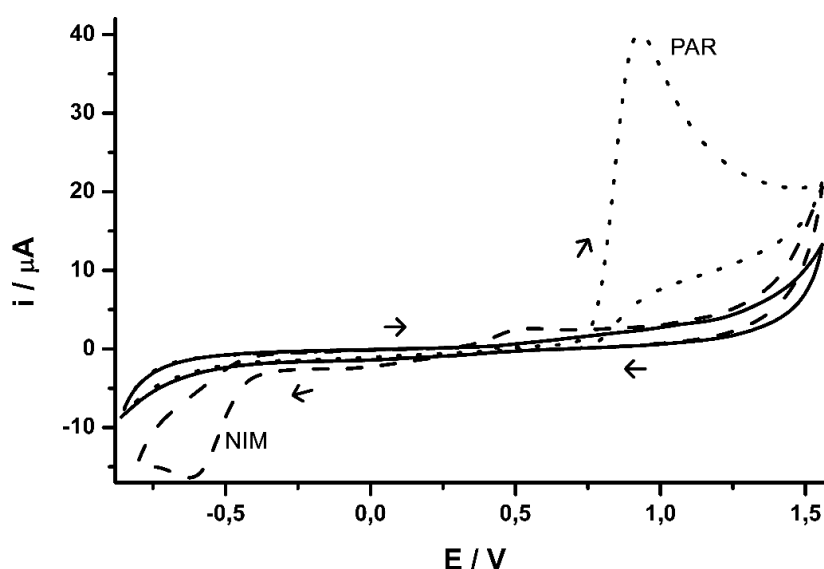


Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em água/EtOH (70:30), antes (—) e após a adição de $263,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PAR (····) ou $370,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NIM (----). Eletrodo de trabalho: BDD; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Incremento de potencial: 5 mV

Sob esta condição, PAR é oxidado a N-acetil-p-benzoquinonaimina em potenciais mais positivos que $+0,75 \text{ V}$, com a transferência de dois prótons e dois elétrons, e nenhum pico de corrente catódica foi observada na varredura reversa, o que difere de outros dados disponíveis na literatura sobre a oxidação de PAR (a redução da quinona gerada é

observada na varredura reversa) [147, 166]. Provavelmente isso ocorreu devido à presença de solvente orgânico (30% de EtOH) no eletrólito de suporte. A Figura 17 representa o esquema da reação de oxidação eletroquímica do PAR.

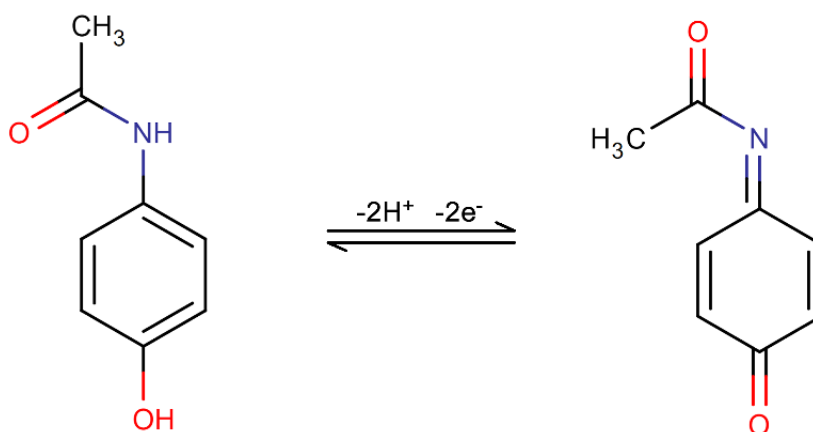


Figura 17. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica do PAR.

NIM é reduzida para seu derivado hidroxilamina correspondente, com a transferência de dois elétrons e um próton, próximo a -0,59 V, e um pico de corrente anódica foi observado a cerca de +0,50 V (oxidação de seu produto de redução - derivado nitroso). A redução do grupo nitroso também foi observada em uma varredura seguinte (-0,1 V), no entanto, a corrente detectada é pequena. Em potenciais mais elevados do que +1,40 V, o grupo metilsulfonamida da NIM também é oxidado, o que está de acordo com a literatura [3, 168]. A Figura 18 representa o esquema da reação envolvida no processo de redução eletroquímica da NIM.

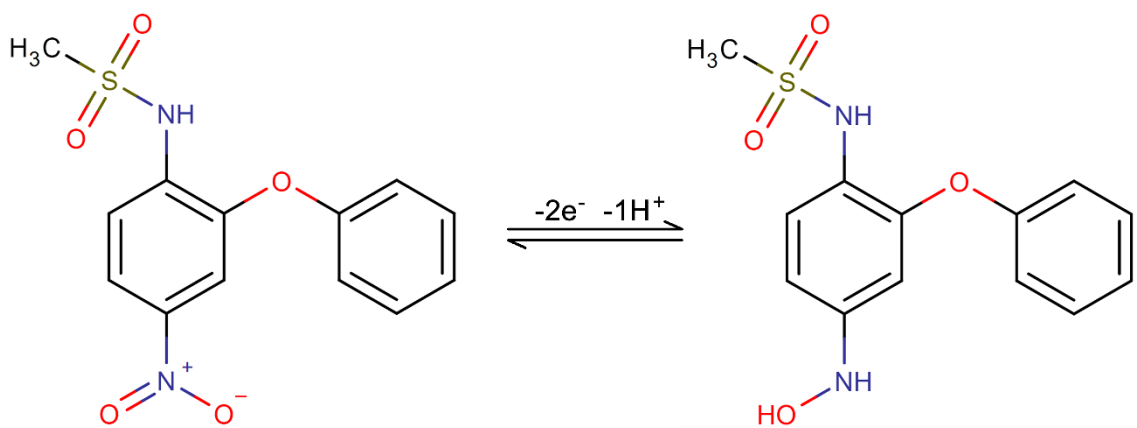


Figura 18. Esquema do mecanismo da redução eletroquímica da NIM.

O comportamento eletroquímico do PAR e NIM também foi investigado usando o sistema BIA-MPA (condição hidrodinâmica). Esse estudo foi realizado em duas etapas, e, em cada etapa, 10 pulsos de potenciais sequenciais com duração de 100 ms cada (etapa 1: 0,70, 0,80, 0,90, 1,00, 1,10, 1,20, 1,30, 1,40, 1,50 e 1,60 V; etapa 2: 0,00, -0,10, -0,20, -0,30 , -0,40, -0,50, -0,60, -0,70, -0,80 e -0,90 V) foram aplicados continuamente no eletrodo de trabalho de BDD posicionado no sistema BIA-MPA. A corrente detectada em cada pulso de potencial foi monitorada continuamente durante a injeção das duas soluções de composições diferentes: (i) 35 mg L⁻¹ de PAR (○) ou (ii) 70 mg L⁻¹ de NIM (■). A média das correntes detectadas (n = 3) em cada pulso de potencial foram usadas para construir o voltamograma hidrodinâmico para PAR e NIM (Fig. 19).

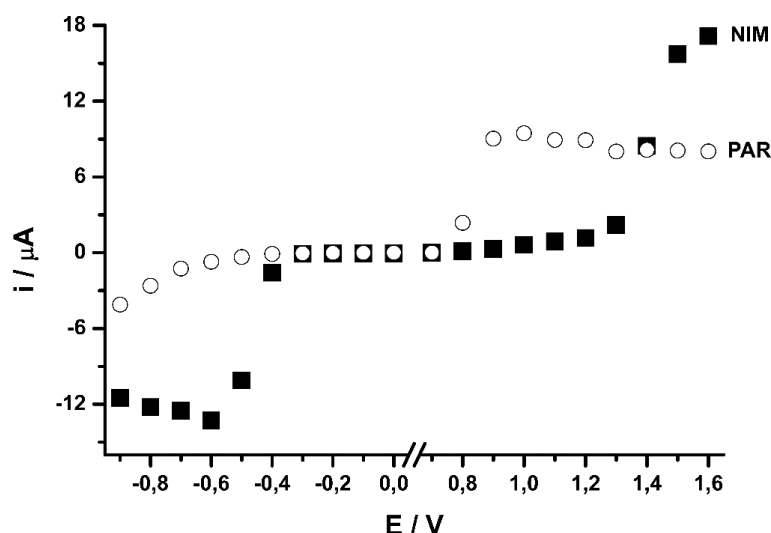


Figura 19. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos com o sistema BIA-MPA para PAR (○; 35 mg L⁻¹) e NIM (■; 70 mg L⁻¹) plotando a média dos picos de corrente em função do pulso de potencial aplicado correspondente. Eletrólito de suporte: 0,10 mol L⁻¹ de H₂SO₄ /EtOH (70:30); Velocidade de injeção: 57 μL s⁻¹; Volume de injeção: 150 μL.

Como pode ser observado na Fig. 19, na região anódica, o PAR começa a oxidar em potenciais menos positivos (+0,80 V) do que a NIM (+1,30 V). Na região catódica, somente NIM é reduzida em potenciais inferiores a -0,6 V. Baseado nesses voltamogramas hidrodinâmicos, podemos concluir que no pulso de potencial de +0,90 V, o PAR pode ser oxidado (“determinado”) sem a interferência de NIM, e a NIM pode ser determinada no pulso de potencial de -0,70 V, mesmo em soluções contendo ambos os compostos. Em seguida, os dois pulsos de potenciais foram selecionados nos estudos subsequentes, utilizando o sistema de BIA-MPA.

4.1.2. Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de NIM e PAR por BIA

A partir dos resultados apresentados no item 4.1.1, estudos para verificar a possibilidade de determinação simultânea de NIM e PAR foram realizados. A estratégia

usada foi a detecção de PAR em +0,90 V (sem interferência de NIM) e detecção de NIM em -0,70 V (sem a interferência de PAR).

A Figura 20 apresenta os registros dos amperogramas obtidos em +0,90 V/100 ms e em -0,70 V/100 ms para injeções em triplicatas de três soluções de composições diferentes: (i) 20,0 mg L⁻¹ de NIM, (ii) 100,0 mg L⁻¹ de PAR e (iii) 20,0 + 100,0 mg L⁻¹ de NIM + PAR, respectivamente. Neste estudo, a relação entre as concentrações de NIM e PAR é semelhante à relação entre esses princípios ativos em medicamentos comerciais (cada comprimido contém 100 e 500 mg de NIM e PAR, respectivamente).

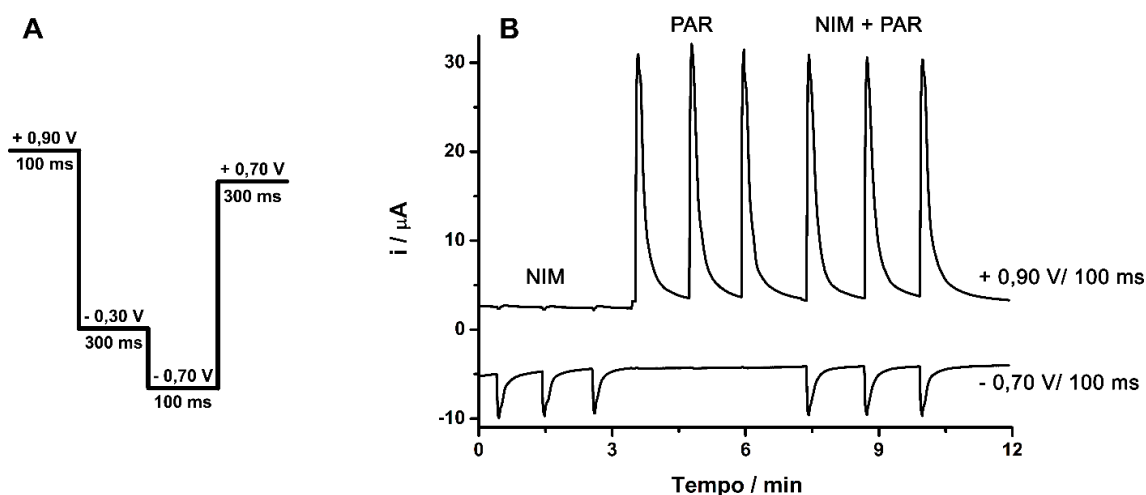


Figura 20. (A) Esquema dos pulsos de potenciais; (B) Respostas ($n = 3$) obtidas com o sistema BIA-MPA para injeção de soluções contendo somente NIM (20 mg L⁻¹), somente PAR (100 mg L⁻¹) e uma mistura de NIM + PAR (20 + 100 mg L⁻¹, respectivamente). Velocidade de agitação: 2700 rpm; Volume de injeção: 150 μL; Velocidade de injeção: 57 μL s⁻¹.

As respostas amperométricas mostram claramente que NIM foi reduzida em -0,70 V e PAR foi oxidado em +0,90 V no eletrodo de BDD posicionado no sistema de BIA-MPA. Quando a solução contendo ambos os compostos (NIM + PAR) foi injetada,

nenhuma diferença na resposta eletroquímica de NIM e PAR foi observada. Esta seletividade somente foi obtida com o uso de dois pulsos de potenciais adicionais: -0,30 V/300 ms e +0,70 V/300 ms. No pulso potencial de -0,30 V/300 ms, o produto de oxidação do PAR (gerado em +0,90 V) foi removido da superfície do eletrodo (por redução e por convecção) e uma redução seletiva de NIM foi obtida em -0,70 V/100 ms. Da mesma forma, em +0,70 V/300 ms, o produto de redução da NIM (gerado em -0,70 V) foi removido da superfície do eletrodo (por oxidação e por convecção) e uma oxidação seletiva de PAR foi obtida a +0,90 V/ 100 ms.

4.1.3. Otimização dos parâmetros hidrodinâmicos do sistema BIA-MPA

Os parâmetros hidrodinâmicos do sistema BIA-MPA estudados foram os seguintes: volume injetado, velocidade de injeção e necessidade de agitação da solução no interior da célula BIA. Na otimização destes parâmetros, duas características foram definidas como sendo mais relevantes para o desempenho do método: frequência analítica, que é tanto maior quanto mais rápido o pico retorna a linha base, e repetibilidade do sinal em função do tempo, que depende do número de amostragens de corrente durante um pico transiente, da manutenção da área do eletrodo de trabalho (sem contaminação ou desativação), do volume injetado e da velocidade de injeção e de agitação da solução no interior da célula. Após os estudos de otimização, as seguintes condições foram selecionadas: volume de injeção de 150 μL , velocidade de injeção de 57 $\mu\text{L s}^{-1}$ e velocidade de agitação da solução no interior da célula de 2700 rpm. Nestas condições, um pico transiente no sistema BIA-MPA proposto tem uma duração de 25 segundos (0,4 min), conforme pode ser observado na Figura 21. Usando o esquema de aplicação de pulsos apresentada na Figura 20A, a amostragem de corrente em cada amperograma ocorre a cada 800 ms (tempo total do esquema de pulsos: 100 + 100 + 300 + 300 ms) e,

dessa forma, um pico de 25 segundos de duração tem em média 31 pontos de amostragens de corrente (Figura 21). Nestas condições, duas ou três amostragens de corrente podem ser observadas no ápice de cada de pico (Figura 21), o que foi considerado suficiente, pois a altura dos picos foi utilizada na construção das curvas de calibração.

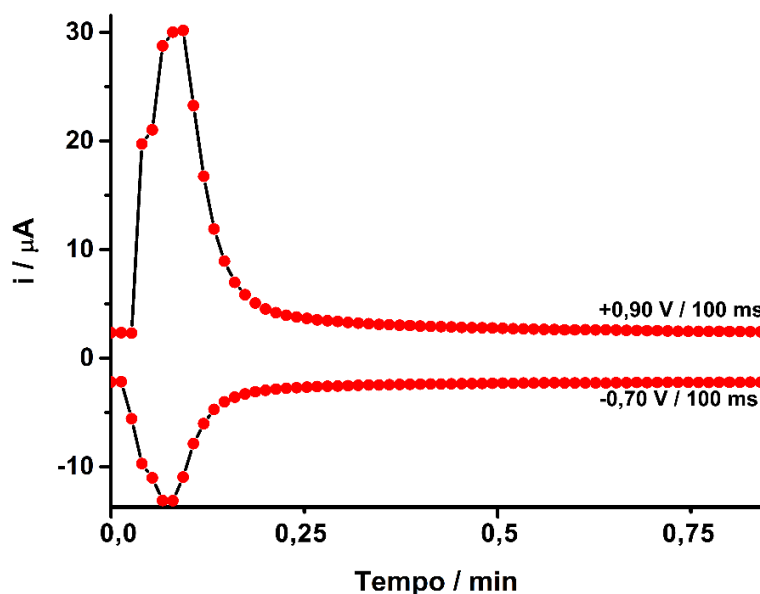


Figura 21. Ampliação de dois picos transientes obtidos com a injeção de uma solução contendo NIM + PAR ($20 + 100 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente) no sistema BIA-MPA com a identificação de seus respectivos pontos de aquisição de corrente. Volume de injeção: $150 \text{ } \mu\text{L}$; Velocidade de injeção: $57 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$; Velocidade de agitação da solução: 2700 rpm.

Como já dito anteriormente (item 1.5), geralmente um volume de injeção de $100 \text{ } \mu\text{L}$ é suficiente para se conseguir boa sensibilidade em células BIA com detecção amperométrica. No entanto, nesse estudo, o volume de injeção foi aumentado para $150 \text{ } \mu\text{L}$ e, desse modo, a corrente foi amostrada mais vezes em cada pico e uma melhor repetibilidade foi obtida.

Sistemas BIA podem ser utilizados com ou sem agitação da solução no interior da célula durante a análise. Essa agitação, frequentemente, proporciona um aumento

significativo da frequência analítica e contribui para melhorar o desempenho do pulso de potencial de limpeza eletroquímica que pode ser facilmente implementado com a técnica MPA. A Figura 22 mostra os resultados obtidos utilizando o sistema BIA sem e com agitação da solução contida na célula.

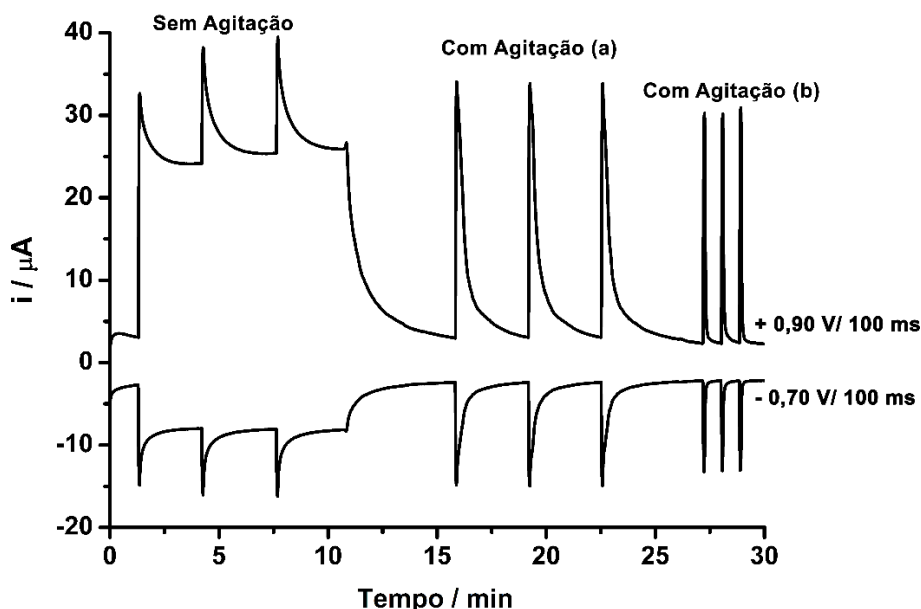


Figura 22. Comparação entre os resultados obtidos por BIA sem e com agitação da solução no interior da célula. Velocidades de agitação: (a) 1400 rpm e (b) 2700 rpm. Solução injetada: NIM + PAR ($20 + 100 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente); outras condições ver Fig. 20.

Como pode ser observado, após a injeção de uma solução contendo ambos os compostos no sistema de BIA sem agitação da solução no interior da célula, não foram obtidas respostas características em forma de picos transientes. A corrente aumenta rapidamente após a etapa de injeção, mas não há uma queda rápida ao nível da linha de base, como esperado [154]. Comportamento semelhante também foi obtido anteriormente com outro sistema BIA [169]. No entanto, sob agitação, a corrente decai rapidamente à linha de base e a frequência de amostragem pode ser aumentada de 15 para $46 \text{ injeções h}^{-1}$. Além disso, os analitos eletroativos e seus respectivos produtos de

oxidação ou de redução são rapidamente removidos da superfície do eletrodo de trabalho e, assim, reduz a probabilidade de contaminação da superfície do eletrodo.

4.1.4. Estudo da repetibilidade do método

Para verificar a repetibilidade do método nas condições otimizadas anteriormente (itens 4.1.2 e 4.1.3), sucessivas injeções ($n = 12$) de soluções contendo $10 + 50 \text{ mg L}^{-1}$ (a) ou $50 + 250 \text{ mg L}^{-1}$ (b) de NIM + PAR, respectivamente, foram injetadas no sistema BIA-MPA. A Figura 23 apresenta os resultados obtidos.

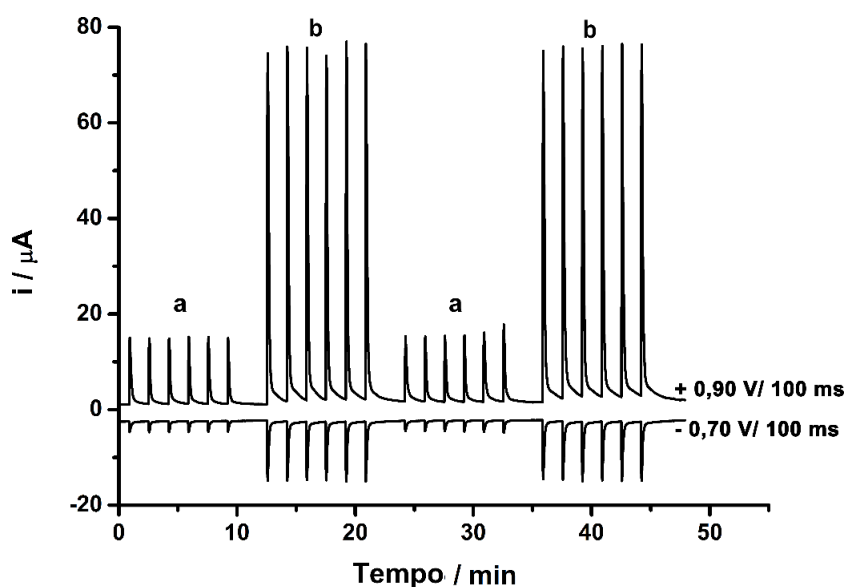


Figura 23. Estudo de repetibilidade obtida através de injeções sucessivas de soluções contendo $10 + 50 \text{ mg L}^{-1}$ (a) ou $50 + 250 \text{ mg L}^{-1}$ (b) de NIM + PAR, respectivamente. Outras condições ver Fig. 20

Os DPR ($n = 12$) foram de 1,0% (a) e 0,9% (b) para a oxidação do PAR e de 0,5% (a) e 1,3% (b) para redução da NIM. Estes resultados demonstraram que o sistema BIA-MPA apresenta boa repetibilidade, o que prova que o fenômeno de contaminação ou passivação do eletrodo foi evitada, mesmo ao trabalhar com elevadas concentrações de NIM (adsorve

sobre os eletrodos sólidos) [170]. Apesar da elevada resistência à contaminação ou da desativação do eletrodo de BDD utilizado, os baixos valores de DPR somente foram obtidos após a aplicação dos pulsos de potenciais adicionais (-0,30 V/ 300 ms e +0,70 V/ 300 ms). A possibilidade de utilização de pulsos de potenciais a fim de minimizar a contaminação ou a passivação de eletrodos sólidos pode ser considerada uma vantagem da MPA (condições hidrodinâmicas) sobre as técnicas voltamétricas (condições de estado estacionário).

4.1.5. Aplicação do sistema BIA-MPA na determinação simultânea de NIM e PAR em formulações farmacêuticas

A Figura 24 apresenta os amperogramas obtidos para injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes de PAR (a – e: 50 – 250 mg L⁻¹) e NIM (a – e: 10 – 50 mg L⁻¹) e amostras adequadamente diluídas no eletrólito suporte (f – i).

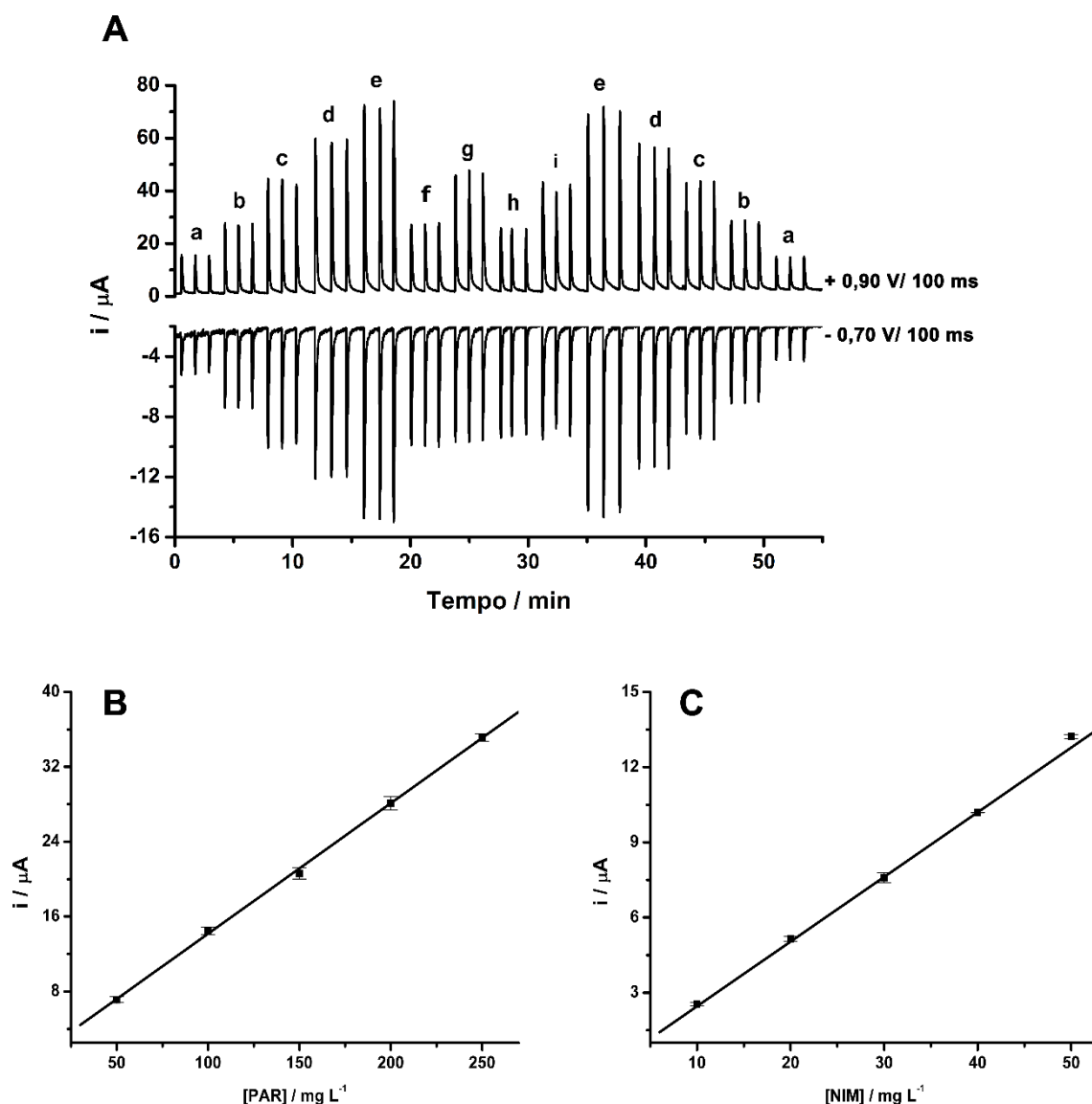


Figura 24. (A) Amperogramas obtidos por BIA-MPA após injeções em triplicatas de cinco soluções padrão contendo, simultaneamente, concentrações crescentes de PAR (a – e: 50 a 250 mg L⁻¹) e NIM (a – e: 10 a 50 mg L⁻¹) e quatro amostras farmacêuticas devidamente diluídas em eletrólito de suporte (f – i); (B) Curva de calibração do PAR ($r = 0,999$); (C) Curva de calibração da NIM ($r = 0,999$). Outras condições ver Fig. 20.

As curvas de calibração (Fig. 24B e 24C) apresentaram boa linearidade na faixa de concentração empregada, com as seguintes equações de calibração:

$$\text{NIM: } i (\mu A) = 0,14733 \pm 0,05735 + 0,25172 \pm 0,00189 c (\text{mg L}^{-1}); r = 0,999$$

$$\text{PAR: } i (\mu A) = -0,39729 \pm 0,35996 + 0,28486 \pm 0,00485 c (\text{mg L}^{-1}); r = 0,999$$

As soluções padrão injetadas em ordem crescente e decrescente de concentração apresentaram respostas semelhantes (baixo desvio no valor da inclinação das curvas), o que confirma que o fenômeno de efeito de memória ou contaminação do eletrodo foi prevenido, mesmo usando um eletrodo de trabalho sólido e não modificado. As características analíticas do método BIA-MPA para determinação simultânea de NIM e PAR são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características analíticas do método BIA-MPA para NIM e PAR

Características	NIM	PAR
Faixa Linear (mg L⁻¹)	10,0 – 140,0	40,0 – 560,0
r	0,999	0,999
LD (mg L⁻¹)	0,299	0,295
LQ (mg L⁻¹)	0,996	0,982
Frequência analítica (injeções h⁻¹)	46	46
DPR intra-dia (n = 12)	1,3%	1,0%
DPR inter-dia (n = 8)	2,1%	4,5%

r = coeficiente de correlação linear; LD = Limite de detecção ($3 S_B/b$; S_B = desvio padrão do branco, n = 10, b = coeficiente angular da curva de calibração); LQ = Limite de quantificação ($3,33 LD$)

O método BIA-MPA proposto foi usado para determinar PAR e NIM em quatro amostras farmacêuticas e os resultados foram comparados com os obtidos por HPLC. A Tabela 3 mostra os resultados das análises dessas amostras e seus respectivos desvios padrão (n = 3).

Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos para determinação simultânea de NIM e PAR por BIA-MPA e HPLC (n = 3).

Amostras	mg / comprimido		NIM		PAR	
	NIM	PAR	BIA	HPLC	BIA	HPLC
1	100	300	103 ± 2	107 ± 3	305 ± 6	303 ± 6
2	100	500	99 ± 1	100 ± 4	526 ± 8	510 ± 7
3	100	300	97 ± 2	98 ± 3	295 ± 8	299 ± 8
4	100	500	97 ± 1	99 ± 3	494 ± 6	504 ± 7

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, não há diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos com o método BIA-MPA e o método de referência (HPLC), o que comprova a exatidão do método proposto. A análise estatística (Teste-t de student para amostras pareadas) foi usada na comparação dos resultados obtidos usando BIA-MPA e HPLC. A um nível de confiança de 95%, a média dos resultados encontrados em ambos os métodos podem ser considerada similar, uma vez que os valores do teste-t calculados foram menores que o valor crítico teórico (3,18; 3 graus de liberdade). Além disso, o Test-F foi usado para avaliar a igualdade dos desvios padrão dos resultados obtidos pelos dois métodos e, em todos os casos, $F_{\text{calculado}}$ foi menor que o $F_{\text{crítico}}$ (19,0) em um nível de confiança de 95%.

4.1.6. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA e métodos publicados anteriormente.

A Tabela 4 apresenta uma comparação entre as características analíticas do método proposto com métodos publicados anteriormente, os quais também estudaram a determinação simultânea de NIM e PAR.

Alguns dos trabalhos publicados anteriormente apresentaram valores de LD menores que os obtidos por BIA-MPA. No entanto, baixos LDs não são requeridos em análises de formulações farmacêuticas, uma vez que os princípios ativos estão presentes em concentrações relativamente altas. O método proposto apresenta diversas vantagens quando comparado aos métodos analíticos já descritos para determinação simultânea de NIM e PAR, tais como: frequência analítica muito superior; preparo de amostra simples (somente dissolução e diluição, não necessita de filtração); não faz uso de reagentes de alta pureza; utiliza aparelhagem simples, de baixo custo (obtenção e manutenção) e com

características portáteis, podendo, assim, ser facilmente adaptada em laboratórios com infraestrutura limitada.

Tabela 4. Comparação entre as características analíticas do método proposto e métodos analíticos anteriores para a determinação simultânea de NIM e PAR.

Método	Analitos	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	r	LD (mg L ⁻¹)	DPR (%)	F.A. (h ⁻¹)	Ref.
HPTLC	NIM	60,7 – 182,2	0,995	-	0,65	1,33	[12]
	PAR	195,6 – 586,8	0,992	-	0,75	1,33	
SP-UV	NIM	5,0 – 30,0	0,999	0,08	0,16	-	[2]
	PAR	1,0 – 11,0	0,999	0,34	0,63	-	
SP-UV-D	NIM	5,0 – 50,0	0,999	0,60	0,11	-	[13]
	PAR	5,0 – 80,0	0,999	0,13	0,47	-	
ESP-UV-M	NIM	5,0 – 50,0	0,999	0,42	0,26	-	[13]
	PAR	5,0 – 80,0	0,999	0,06	0,52	-	
HPLC-UV	NIM	0,25 – 40,0	0,999	-	-	4	[17]
	PAR	0,25 – 40,0	0,999	-	-	4	
HPLC-UV	NIM	10,0 – 20,0	0,999	0,30	0,99	5	[16]
	PAR	32,5 – 75,0	0,999	1,08	1,10	5	
HPLC-UV	NIM	1,7 – 4,2	0,999	0,05	0,80	10	[15]
	PAR	9,0 – 20,0	0,999	0,03	0,60	10	
HPLC-UV	NIM	50,0 – 400,0	0,999	0,20	1,54	2	[14]
	PAR	50,0 – 400,0	0,999	0,04	0,07	2	
HPLC-MS	NIM	0,1 – 25,0	0,993	0,01	4,0	2	[14]
	PAR	10,0 – 50,0	0,956	0,16	8,0	2	
BIA-MPA	NIM	10,0 – 140,0	0,999	0,30	1,3	46	Tese
	PAR	40,0 – 560,0	0,999	0,30	1,0	46	

HPTLC = cromatografia em camada delgada; SP-UV = espectrofotometria UV-VIS; SP-UV-D = espectrofotometria UV-VIS derivada; SP-UV-M = espectrofotometria UV-VIS com múltiplos comprimentos de onda; F.A. = frequência analítica.

4.2. Determinação simultânea de PRO e COD

Algumas informações sobre PRO e COD foram obtidas a partir dos estudos disponibilizados na literatura [171, 172]: (i) O potencial de pico de oxidação da COD se desloca para valores mais negativos com o aumento do pH e a intensidade da corrente anódica máxima é obtida em pH próximo a 4,0 [171]; (ii) PRO apresenta dois picos anódicos, indicando que sua oxidação ocorre em duas etapas e a melhor sensibilidade da PRO para ambos os picos também ocorre em pH próximo a 4 [172]. Portanto, solução tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH = 4,7) foi utilizado nos estudos subsequentes para a determinação simultânea de PRO e COD por BIA-MPA.

4.2.1. Comportamento eletroquímico de PRO e COD empregando eletrodo de DDB

O comportamento eletroquímico da PRO e da COD empregando eletrodo de BDD como eletrodo de trabalho foi estudado empregando a técnica estacionária de voltametria cíclica. O estudo foi realizado na janela de potencial de -0,20 a +1,50 V e em meio de solução tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH = 4,7). A Figura 25 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos antes (—) e após a adição de 160 ou 203 mg L⁻¹ de PRO (····) ou COD (- - -), respectivamente.

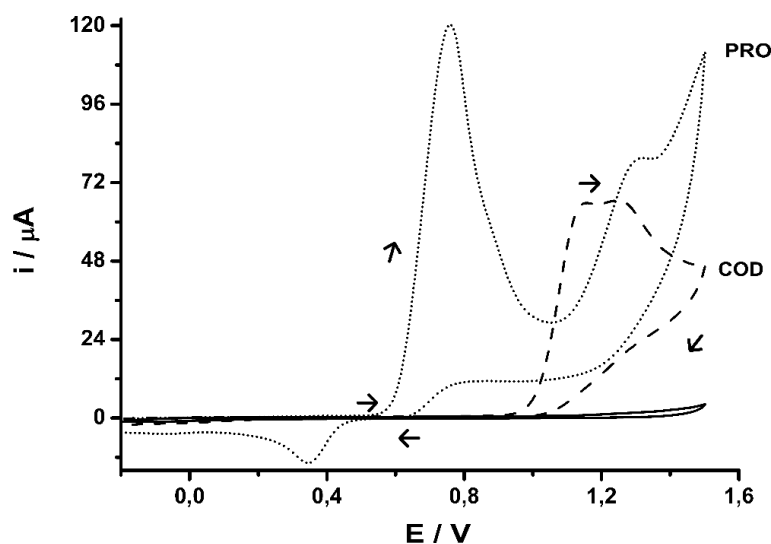


Figura 25. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando BDD como eletrodo de trabalho em meio de solução tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,7$), antes (—) e após a adição de 160 mg L^{-1} de PRO (····) ou 203 mg L^{-1} de COD (----). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Incremento de potencial: 5 mV

Nessas condições, duas moléculas de COD são oxidadas a bis-COD próximo a $+1,10 \text{ V}$ envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons [173-175]. Nenhum pico catódico foi observado na varredura reversa, sugerindo que o processo de oxidação não é reversível. A Figura 26 representa o esquema da reação de oxidação eletroquímica da COD.

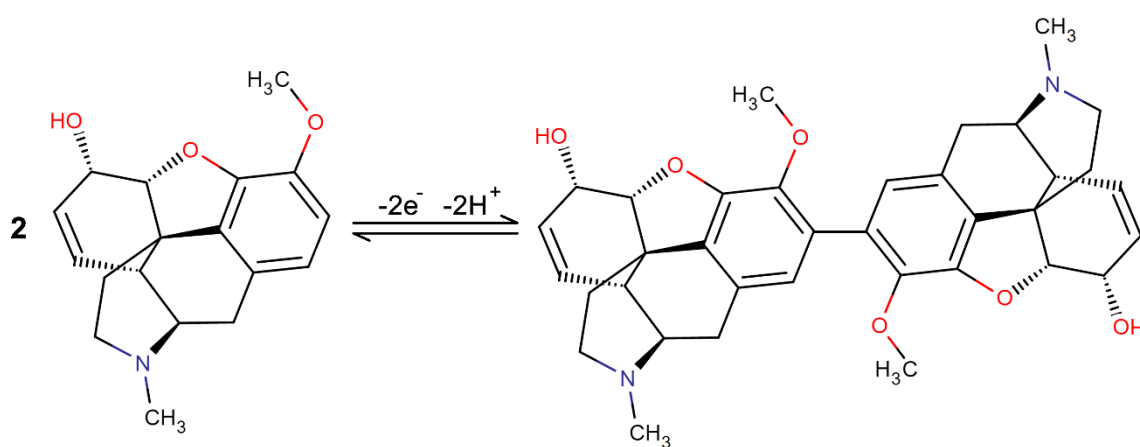


Figura 26. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica da COD [173].

A PRO é oxidada em duas etapas sequenciais envolvendo dois elétrons e dois prótons, conforme previamente relatado na literatura [172, 176-178]. A primeira etapa de oxidação que ocorre próximo de + 0,75 V, está relacionada com a remoção de um elétron a partir do átomo de nitrogênio, e leva à formação de um cátion radical relativamente estável, o qual é então oxidado numa segunda etapa e resulta em sulfóxido de prometazina [177, 179, 180]. No varredura inversa, um pico catódico foi observado em cerca de +0,35 V, que provavelmente corresponde à redução eletroquímica dos produtos de oxidação gerados em + 0,75 e + 1,25V [172]. A Figura 27 representa o esquema da reação eletroquímica envolvida.

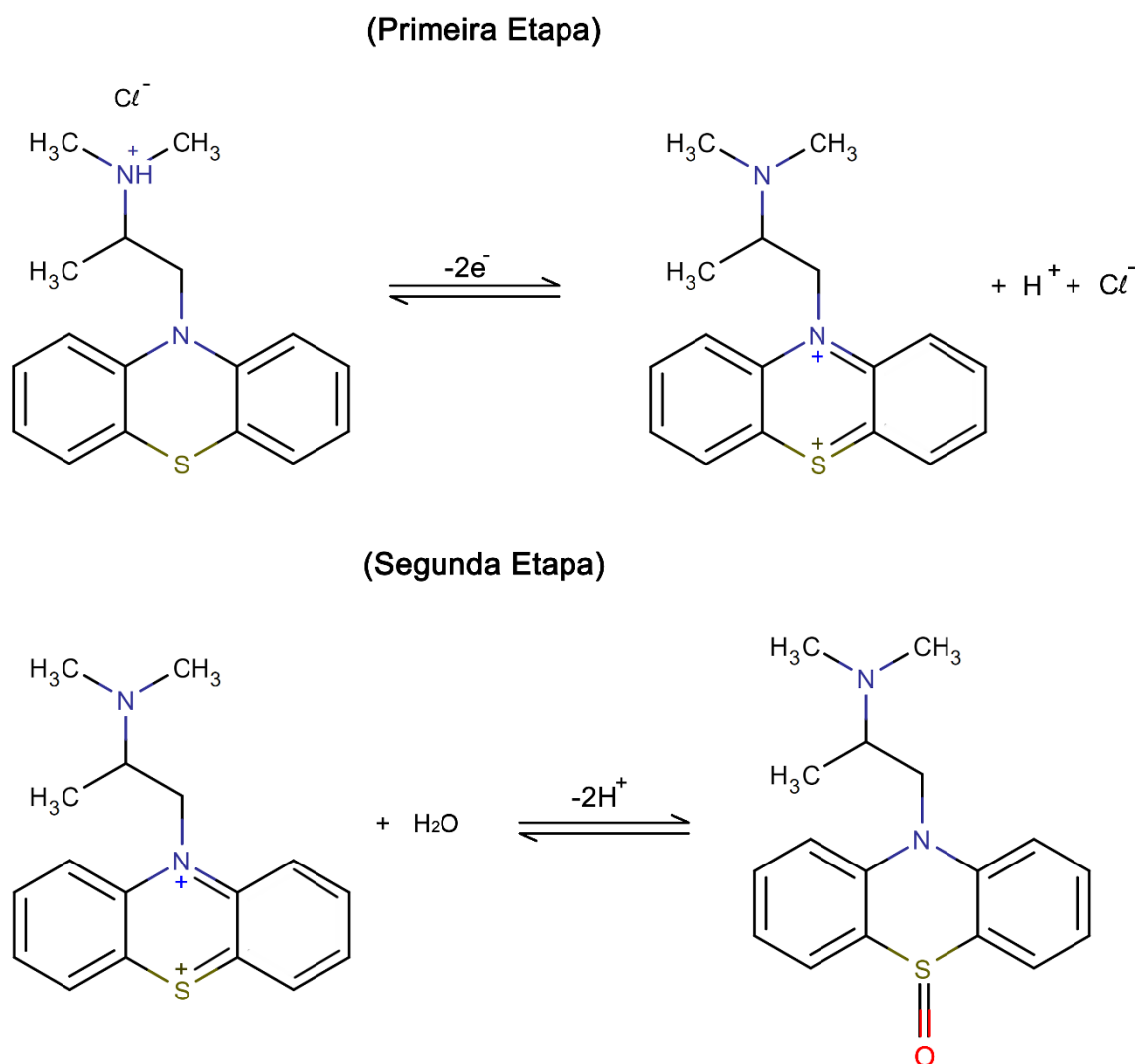


Figura 27. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica da PRO [177].

O uso da solução tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,70$) como eletrólito suporte, além de ser de baixo custo e ambientalmente amigável, proporcionou uma boa separação entre os picos anódicos de PRO e COD (cerca de 350 mV), o que é útil para a determinação simultânea dos compostos.

No estudo do comportamento eletroquímico da PRO e COD usando o sistema BIA, 10 pulsos de potenciais sequenciais ($0,00, +0,15, +0,30, +0,45, +0,60, +0,75, +0,90, +1,10, +1,30$ e $+1,50 \text{ V}$; tempo de aplicação: 100 ms cada) foram aplicados continuamente ao eletrodo de trabalho de BDD posicionado no sistema BIA-MPA (Fig. 28A). A corrente em cada pulso de potencial foi monitorada continuamente durante a injeção de uma solução contendo $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PRO (■) ou $80,0 \text{ mg L}^{-1}$ de COD (○). A média das correntes detectadas ($n = 2$) em cada pulso de potencial foram usadas para construir o voltamograma hidrodinâmico para PRO e COD (Fig. 28B).

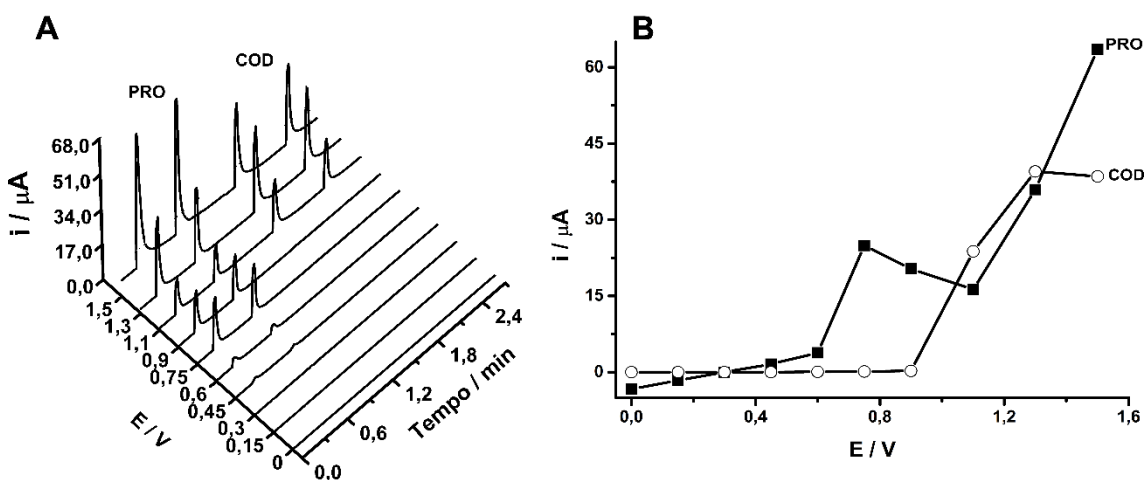


Figura 28. (A) Amperogramas obtidos no sistema BIA-MPA após injeções em duplicatas de uma solução contendo 50 mg L^{-1} de PRO ou 80 mg L^{-1} de COD. (B) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos plotando a média dos valores de corrente em função dos pulsos de potencial aplicados. Eletrólito de suporte: $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão acetato ($\text{pH} = 4,7$); velocidade de injeção: $75 \mu\text{L s}^{-1}$; volume de injeção: $150 \mu\text{L}$.

Como mostrado na Fig. 28, a oxidação de PRO e COD inicia em potenciais superiores a +0,45 e +1,10 V, respectivamente. Com base nesses voltamogramas hidrodinâmicos, o pulso potencial de +0,80 V (corrente anódica máxima da PRO) forneceu a oxidação da PRO sem interferência da COD e em +1,30 V (corrente anódica máxima da COD), ambos os compostos (PRO e COD) são oxidados. Esses dois pulsos de potenciais foram, então, selecionados nos estudos subsequentes, utilizando o sistema de BIA-MPA.

4.2.2. Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de PRO e COD por BIA-MPA

A Figura 29 apresenta os amperogramas obtidos em +0,80 V/50 ms e em +1,30 V/50 ms para injeções em triplicata de soluções contendo 25,0 mg L⁻¹ de PRO ou 40,0 mg L⁻¹ de COD ou ambos os compostos na mesma concentração (25,0 + 40,0 mg L⁻¹ de PRO + COD, respectivamente). Neste e nos próximos estudos, a relação entre as concentrações de PRO e COD usadas nos estudos foi semelhante à relação existente em amostras de xaropes comercialmente disponíveis (cada 5 mL de xarope contém 6,25 e 10 mg de PRO e COD, respectivamente).

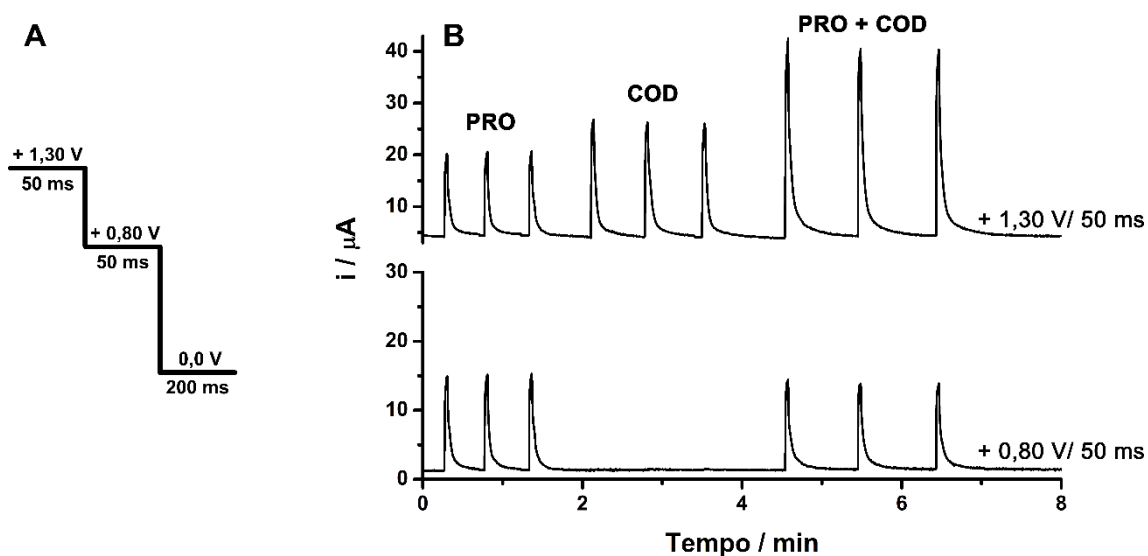


Figura 29. (A) Esquema de aplicação dos pulsos de potenciais; (B) Respostas obtidas ($n = 3$) com o sistema BIA-MPA para injeções de soluções contendo somente PRO (25 mg L⁻¹), somente COD (40 mg L⁻¹) e a mistura de PRO + COD (25 + 40 mg L⁻¹, respectivamente). Pulso de potencial de limpeza: 0,0 V/ 200 ms; Velocidade de agitação: 1400 rpm; Volume de injeção: 150 μL ; Velocidade de injeção: 75 μL s⁻¹.

A partir dos resultados apresentados na Fig. 29 foi possível observar que em +0,80 V, somente a PRO foi oxidada, enquanto que em + 1,30 V, tanto PRO quanto COD foram oxidadas. Além disto, a corrente de oxidação detectada em +0,80 V para PRO foi semelhante na presença ou ausência de COD, o que indica a ausência de qualquer interação química entre os compostos e que a COD não é oxidada em +0,80 V. Essa seletividade e estabilidade somente foi obtida aplicando alternadamente um terceiro pulso de potencial (0,0 V por 200 ms; etapa de limpeza eletroquímica e/ou condicionamento) durante o experimento. Esse pulso de potencial previne ou retarda a contaminação do eletrodo de BDD. Por exemplo, no estudo mostrado na Fig. 29 (aplicação dos três pulsos de potenciais durante 8 min), o pulso de potencial de limpeza (0,0 V/ 200 ms) foi aplicado durante 5,36 min (67% do tempo) e os outros dois pulsos de potenciais (+ 0,80 e + 1,30 V por 50 ms cada), onde pode ocorrer a contaminação, foram aplicados por apenas 2,64 min

(33% do tempo). Se o pulso de potencial de limpeza não é usado, o fenômeno de contaminação poderia ocorrer durante toda a análise (8 min).

Foi observado também que a soma das correntes de oxidação detectadas em +1,30 V para a solução contendo apenas PRO (16,3 μ A) ou apenas COD (22,6 μ A) foram semelhantes a corrente de oxidação detectada para a solução contendo ambos os compostos na mesma concentração (Fig. 29; PRO + COD: 38,4 μ A). Além disso, a corrente de oxidação da PRO não foi a mesma em + 0,80 V (13,9 μ A) e + 1,30 V (16,3 μ A). Devido a esta diferença, uma simples subtração entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais não permite acesso a corrente de oxidação proveniente apenas da COD. Para contornar este problema, um fator de correção (FC) que corresponde à diferença exata entre a corrente detectada para PRO em + 0,80 e + 1,30 V foi utilizado [128, 142, 181]. Este FC foi obtido através da injeção de uma solução contendo apenas PRO no sistema BIA e foi determinado utilizando a seguinte equação:

$$FC = i_{\text{PRO (+1,30 V)}} / i_{+0,80 \text{ V}}$$

Em seguida, na injeção de soluções contendo PRO + COD, a corrente proveniente apenas de oxidação da COD em +1,30 V pode ser calculada usando a seguinte equação:

$$i_{\text{COD}} = i_{+1,30 \text{ V}} - (FC \times i_{+0,80 \text{ V}})$$

É importante salientar que o FC deve ser determinado em cada procedimento de calibração (através da injeção de uma solução contendo apenas PRO), pois pequenas variações podem ocorrer entre as análises realizadas em dias diferentes.

4.2.3. Otimização dos parâmetros experimentais do sistema BIA

O desempenho do sistema BIA-MPA foi investigado com o intuito de melhorar a estabilidade, a sensibilidade e a frequência de amostragem. Os parâmetros experimentais estudados e otimizados foram os seguintes: velocidade de injeção ($75 \mu\text{L s}^{-1}$), velocidade de agitação da solução no interior da célula (1400 rpm) e volume de injeção ($150 \mu\text{L}$). Usando os pulsos de potenciais propostos na Figura 29A, a corrente foi amostrada em cada amperograma de 300 em 300 ms (tempo total do esquema de pulsos: $50 + 50 + 200$) e, dessa forma, um pico de 30 segundos de duração tem em média 100 pontos de amostragem de corrente, como pode ser observado na Figura 30.

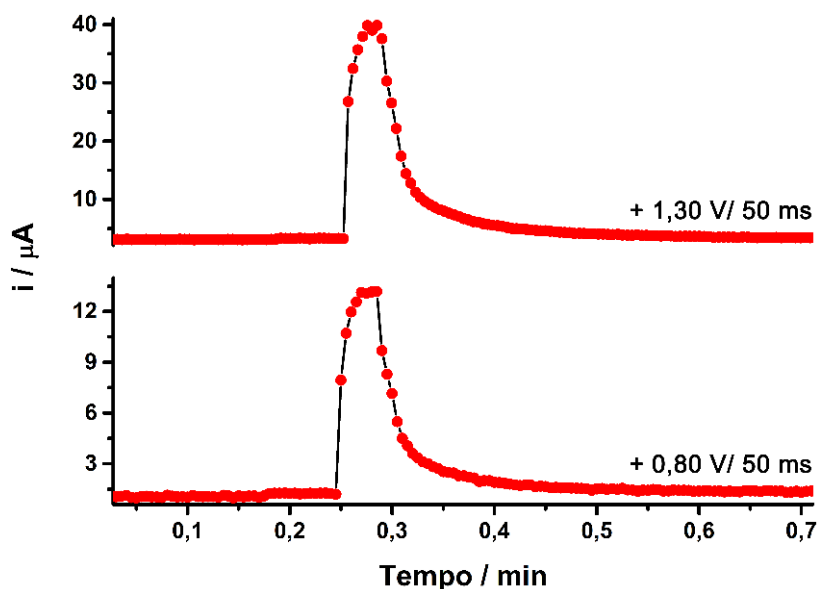


Figura 30. Picos transientes, com seus respectivos pontos de amostragem de corrente obtidos após a injeção de uma solução contendo PRO + COD ($25 + 40 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente) no sistema BIA-MPA. Outras condições ver Fig. 29

De acordo com a Figura 30, observa-se três ou quatro aquisições de corrente no ápice de cada pico. A quantidade de aquisições de corrente por pico é um dado importante pois, na construção das curvas de calibração, utiliza-se a altura dos picos, e, portanto, pelo

menos uma aquisição de corrente no ápice de cada pico é suficiente para que o sistema tenha boa repetibilidade.

A influência da agitação da solução no interior da célula BIA pode ser observada na Figura 31. Uma solução contendo 25 mg L^{-1} de PRO + 40 mg L^{-1} de COD foi injetada com e sem agitação da solução no interior da célula.

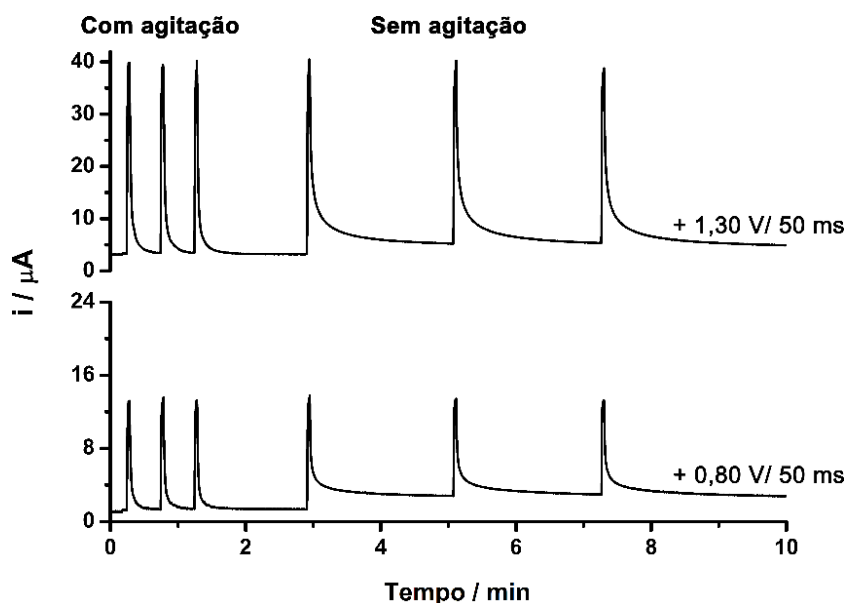


Figura 31. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA com e sem a agitação da solução no interior da célula. Velocidade de agitação: 1400 rpm; solução injetada: 25 mg L^{-1} de PRO + 40 mg L^{-1} de COD. Outras condições ver Fig. 29.

A determinação simultânea de PRO e COD poderia ser realizada sem agitação da solução no interior da célula. Porém, sob agitação, o pico transiente retorna rapidamente para a linha base e a frequência de amostragem pode ser aumentada de 30 para $74 \text{ injeções h}^{-1}$. Além disso, os analitos e os seus respectivos produtos de oxidação são rapidamente removidos da superfície do eletrodo de trabalho (diluição rápida na solução contida no interior da célula BIA), o que reduz a possibilidade de contaminação do eletrodo de trabalho.

4.2.4. Estudo da repetibilidade do método

A Figura 32 apresenta os resultados obtidos para sucessivas injeções ($n = 10$) de soluções contendo $10,0 + 16,0 \text{ mg L}^{-1}$ (a) ou $50,0 + 80,0 \text{ mg L}^{-1}$ (b) de PRO + COD, respectivamente.

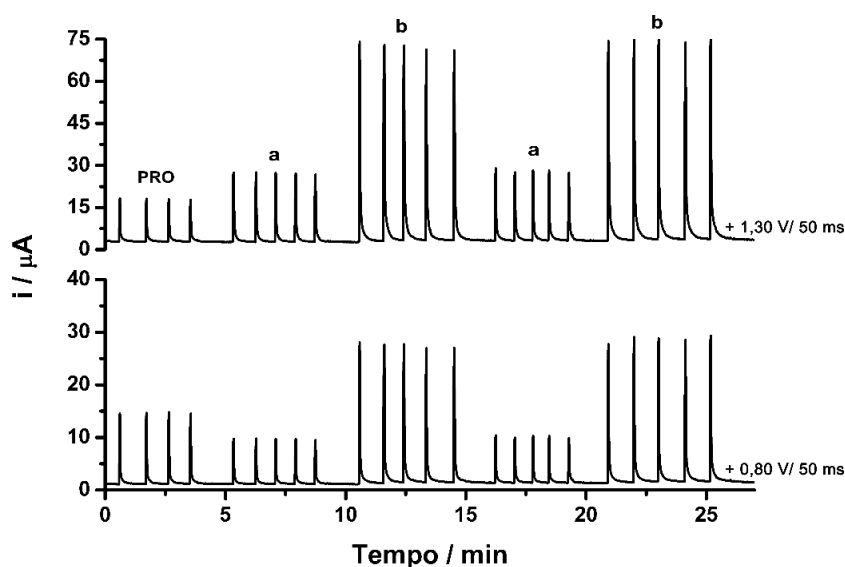


Figura 32. Estudo de repetibilidade. amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo $10 + 16 \text{ mg L}^{-1}$ (a) ou $50 + 80 \text{ mg L}^{-1}$ (b) de PRO + COD, respectivamente. Outras condições ver Fig. 29.

Neste estudo, o DPR ($n = 10$) foi de 1,3% (a) e 0,6% (b) para PRO e 1,6% (a) e 0,8% (b) para COD. Estes resultados indicam que o sistema BIA proposto apresentou boa repetibilidade diante dos parâmetros otimizados anteriormente, uma vez que os DPRs obtidos foram baixos e não foi observado efeito de memória entre as sucessivas injeções, mesmo trabalhando com soluções de diferentes concentrações.

4.2.5. Aplicação do sistema BIA-MPA na determinação simultânea de PRO e COD em formulações farmacêuticas

A Figura 33 apresenta os amperogramas obtidos para injeções em triplicata de uma solução contendo apenas PRO ($15,0 \text{ mg L}^{-1}$), utilizada para calcular o FC, cinco soluções padrão contendo concentrações crescentes de PRO (a – e: $5,0 - 25,0 \text{ mg L}^{-1}$) e COD (a – e: $8,0 - 40,0 \text{ mg L}^{-1}$) e quatro amostras (f – i) adequadamente diluídas no eletrólito de suporte. As curvas de calibração para ambos os compostos foram preparadas, levando em consideração o intervalo de concentração no qual o FC foi relativamente constante ($1,18 \pm 0,02$) e a relação de concentração entre PRO e COD em formulações farmacêuticas comerciais ($1:1,6$).

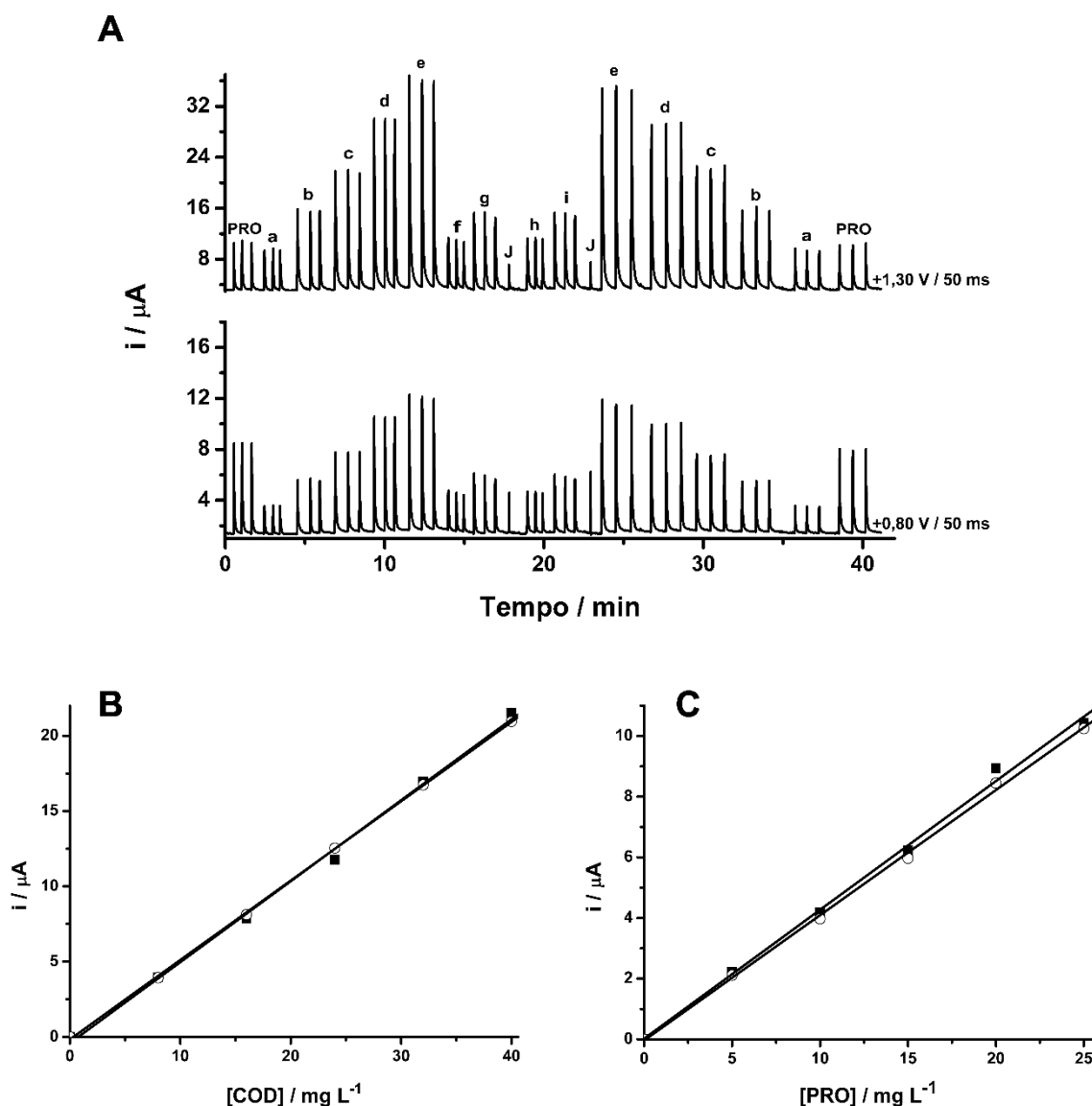


Figura 33. (A) Amperogramas obtidos por BIA-MPA após injeções ($n = 3$) de solução contendo PRO (15 mg L^{-1}), cinco soluções padrão contendo simultaneamente concentrações crescentes de PRO (a – e: $5 - 25 \text{ mg L}^{-1}$) e COD (a – e: $8-40 \text{ mg L}^{-1}$), quatro amostras farmacêuticas devidamente diluídas (f, g, h e i) e etanol 99% (j) para limpeza do eletrodo após a injeção das amostras. Curvas de calibração sobrepostas (ordem ascendente e descendente) para COD (B) e PRO (C). Outras condições ver Fig. 29.

As curvas de calibração (Fig. 33B e 33C) apresentaram boa linearidade na faixa de concentração estudada, com a obtenção das seguintes equações de calibração:

$$\text{PRO: } i (\mu A) = 0,02429 \pm 0,18449 + 0,42445 \pm 0,01219 c (\text{mg L}^{-1}); r = 0,998$$

$$\text{COD: } i (\mu\text{A}) = -0,40714 \pm 0,36648 + 0,53736 \pm 0,01513 c (\text{mg L}^{-1}); r = 0,998$$

As soluções padrão injetadas em ordem de concentração crescente e decrescente apresentaram resposta semelhante (baixos desvios nos valores das inclinações das curvas), o que confirma que o fenômeno de efeito de memória ou contaminação do eletrodo foi prevenido. No entanto, é importante salientar que o bom desempenho somente foi alcançado quando uma alíquota de 150 μL de EtOH foi injetada imediatamente após a injeção de duas amostras (j na Fig. 33A). Quando o EtOH não foi injetado, uma diminuição na intensidade de corrente, principalmente da COD, foi observada na curva decrescente (após a injeção das amostras), como pode ser observado na Figura 34.

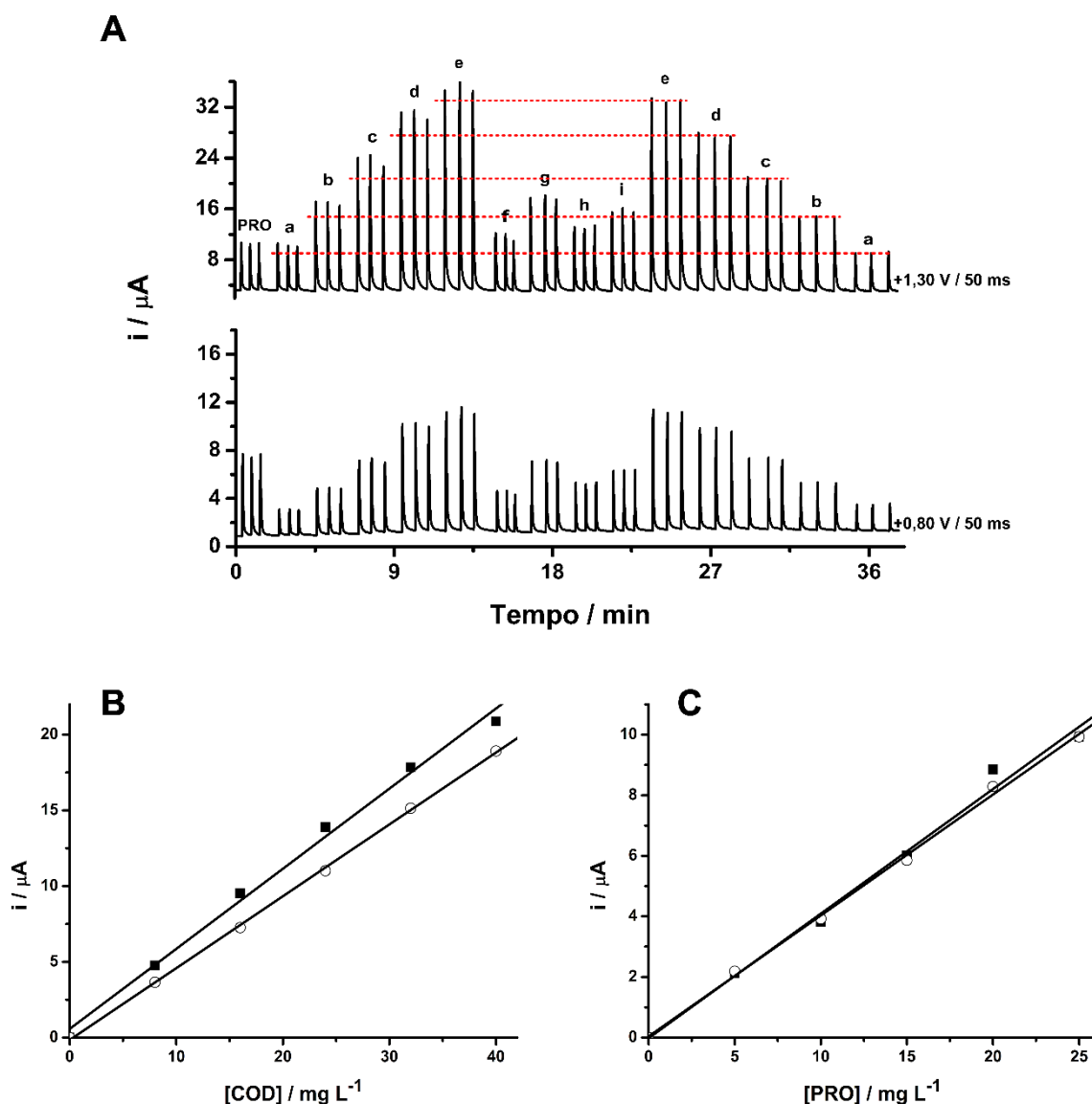


Figura 34. (A) Amperogramas obtidos por BIA-MPA após injeções, em triplicatas, de solução contendo PRO (15 mg L⁻¹), cinco soluções padrão contendo simultaneamente concentrações crescentes de PRO (a – e: 5 – 25 mg L⁻¹) e COD (a – e: 8-40 mg L⁻¹) e quatro amostras farmacêuticas devidamente diluídas (f, g, h e i). Curvas de calibração sobrepostas (ordem ascendente e descendente) para COD (B) e PRO (C). Outras condições ver Fig. 29.

Provavelmente, outros componentes de matriz da amostra contaminavam o eletrodo de BDD causando obstrução progressiva da sua superfície. A injeção de alíquotas de EtOH após a injeção de duas amostras em triplicata promoveu uma limpeza eficiente da superfície do eletrodo, que pode ser observada com os resultados apresentados na Fig. 33.

Estudos demonstraram que a utilização da célula BIA, com 180 mL de eletrólito, permitiu até 36 injeções de alíquotas de 150 µL de EtOH sem causar mudança significativa na linha base e na sensibilidade. As características analíticas do método BIA-MPA para determinação simultânea de PRO e COD são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Características analíticas do método BIA-MPA para PRO e COD

Características	PRO	COD
Faixa Linear (mg L⁻¹)	10,0 – 280,0	16,0 – 112,0
r	0,998	0,998
LD (mg L⁻¹)	0,065	0,135
LQ (mg L⁻¹)	0,216	0,450
Frequência analítica (injeções h⁻¹)	74	74
DPR intra-dia (n = 10)	1,3%	1,6%
DPR inter-dia (n = 6)	5,8%	7,9%

r = coeficiente de correlação linear; LD = Limite de detecção ($3 S_B/b$; S_B = desvio padrão do branco, n = 10, b = coeficiente angular da curva de calibração); LQ = Limite de quantificação (3,33 LD)

O método BIA proposto foi usado para determinar PRO e COD em quatro amostras farmacêuticas e os resultados foram comparados com os obtidos por HPLC. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos na análise dessas amostras com seus respectivos desvios padrão (n = 3).

Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de PRO e COD por BIA e HPLC (n = 3).

Amostras	mg / 5 mL de xarope		PRO		COD	
	PRO	COD	BIA	HPLC	BIA	HPLC
1	6,3	10,0	6,2 ± 0,2	6,3 ± 0,2	9,1 ± 0,2	9,0 ± 0,4
2	6,3	10,0	6,3 ± 0,2	6,7 ± 0,2	9,4 ± 0,1	9,6 ± 0,3
3	6,3	10,0	6,1 ± 0,1	6,1 ± 0,2	9,3 ± 0,2	9,4 ± 0,2
4	6,3	10,0	6,0 ± 0,2	6,4 ± 0,2	9,1 ± 0,3	9,1 ± 0,2

Os resultados obtidos por BIA-MPA para as quatro amostras foram semelhantes aos obtidos por HPLC. Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados estatisticamente com método de HPLC utilizando o teste t de Student para amostras pareadas (nível de confiança de 95%) e o valor $t_{\text{calculado}}$ foi de 0,78 para COD e de 4,04 para PRO e, portanto, apenas o valor de COD foi menor do que o valor crítico (3,18; $\alpha = 0,05$). Entretanto, estudos para determinação simultânea de PRO e COD também foram realizados, por alunos do nosso grupo de pesquisa, utilizando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE- C^4D). A Figura 35 apresenta os eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n = 10$) de soluções contendo PRO + COD (160 + 203 mg L⁻¹).

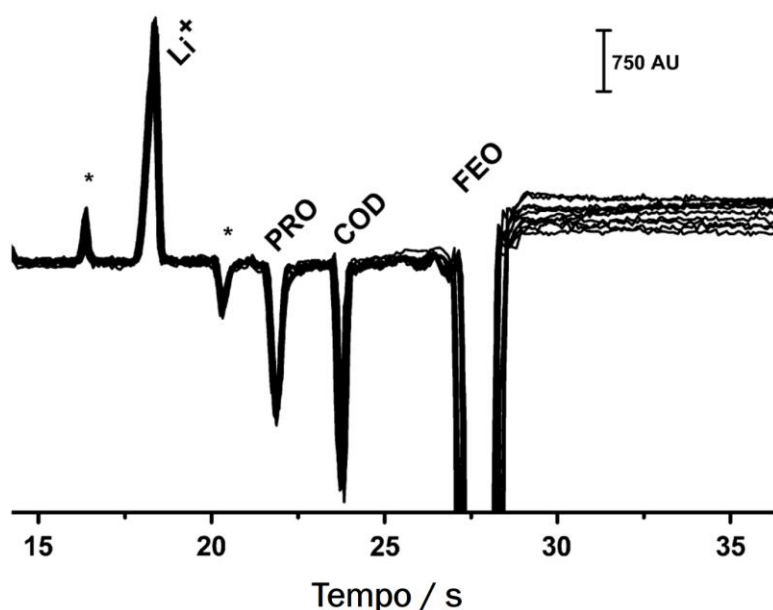


Figura 35. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n = 10$) de soluções contendo PRO e COD (160 e 203 mg L⁻¹, respectivamente) e lítio como padrão interno (4,86 mg L⁻¹); (*) pico desconhecido. Solução tampão de corrida: 1,8 mmol L⁻¹ de ácido oxálico + 10 mmol L⁻¹ de trietanolamina (pH = 8,4); potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 0,6 s; comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm, respectivamente [182].

A média dos resultados obtidos para PRO, por BIA-MPA e CE-C⁴D, foram estatisticamente comparados e, nesse caso, o valor calculado ($t_{\text{calculado}}$) foi de 1,46 (menor que o valor crítico). Além disso, utilizou-se o teste F para avaliar a igualdade dos desvios padrão dos resultados obtidos e não houve diferença significativa a um nível de confiança de 95% (em todos os casos, $F_{\text{calculado}} < F_{\text{critico}} = 19,0$).

4.2.6. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA e métodos publicados anteriormente.

As características analíticas de métodos publicados anteriormente para a determinação simultânea de PRO e COD foram comparadas com as obtidas por BIA-MPA (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre as características analíticas do método proposto e métodos analíticos publicados anteriormente para a determinação simultânea de PRO e COD.

Método	Analitos	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	r	LD (mg L ⁻¹)	DPR (%)	F.A. (h ⁻¹)	Ref.
CE-AD	PRO	0,03 – 1,96	0,999	0,001	2,5	3,8	[24]
	COD	0,003 – 6,10	0,999	0,002	2,9	3,8	
MEKC	PRO	$5,0 \times 10^{-4}$ – 0,08	0,999	$1,6 \times 10^{-4}$	4,6	7,5	[25]
	COD	$7,8 \times 10^{-4}$ – 0,06	0,999	$1,2 \times 10^{-4}$	4,6	7,5	
CE-C ⁴ D	PRO	58,0 – 290,0	0,997	20,0	4,1	74	[182]
	COD	122,0 – 610,0	0,997	28,0	3,9	74	
BIA-MPA	PRO	10,0 – 280,0	0,998	0,07	1,3	74	Tese
	COD	16,0 – 112,0	0,998	0,14	1,6	74	

CE-AD = eletroforese capilar com detecção amperométrica; MEKC = cromatografia eletrocínica micelar; F.A. = frequência analítica.

A faixa linear e os LDs obtidos pelo método proposto são maiores que aqueles reportados nos estudos anteriores para determinação simultânea de PRO e COD usando CE-AD e MEKC [24, 25]. No entanto, baixos LDs não são necessários em análises de

formulações farmacêuticas, uma vez que diluição excessiva das amostras pode levar a erros. Como vantagens do sistema BIA-MPA podemos citar a maior rapidez nas análises (74 h^{-1}) e etapa de preparação de amostras mais simples (sem filtração). Quando o sistema BIA-MPA é comparado com CE-C⁴D, a vantagem está no LD e na estabilidade de resposta.

4.3. Determinação simultânea de AMD e FMD

4.3.1. Comportamento eletroquímico de AMD e FMD empregando eletrodo de BDD

O comportamento eletroquímico da AMD e da FMD usando BDD como eletrodo de trabalho (Fig. 36) foi previamente investigado utilizando $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão BR, preparado em meio de água/MetOH (70:30), em diferentes valores de pH (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0). Nesse estudo foi utilizada a técnica de voltametria cíclica na janela de potencial de 0,00 a +1,60 V.

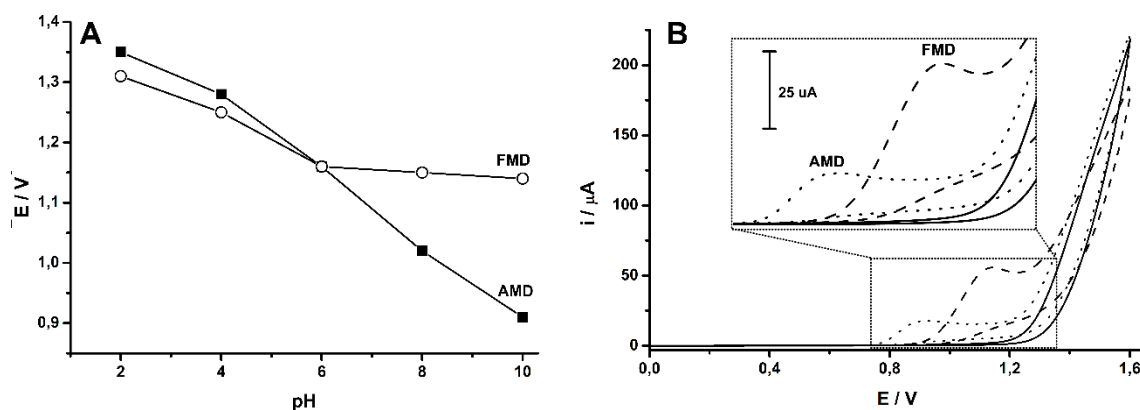


Figura 36. (A) Influência do pH nos potenciais de oxidação da AMD e FMD. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo BDD em meio de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão BR (pH = 10) preparado em água/MetOH (70:30) antes (—) e após a adição de $200,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AMD (····) ou $800,0 \text{ mg L}^{-1}$ de FMD (- - -). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Incremento de potencial: 5 mV

Como pode ser observado na Figura 36A, a melhor seletividade (maior separação entre os picos de oxidação de AMD e FMD) foi obtida em pH = 10. A Figura 36B apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em meio de solução tampão BR (Britton Robinson) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 10) sem (—) e com a adição de $200,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AMD (····) ou $800,0 \text{ mg L}^{-1}$ de FMD (- - -). Nesse e nos estudos seguintes, a relação entre as concentrações de AMD e FMD é semelhante à relação existente entre esses princípios

ativos em amostras comercialmente disponíveis (10,0 e 40,0 mg de AMD e FMD, respectivamente).

A Fig. 36A mostra que o potencial de oxidação de AMD e FMD é deslocado para valores mais negativos com o aumento do pH da solução de eletrólito de suporte. Três regiões podem ser destacadas:

- pH < 6,0: a diferença do potencial de oxidação entre estas espécies é inferior a 0,04 V;
- pH = 6,0: o potencial de oxidação é +1,16 V para as duas espécies;
- pH > 6,0: nenhuma variação significativa no potencial de oxidação da FMD é observada ($\sim +1,15$ V), enquanto que o potencial de oxidação da AMD diminui para +0,90 V em solução com pH = 10. Nesta condição, a diferença entre os picos de oxidação de AMD e FMD é máxima ($\sim 0,25$ V).

Após estes estudos, o pH = 10 foi selecionado para a determinação simultânea da AMD e da FMD usando BIA-MPA, uma vez que nesta condição foi obtida a melhor seletividade (maior separação entre os potenciais de oxidação dos compostos).

Com base nos voltamogramas cíclicos da Fig. 36B, a oxidação da AMD tem início a cerca de +0,75 V e atinge um máximo a cerca de +0,90 V, enquanto que a oxidação da FMD se inicia em +0,90 V e atinge um máximo aproximadamente em +1,15 V. Nenhum pico de redução foi observado para estas espécies na varredura reversa, sugerindo que o processo é irreversível em tais condições. De acordo com a literatura [183-185], a eletrooxidação da FMD promove a transição eletrônica $\pi - \pi^*$ (excitação) devido à formação da ligação C=N. O mecanismo de oxidação eletroquímica pode ser observado na Figura 37 e envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons.

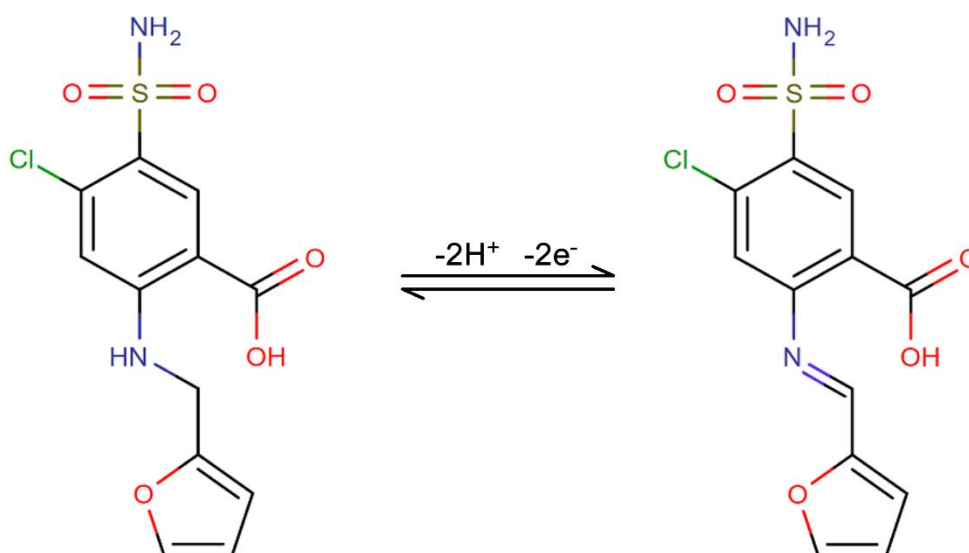


Figura 37. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica da FMD.

Dependendo do pH, dois picos voltamétricos podem ser observados. Nesse estudo, o primeiro pico ocorre em toda a faixa de pH estudados, o que corresponde a oxidação da amina na posição 6 [185], mas o segundo só existe até pH 6,0, que corresponde a ionização do grupo carboxílico [185]. É importante destacar aqui que, para a construção da curva de pH vs E foi utilizado apenas o primeiro pico de oxidação da FMD.

Para a AMD, somente um pico de oxidação foi observado na faixa de pH estudada. De acordo com a literatura [186, 187], esse pico anódico pode ser atribuído à oxidação do grupo amino e envolve a transferência de 2 prótons e 2 elétrons, como pode ser observado na Figura 38.

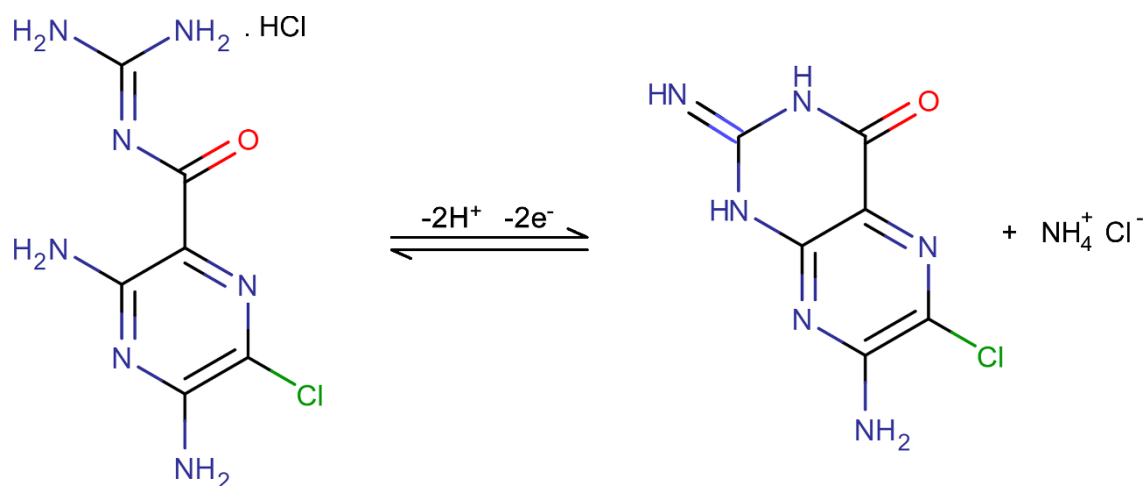


Figura 38. Esquema do provável mecanismo da oxidação eletroquímica da AMD.

O comportamento eletroquímico da AMD e da FMD também foi investigado usando o sistema BIA-MPA. Neste e nos estudos subsequentes, $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão borato ($\text{pH} = 10$) preparado em água/MetOH (70:30; v/v) foi usado como eletrólito de suporte. A preparação desta solução tampão é mais simples (em relação a solução tampão BR) e o comportamento eletroquímico das espécies nesse meio foi semelhante. A Figura 39A mostra os resultados obtidos quando 10 pulsos de potenciais sequenciais (+0,20, +0,40, +0,60, +0,80, +0,90, +1,00, +1,10, +1,20, +1,30 e +1,40 V; 100 ms cada) foram aplicados continuamente ao eletrodo de trabalho de BDD posicionado no sistema de BIA-MPA. A corrente em cada pulso de potencial foi monitorada continuamente durante duas soluções com composições diferentes: (i) $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AMD (■) ou (ii) $120,0 \text{ mg L}^{-1}$ de FMD (○). A média da corrente detectada ($n = 3$) em cada pulso de potencial foi utilizada para construir o voltamograma hidrodinâmico para AMD e FMD (Figura 39B).

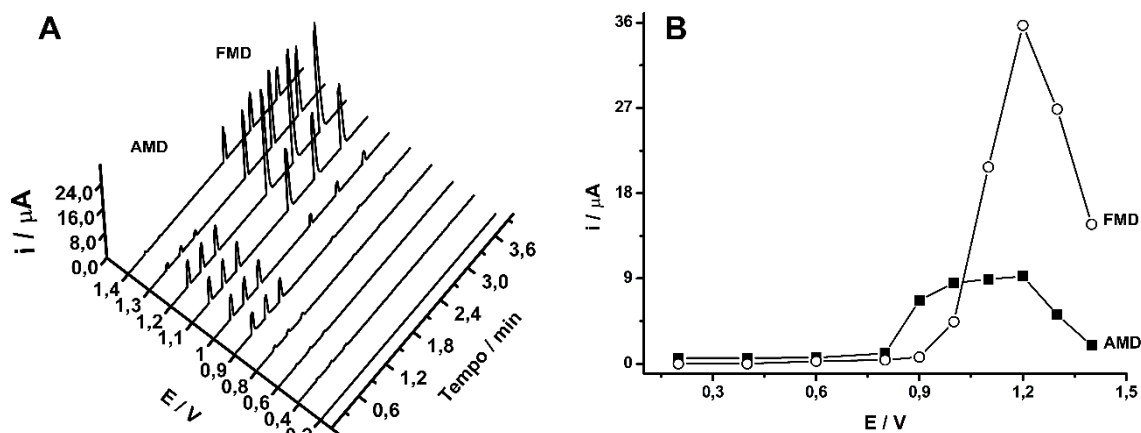


Figura 39. (A) Amperogramas obtidos com o sistema BIA-MPA após injeções em triplicata de solução contendo 30 mg L^{-1} de AMD ou 120 mg L^{-1} de FMD. (B) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos após plotar a média dos valores de corrente em função do pulso de potencial correspondente. Eletrólito de suporte: $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão borato em água/ MetOH (70:30); velocidade de injeção: $75 \mu\text{L s}^{-1}$; volume de injeção: $150 \mu\text{L}$.

Com base nesses voltamogramas hidrodinâmicos, podemos observar que na região entre $+0,80$ e $+0,85 \text{ V}$, somente a AMD é oxidada, sem a interferência de FMD. Em potenciais maiores que $+0,90 \text{ V}$, ambos os compostos foram oxidados. Além disso, a diferença entre a oxidação da FMD e AMD em $+1,20 \text{ V}$ é bastante acentuada.

4.3.2. Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de AMD e FMD por BIA-MPA

Com base nos resultados apresentados nas Figuras 36 e 39, a estratégia proposta para verificar a possibilidade de determinação simultânea de AMD e FMD por BIA-MPA foi através da aplicação dos seguintes pulsos de potenciais:

- $+0,85 \text{ V}/50 \text{ ms} \rightarrow$ oxidação da AMD, sem a interferência de FMD;
- $+1,20 \text{ V}/50 \text{ ms} \rightarrow$ oxidação de ambas as espécies (AMD e FMD);

- +0,50 V/200 ms → limpeza/reativação/condicionamento eletroquímico da superfície do eletrodo de trabalho.

A Figura 40 apresenta os amperogramas obtidos em +0,85 V/50 ms e em +1,20 V/50 ms para injeções em triplicata de soluções contendo 30,0 mg L⁻¹ de AMD ou 120,0 mg L⁻¹ de FMD ou ambos os compostos na mesma concentração (30,0 + 120,0 mg L⁻¹ de AMD + FMD, respectivamente).

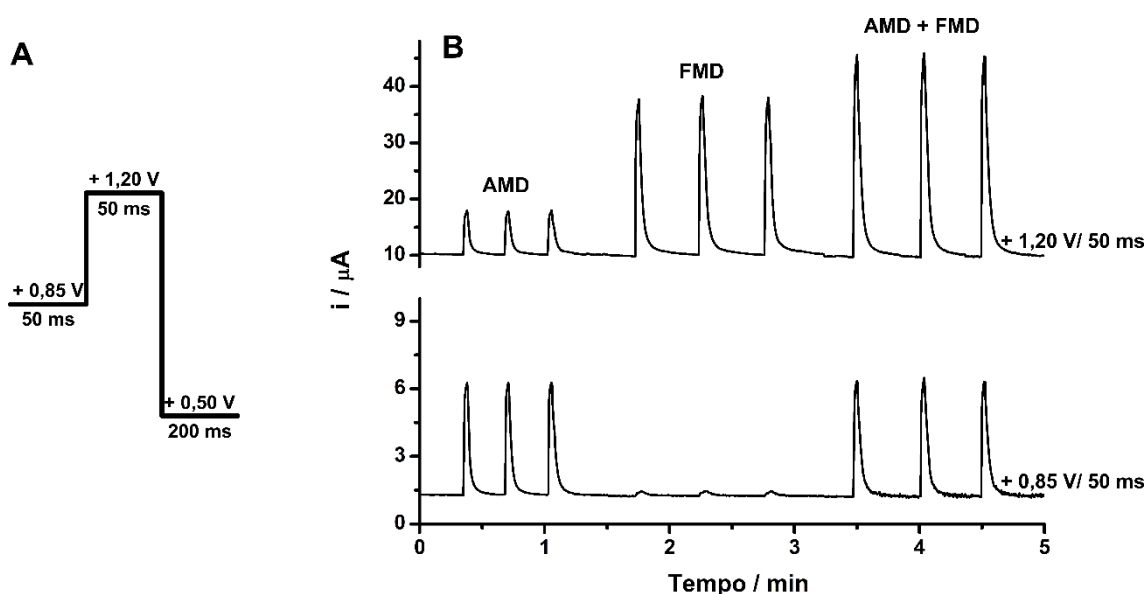


Figura 40. (A) Esquema de aplicação dos pulsos de potenciais; (B) Amperogramas obtidos com o sistema BIA-MPA para injeções em triplicata de soluções contendo somente AMD (30 mg L⁻¹), somente FMD (120 mg L⁻¹) e AMD + FMD (30 + 120 mg L⁻¹). Pulso de potencial de limpeza: + 0,50 V/ 200 ms; Velocidade de agitação: 1400 rpm; Volume de injeção: 150 μL ; Velocidade de injeção: 75 $\mu\text{L s}^{-1}$

Como pode ser observado na Fig. 40, a corrente de oxidação da AMD detectada em +0,85 V foi semelhante na presença ou ausência de FMD, indicando a ausência de interferência de FMD neste pulso de potencial e de qualquer interação química entre os compostos. Além disso, a soma das correntes de oxidação detectadas em +1,20 V para soluções contendo apenas AMD (8,2 μA) ou apenas FMD (28,5 μA) foram semelhantes

com a corrente de oxidação detectada para a solução contendo ambos os compostos com a mesma concentração (Fig. 40; AMD + FMD: 36,3 μ A). Além disso, a corrente de oxidação da AMD não é a mesma em +0,85 V (5,11 μ A) e +1,20 V (8,21 μ A). Como já discutido no item 4.2.2, devido a esta diferença, uma simples subtração entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais não dá acesso a corrente de oxidação da FMD. Desta forma, para contornar este problema, propomos novamente o uso de um FC, que corresponde à diferença exata entre a corrente detectada para AMD em +0,85 e +1,20 V. O FC pode ser determinado injetando uma solução contendo apenas AMD no sistema de BIA-MPA e através do uso da seguinte equação:

$$FC = i_{\text{AMD (+1,20 V)}}/i_{+0,85 \text{ V}}$$

Em seguida, na injeção de soluções contendo AMD + FMD, a corrente proveniente apenas de oxidação da FMD em +1,20 V pode ser calculada usando a seguinte equação:

$$i_{\text{FMD}} = i_{+1,20 \text{ V}} - (FC \times i_{+0,85 \text{ V}})$$

O valor do FC mostrou-se constante quando soluções contendo diferentes concentrações de AMD (6,0 – 30 mg L⁻¹) foram injetadas no sistema BIA-MPA. Como já dito anteriormente (item 4.2.2), podem ocorrer variações no valor do FC obtidos em diferentes dias, portanto, o mesmo deve ser calculado todos os dias antes das análises, juntamente com a curva de calibração.

4.3.3. Otimização dos parâmetros experimentais do sistema BIA-MPA

A influência dos parâmetros experimentais ou hidrodinâmicos foi estudada com o intuito de melhorar as características como estabilidade, sensibilidade e frequência de amostragem do sistema BIA-MPA. Os valores otimizados foram os seguintes: velocidade

de injeção de $75 \mu\text{L s}^{-1}$, o volume de injeção de $150 \mu\text{L}$ e a velocidade de agitação da solução de 1400 rpm. Nessas condições, o pico transiente apresentou duração em torno de 14 s ($0,33 \text{ min}$) e, usando o esquema de aplicação dos pulsos de potencial propostos na Fig. 40A, o tempo de amostragem de corrente em cada amperograma foi de 300 ms (tempo total do esquema de pulsos: $50 + 50 + 200 \text{ ms}$). Dessa forma, um pico de 14 segundos de duração tem em média 47 pontos de amostragem de corrente, como pode ser observado na Figura 41. No ápice de cada pico há três amostragens de corrente, considerado suficiente para uma boa estabilidade do método, como já discutido anteriormente (itens 4.1.3 e 4.2.3).

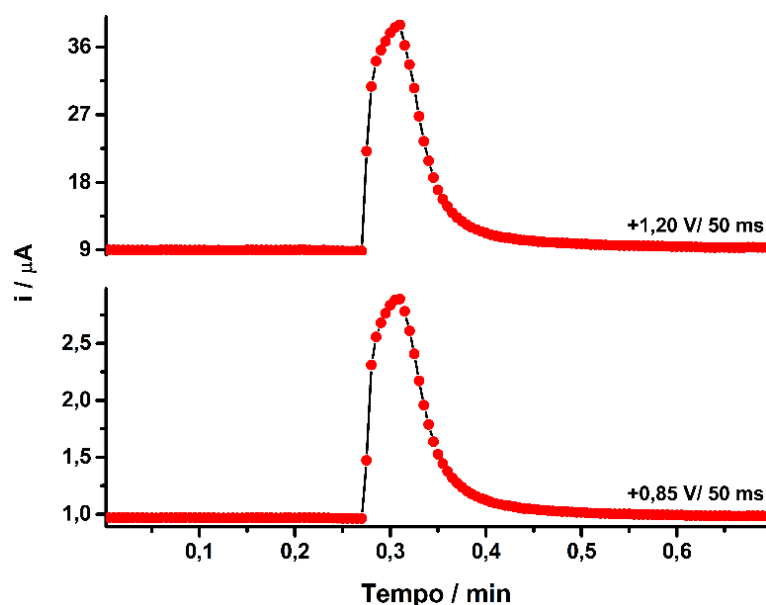


Figura 41. Picos transientes, com seus respectivos pontos (~ 47 pontos/pico), obtidos após a injeção de uma solução contendo AMD + FMD ($18 + 72 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente) no sistema BIA-AMP. Outras condições ver Fig. 28.

A influência da agitação da solução contida no interior da célula BIA pode ser observada na Figura 42, que mostra os resultados obtidos utilizando BIA com e sem agitação da solução no interior da célula.

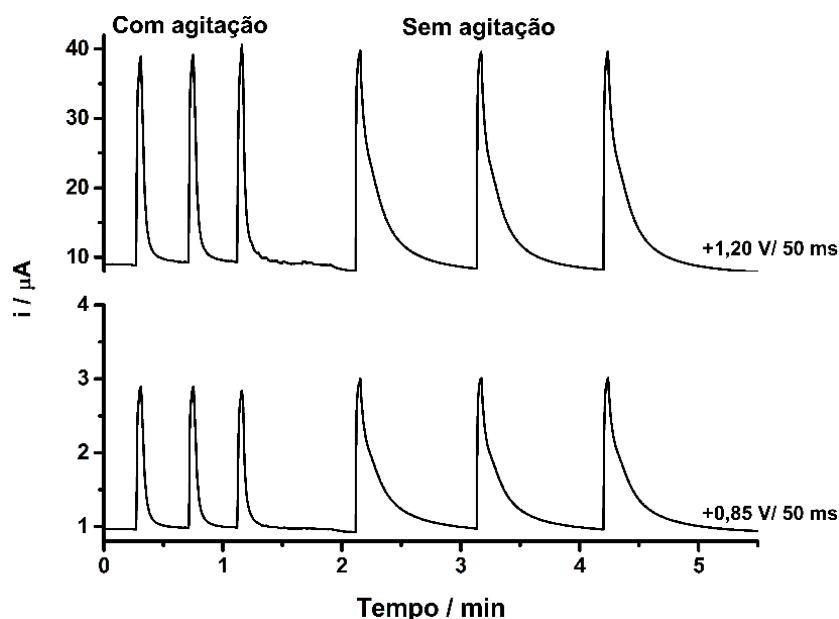


Figura 42. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA com e sem a agitação da solução contida no interior da célula. Velocidade de agitação: 1400 rpm; solução injetada: 18 mg L⁻¹ de AMD + 72 mg L⁻¹ de FMD. Outras condições ver Fig. 40.

Semelhante ao observado no item 4.2.3, essa análise pode ser realizada com ou sem agitação da solução, a diferença é que, sob agitação, a frequência de amostragem pode ser aumentada de 50,0 para 72,0 injeções h⁻¹. Isto ocorre porque os analitos e os seus respectivos produtos de oxidação são rapidamente removidos da superfície do eletrodo de trabalho, aumentando a frequência analítica e reduzindo a probabilidade de contaminação da superfície do eletrodo.

4.3.4. Estudo da repetibilidade do método

Para estudar a estabilidade de resposta do eletrodo de BDD no sistema BIA-MPA, injeções sucessivas (n = 10) de soluções contendo 6,0 + 24,0 mg L⁻¹ (a) ou 30,0 + 120,0 mg L⁻¹ (b) de AMD + FMD, respectivamente, foram realizadas. A Figura 43 apresenta os resultados obtidos.

soluções padrão contendo concentrações crescentes de AMD (b – f: 6,0 – 30,0 mg L⁻¹) e FMD (b – f: 24,0 – 120,0 mg L⁻¹) e quatro amostras (g – j) adequadamente diluídas no eletrólito de suporte. As curvas de calibração para ambos os compostos foram construídas, levando em consideração o intervalo de concentração para a qual o FC foi relativamente constante ($1,58 \pm 0,03$).

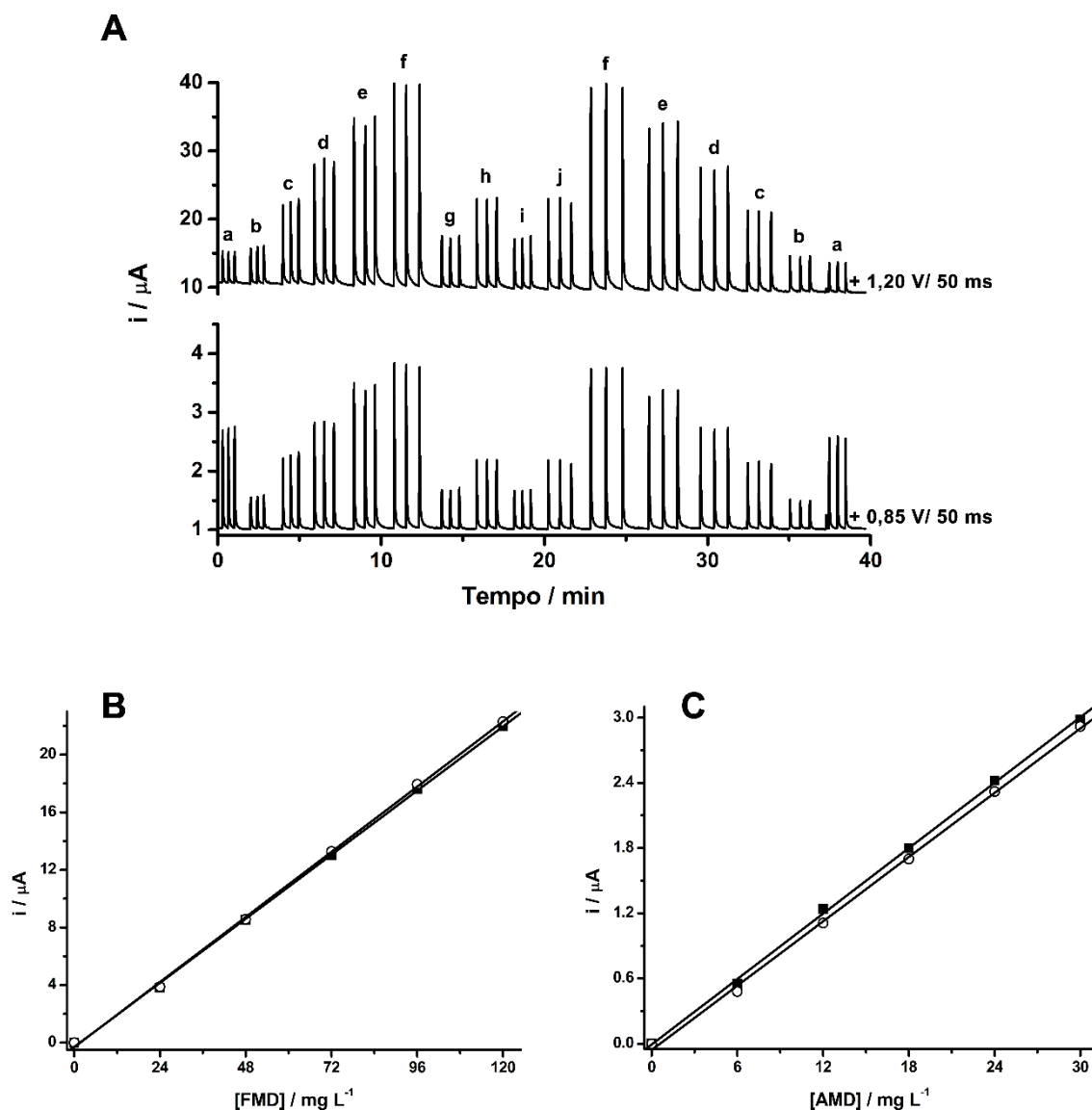


Figura 44. (A) Amperogramas obtidos no sistema BIA-MPA após a injeção em triplicata de AMD (a: 18 mg L⁻¹; para o cálculo do FC), cinco soluções padrão contendo simultaneamente concentrações crescentes de AMD (b – f: 6 a 30 mg L⁻¹) e FMD (b – f: 24 a 120 mg L⁻¹), e quatro amostras farmacêuticas (g, h, i e j) devidamente diluídas em

eletrólito de suporte; Curvas de calibração de **(B)** FMD e **(C)** AMD. Outras condições ver Fig. 40.

As curvas de calibração (Fig. 44B e 44C) apresentaram boa linearidade na faixa de concentração estudada, com as seguintes equações de calibração:

$$\text{AMD: } i (\mu\text{A}) = 0,0041 \pm 0,0090 + 0,0210 \pm 0,0005 c (\text{mg L}^{-1}); r = 0,999$$

$$\text{FMD: } i (\mu\text{A}) = -0,0679 \pm 0,0680 + 0,0339 \pm 0,0009 c (\text{mg L}^{-1}); r = 0,998$$

As soluções padrão injetadas em ordem de concentração crescente e decrescente apresentaram respostas semelhantes (baixo desvio no valor da inclinação das curvas $< 0,22\%$), o que confirma que o fenômeno de efeito de memória ou contaminação do eletrodo foi prevenido. As características analíticas do método BIA para determinação simultânea de AMD e FMD são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8. Características analíticas do método BIA-MPA para AMD e FMD.

Características	AMD	FMD
Faixa Linear (mg L⁻¹)	3,0 – 160,0	12,0 – 160,0
r	0,997	0,996
LD (mg L⁻¹)	0,13	0,94
LQ (mg L⁻¹)	0,43	3,13
Frequência analítica (injeções h⁻¹)	72,0	72,0
DPR intra-dia (n = 10)	1,1%	0,5%
DPR inter-dia (n = 6)	4,8%	5,5%

r = coeficiente de correlação linear; LD = Limite de detecção (3 S_B/b; S_B = desvio padrão do branco, n = 10, b = coeficiente angular da curva de calibração); LQ = Limite de quantificação (3,33 LD)

O desempenho do método BIA-MPA proposto foi testado na determinação simultânea de AMD e FMD em quatro amostras farmacêuticas e os resultados obtidos foram comparados com os obtidos por HPLC. A Tabela 9 mostra os resultados obtidos nas análises dessas amostras com seus respectivos desvios padrão (n = 3).

Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos para determinação simultânea de AMD e FMD por BIA e HPLC (n = 3).

Amostras	mg / capsula		AMD		FMD	
	AMD	FMD	BIA	HPLC	BIA	HPLC
1	10,0	40,0	10,4 ± 0,2	10,1 ± 0,2	36,4 ± 0,6	37,7 ± 0,7
2	10,0	40,0	9,2 ± 0,2	9,6 ± 0,2	38,5 ± 0,4	38,7 ± 0,6
3	10,0	40,0	10,0 ± 0,1	10,0 ± 0,2	39,3 ± 0,4	39,8 ± 0,6
4	10,0	40,0	9,9 ± 0,2	9,6 ± 0,2	36,7 ± 0,6	37,9 ± 0,6

O teste t de Student para amostras pareadas foi usado para comparar os valores obtidos por HPLC com os encontrados utilizando o método BIA proposto. Em um nível de confiança de 95%, os resultados médios de ambos os métodos podem ser considerados semelhantes ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}} = 3,18$; 3 graus de liberdade). Além disso, o teste F foi utilizado para avaliar a igualdade dos desvios padrão dos resultados obtidos por ambos os métodos e, em todos os casos, o $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}$ (19,0), a um nível de 95% de confiança.

4.3.6. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA e métodos publicados anteriormente.

A comparação dos parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA e por métodos disponíveis na literatura, que também descreveram a determinação simultânea de AMD e FMD, é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Comparação entre as características analíticas do método proposto e métodos analíticos anteriores para a determinação simultânea de AMD e FMD.

Método	Analitos	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	r	LD (mg L ⁻¹)	DPR (%)	F.A. (h ⁻¹)	Ref.
SP-1D	AMD	0,02 – 36,7	0,999	$4,8 \times 10^{-3}$	0,9	-	[29]
	FMD	0,02 – 26,5	0,989	$6,6 \times 10^{-3}$	0,6	-	
SP-PLS-1	AMD	1,0 – 1,6	0,999	0,022	1,0	-	[40]
	FMD	8,0 – 13,0	0,999	0,062	0,5	-	
HPLC-FL	AMD	$5,0 \times 10^{-3}$ – 0,05	-	$7,5 \times 10^{-6}$	4,1	-	[30]
	FMD	0,01 – 1,0	-	$1,0 \times 10^{-4}$	3,5	-	
HPLC-UV/FL	AMD	$5,0 \times 10^{-4}$ – 0,03	0,999	$2,5 \times 10^{-4}$	10,8	-	[31]
	FMD	0,03 – 3,0	0,999	0,01	7,3	-	
HPLC-UV	AMD	0,1 – 0,35	0,999	0,05	2,1	4	[41]
	FMD	0,8 – 2,8	0,997	0,1	2,6	4	
HPLC-UV	AMD	5,0 – 30,0	0,999	$1,2 \times 10^{-3}$	0,2	6	[42]
	FMD	40,0 – 240,0	0,999	$5,3 \times 10^{-3}$	0,3	6	
HPLC-UV	AMD	5,0 – 80,0	0,999	0,23	1,1	24	[43]
	FMD	10,0 – 100,0	0,999	0,28	1,5	24	
C-ITP	AMD	0,05 – 1,0	0,998	0,04	2,9	2,4	[44]
	FMD	0,05 – 1,0	0,998	0,05	1,8	2,4	
CE	AMD	-	-	0,31	2,2	12	[45]
	FMD	-	-	0,66	2,2	12	
EF-SFE	AMD	$3,2 \times 10^{-4}$ – 0,8	0,992	$9,6 \times 10^{-5}$	1,4	-	[27]
	FMD	$1,3 \times 10^{-3}$ – 4,0	0,998	$4,0 \times 10^{-4}$	1,2	-	
EF-SFE	AMD	$3,7 \times 10^{-4}$ – 0,8	0,999	$1,1 \times 10^{-4}$	3,8	-	[28]
	FMD	$1,2 \times 10^{-3}$ – 4,0	0,997	$3,5 \times 10^{-4}$	5,2	-	
GC-MS	AMD	2,8 – 10,0	1,0	2,8	-	15	[46]
	FMD	0,01 – 2,0	0,999	0,01	9,6	15	
BIA-MPA	AMD	3,0 – 160,0	0,997	0,13	1,1	72	Tese
	FMD	12,0 – 160,0	0,996	0,94	0,5	72	

SP-1D = espectrofotometria digital de derivada primeira; SP-PLS-1 = espectrofotometria com calibração multivariada

PLS-1; HPLC-UV/FL = HPLC com detecção de fluorescência (AMD) e UV (FMD); HPLC-UV = HPLC com detecção

UV; CE = eletroforese capilar; C-ITP = isotacoforese capilar; EF-SFE = espectrofluorimetria com extração em fase

sólida; GC-MS = cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa; F.A. = frequência analítica.

Alguns dos trabalhos publicados anteriormente realizaram a determinação simultânea de AMD e FMD em amostras de soro, plasma ou urina [28, 30, 41, 44, 46]. Nesses tipos de amostras, é importante ter ampla faixa linear e baixos LDs, uma vez que nestas amostras, os princípios ativos provavelmente se encontram em níveis traços. No entanto, como já discutido anteriormente, baixos LDs não são necessários em determinações de princípios ativos em medicamentos (proposta desse trabalho). Além disso, quando comparada com métodos anteriormente publicados, a técnica BIA-MPA mostrou ser muito mais rápida (72 h^{-1}), simples, econômica, sem etapas trabalhosas de preparo de amostras e facilmente adaptável em laboratórios com mínima infra-estrutura. Adicionalmente, é importante salientar, que o método proposto, provavelmente teria problemas com seletividade se aplicado a análise de amostras mais complexas (soro, plasma ou urina).

4.4. Determinação simultânea de SMX, TMP e FZP por BIA-MPA

A partir de estudos disponibilizados na literatura [47, 188-190], que descrevem a determinação simultânea de SMX e TMP por métodos eletroquímicos, algumas informações sobre os compostos estudados neste trabalho foram obtidas: (i) SMX e TMP apresentam baixa solubilidade em água e o uso de um solvente orgânico faz-se necessário [47, 188, 189] ; (ii) a melhor separação entre os picos de oxidação dos dois compostos usando BDD com eletrodo de trabalho ocorre em soluções com pH em torno de 7,0 [189, 190] e, portanto, esse meio foi mantido para estudar a possibilidade de determinação simultânea dos três compostos.

4.4.1. Comportamento eletroquímico de SMZ, TMP e FZP empregando eletrodo de BDD

Por meio da voltametria cíclica, o comportamento eletroquímico do SMX, da TMP e da FZP foi investigado utilizando BDD como eletrodo de trabalho e solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH = 7,0) em meio de água/MetOH (70:30). A Figura 45 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos antes (—) e após a adição de 250 mg L⁻¹ de FZP (·—·), 253 mg L⁻¹ de SMX (— — —) ou 290 mg L⁻¹ TMP (····), na janela de potencial entre -0,50 e +1,40 V.

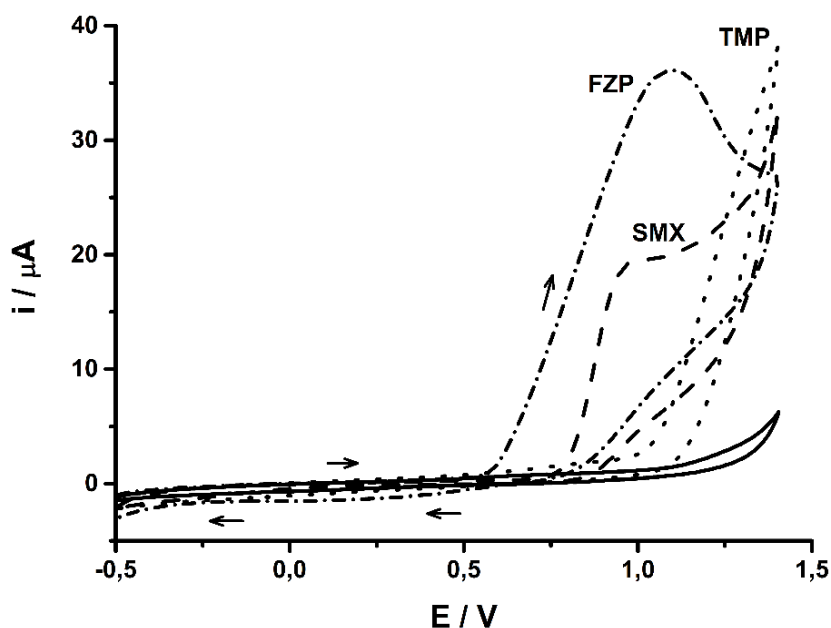


Figura 45. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de BDD e solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,0$) em água/MetOH (70:30) antes (—) e após a adição de 250, 253 ou 290 mg L^{-1} de FZP (·- ·- ·), SMX (- - -) ou TMP (····), respectivamente. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Incremento de potencial: 5 mV.

Nessas condições, a oxidação eletroquímica do SMX inicia em potenciais superiores a +0,75 V, com a transferência de dois prótons e dois elétrons formando iminobenzoquinona [48, 188, 189, 191]. Na varredura reversa, um pequeno pico catódico é observado em potenciais inferiores a 0,00 V [191] e corresponde a redução do grupo SO_2^- [192]. O mecanismo da eletrooxidação do SMX pode ser observado na Figura 46.

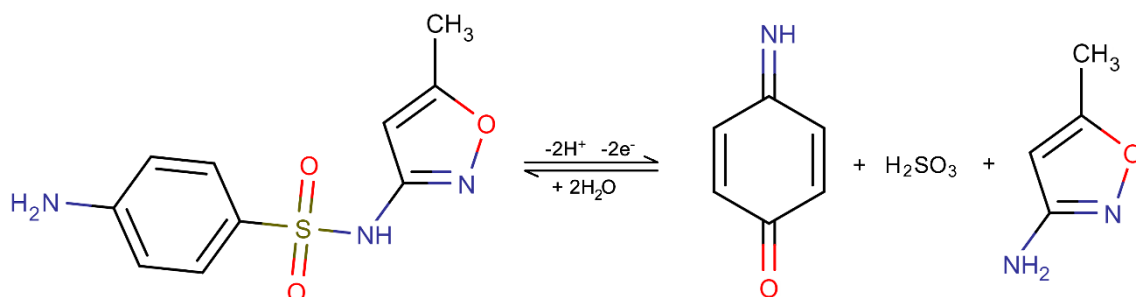


Figura 46. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica do SMX.

A eletrooxidação da TMP envolve a transferência de 4 elétrons [193] levando a formação do seu derivado nitroso em potenciais superiores a +1,00 V. Nenhuma corrente catódica foi observada na varredura reversa. A Figura 47 representa o esquema do mecanismo da eletrooxidação da TMP.

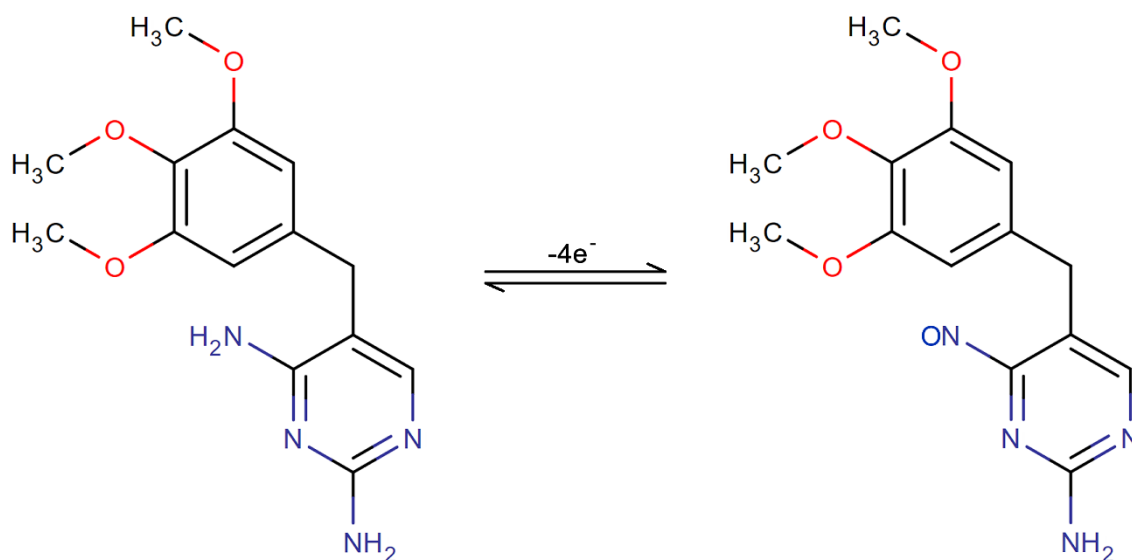


Figura 47. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica da TMP.

O voltamograma cíclico da FZP exibiu um pico de oxidação em potenciais maiores que +0,50 V e um pequeno pico de redução, na varredura reversa, em potenciais inferiores a 0,00 V. De acordo com a literatura [59, 194, 195], o processo redox envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons do grupo azo da FZP (em duas etapas) com a formação de dois átomos de :N: ; e, em seguida, uma reação de dimerização pode ocorrer entre esses dois átomos de :N: , como pode ser observado na Figura 48.

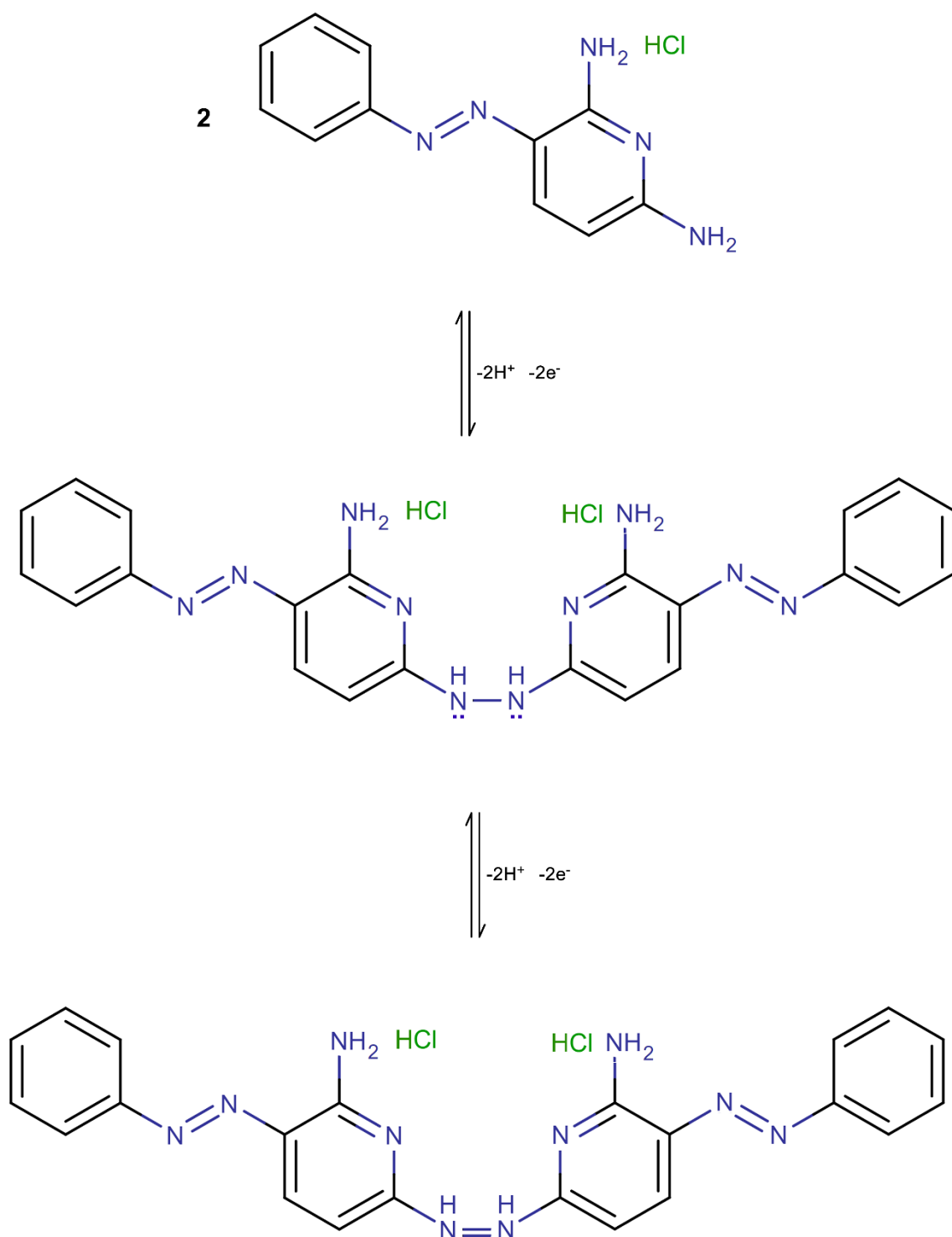


Figura 48. Esquema do mecanismo da oxidação eletroquímica da FZP.

O uso da solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,0$) em meio de água/MetOH (70:30) como eletrólito suporte proporcionou boa separação entre os picos anódicos do

SMZ, da TMP e da FZP (aproximadamente 200 mV), o que é suficiente se o objetivo é a determinação simultânea de dois ou mais compostos.

O comportamento eletroquímico do SMX, da TMP e da FZP também foi investigado usando o sistema BIA-MPA. A Figura 49A mostra os resultados obtidos quando 10 pulsos potenciais sequenciais (0,00, +0,20, +0,40, +0,60, +0,80, +1,00, +1,10, +1,20, +1,30 e +1,40 V; tempo de aplicação: 100 ms cada) foram aplicados continuamente ao eletrodo de trabalho de BDD posicionado no sistema BIA. A corrente em cada pulso de potencial foi monitorada continuamente durante a injeção de uma solução contendo 10,0 mg L⁻¹ de TMP (○), 50,0 mg L⁻¹ de SMX (■) ou 6,3 mg L⁻¹ de FZP (▲). A média da corrente detectada (n = 3) em cada pulso de potencial foi calculada e utilizada para construir o voltamograma hidrodinâmico para SMX, TMP e FZP (Figura 49B). Nesse e nos estudos seguintes, a relação de concentração entre os princípios ativos foi similar aos encontrados em amostras farmacêuticas disponíveis comercialmente (50,0, 80,0 e 400,0 mg de FZP, TMP e SMX, respectivamente).

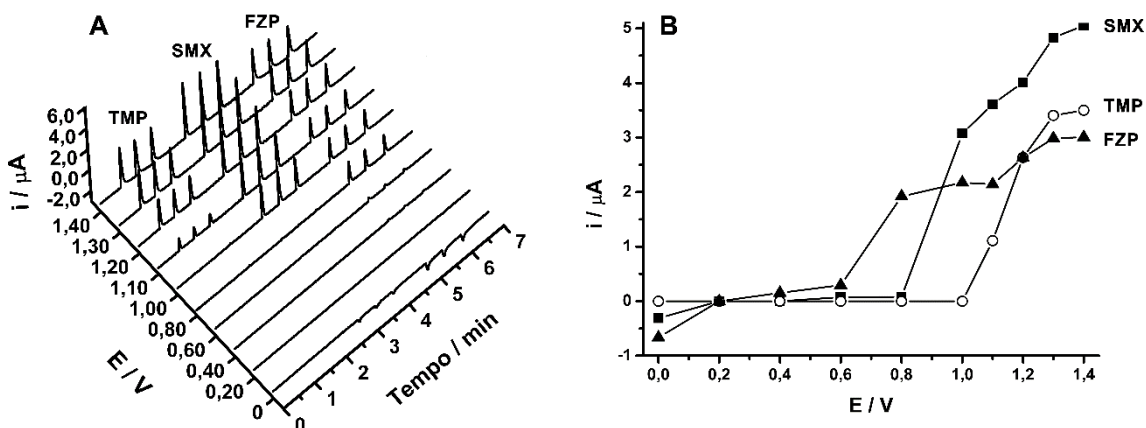


Figura 49. (A) Amperogramas obtidos com o sistema BIA-MPA após injeções em triplicatas de soluções contendo somente TMP (10 mg L⁻¹), somente SMX (50 mg L⁻¹) ou somente FZP (6,3 mg L⁻¹); (B) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos plotando a média dos valores dos picos de corrente em função dos correspondentes pulsos de potenciais

aplicados. Eletrólito de suporte: 0,05 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato (pH = 7,0) em água/MetOH (70:30); velocidade de injeção: 75 µL s⁻¹; volume de injeção: 150 µL.

A partir desses voltamogramas hidrodinâmicos pode-se concluir que entre +0,40 e +0,80 V somente FZP é oxidada sem interferência do SMX e da TMP. No pulso de potencial +1,00 V, SMX e FZP são oxidados e em pulsos de potenciais superiores a +1,00 V, os três compostos (FZP + SMX + TMP) são oxidados. Além disso, os produtos de oxidação do SMX e FZP foram detectados (redução eletroquímica) em 0,00 V. TMP apresentou corrente anódica máxima em +1,30 V.

4.4.2. Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de SMX, TMP e FZP por BIA-MPA

Com base nos resultados apresentados no item 4.4.1, os pulsos de potenciais selecionados para a determinação simultânea de SMX, TMP e FZP usando o sistema de BIA-MPA foram:

- +0,75 V/50 ms → Oxidação de FZP, sem interferência de TMP e SMX;
- +1,00 V/50 ms → Oxidação da FZP e SMX, sem interferência de TMP;
- +1,30 V/50 ms → Oxidação das três espécies (SMX +FZP +TMP);
- +1,80 V/200 ms → Limpeza/reativação da superfície do eletrodo de BDD;
- +0,20 V/100 ms → Limpeza/reativação/condicionamento da superfície do eletrodo de BDD;

A aplicação desses dois últimos pulsos de potenciais (+1,80 V/200 ms e +0,20 V/100 ms) foi necessária para evitar a contaminação/passivação da superfície do eletrodo de trabalho (BDD).

A Figura 50 apresenta os amperogramas obtidos nos pulsos de potenciais selecionados para injeções em duplicata de soluções contendo 10,0 mg L⁻¹ de TMP ou 50,0 mg L⁻¹ de SMX ou 6,25 mg L⁻¹ de FZP ou os três compostos simultaneamente na mesma concentração (10,0 mg L⁻¹ de TMP + 50,0 mg L⁻¹ de SMX + 6,25 mg L⁻¹ de FZP).

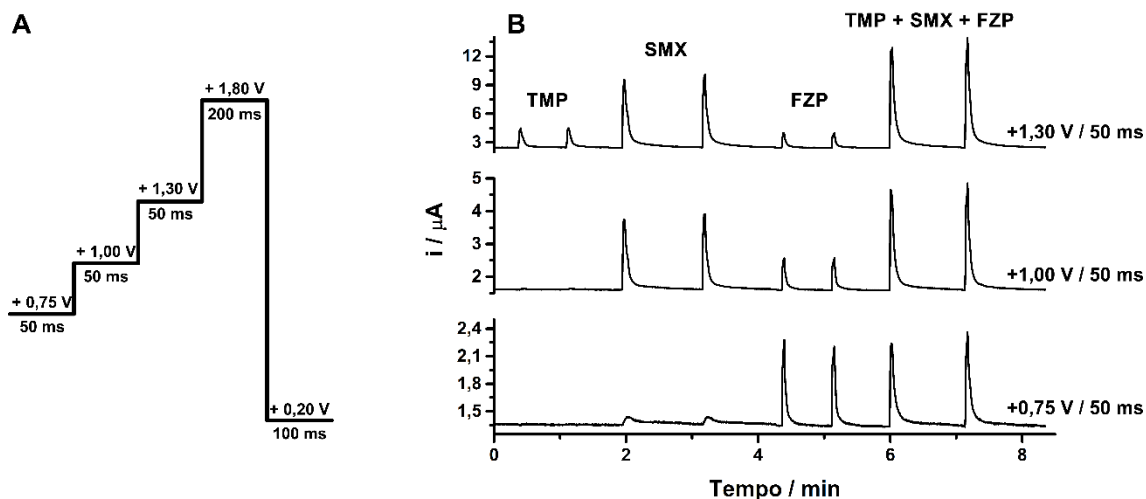


Figura 50. (A) Esquema de aplicação dos pulsos de potenciais; (B) Amperogramas obtidos por BIA-MPA após injeção de soluções ($n = 2$) contendo somente TMP (10 mg L⁻¹), somente SMX (50 mg L⁻¹), somente FZP (6,3 mg L⁻¹) e TMP + SMX + FZP (10 + 50 + 6,3 mg L⁻¹, respectivamente). Pulsos de potenciais de limpeza: + 1,80 V/ 200 ms e + 0,20 V/ 100 ms; Velocidade de agitação: 1400 rpm; Volume de injeção: 150 μ L; Velocidade de injeção: 75 μ L s⁻¹.

Respostas similares foram obtidas em +0,75 V para soluções contendo somente FZP ou os três compostos estudados (TMP + SMX + FZP). Esses resultados mostram que a FZP pode ser detectada em +0,75V sem a interferência de SMX e TMP. Em +1,00 V, SMX e FZP foram detectados sem a interferência da TMP. Nesse pulso de potencial SMX pode ser determinado seletivamente se a corrente de oxidação da FZP for previamente subtraída. Em +1,30 V, os três compostos foram detectados. TMP pode ser seletivamente determinada nesse pulso de potencial se as correntes de oxidação da FZP e SMX forem previamente subtraídas. O uso da estratégia de subtração de corrente é viável no método

proposto porque a soma das correntes de oxidação detectadas para FZP (0,99 μ A) e SMX (2,22 μ A) em +1,00 V foi similar à corrente de oxidação detectada para a solução contendo as três espécies (3,19 μ A). Do mesmo modo, a soma das correntes de oxidação detectadas para FZP (1,61 μ A), SMX (7,46 μ A) e TMP (1,99 μ A) em +1,30 V é similar à corrente de oxidação detectada para solução contendo as três espécies (11,01 μ A). No entanto, as correntes de oxidação da FZP em +0,75 V (0,86 μ A), em +1,00 V (0,99 μ A) e em +1,30 V (1,61 μ A) e de SMX em +1,00 V (2,22 μ A) e em +1,30 V (7,46 μ A) não foram as mesmas. Então, uma simples subtração entre as correntes detectadas nesses pulsos de potenciais não dá acesso as correntes de oxidação provenientes apenas da TMP, em +1,30 V, ou do SMX, em +1,00 V.

Esse problema pode ser contornado utilizando três fatores de correção (FC_1 , FC_2 e FC_3), semelhante aos calculados nos itens 4.2.2 e 4.3.2, que correspondem à diferença exata entre a corrente detectada para FZP em +0,75 e +1,00 V (FC_1) e em +0,75 e +1,30 V (FC_2) ou para SMX em +1,00 e +1,30 V (FC_3). Os FCs foram obtidos através da injeção de uma solução contendo apenas FZP (FC_1 e FC_2) ou apenas SMX (FC_3) no sistema de BIA e através das seguintes equações:

$$FC_1 = i_{FZP(+1,00\text{ V})}/i_{FZP(+0,75\text{ V})}$$

$$FC_2 = i_{FZP(+1,30\text{ V})}/i_{FZP(+0,75\text{ V})}$$

$$FC_3 = i_{SMX(+1,30\text{ V})}/i_{SMX(+1,00\text{ V})}$$

Então, após a injeção de soluções de amostras ou padrões contendo as três moléculas (TMP + SMX + FZP), as correntes originadas apenas da oxidação do SMX em +1,00 V ou apenas da TMP em +1,30 V foram calculadas usando as seguintes equações:

$$i_{SMX} = i_{+1,00\text{ V}} - (FC_1 \times i_{+0,75\text{ V}})$$

$$i_{\text{TMP}} = i_{+1,30 \text{ V}} - (FC_2 \times i_{+0,75 \text{ V}}) - (FC_3 \times i_{\text{SMX}})$$

Os FCs foram calculados todos os dias antes de cada análise, juntamente com as curvas de calibração, uma vez que variações no seu valor podem ocorrer em dias diferentes.

4.4.3. Otimização dos parâmetros experimentais para o sistema BIA

Os parâmetros experimentais do sistema BIA-MPA estudados foram os seguintes: A velocidade de injeção ($75 \mu\text{L s}^{-1}$), o volume de injeção ($150 \mu\text{L}$) e a velocidade de agitação da solução no interior da célula BIA (1400 rpm). Nessas condições, o pico transiente apresentou duração de 15 s ($0,25 \text{ min}$). Usando os pulsos de potenciais propostos na Fig. 50A, o tempo de amostragem de corrente em cada amperograma foi de 450 ms (tempo total do esquema de pulsos: $50 + 50 + 50 + 200 + 100 \text{ ms}$) e, dessa forma, um pico de 15 segundos de duração tem em média 33 pontos de amostragem de corrente, como pode ser observado na Figura 51.

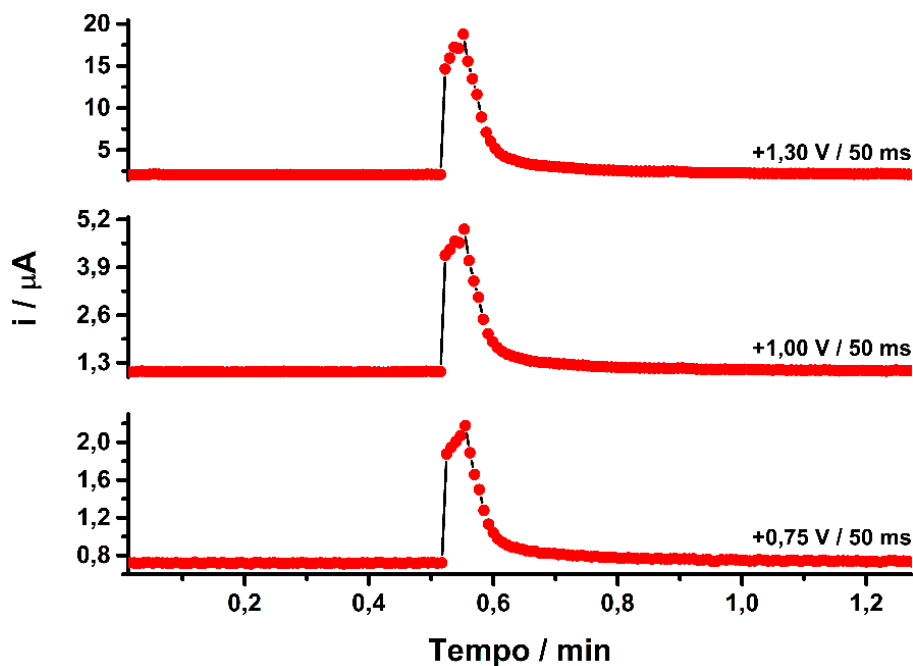


Figura 51. Picos transientes, com seus respectivos pontos de amostragem de corrente (~33 pontos/pico), obtidos após a injeção de uma solução contendo TMP + SMX + FZP (10 + 50 + 6,3 mg L⁻¹, respectivamente) no sistema BIA-MPA. Outras condições ver Fig. 50.

A amostragem da corrente ocorre em torno de quatro vezes no ápice de cada pico (Fig. 51), o que é adequado para obtenção de boa repetibilidade do método (uso da altura para construção das curvas de calibração), como já discutido anteriormente (itens 4.1.3, 4.2.3 e 4.3.3).

A influência da agitação da solução contida no interior da célula BIA foi estudada mediante injeções repetitivas de solução contendo SMX + TMP + FZP (10 + 50 + 6,3 mg L⁻¹, respectivamente). Na Figura 52 são apresentados os resultados obtidos com a injeção desta solução com e sem agitação da solução no interior da célula BIA.

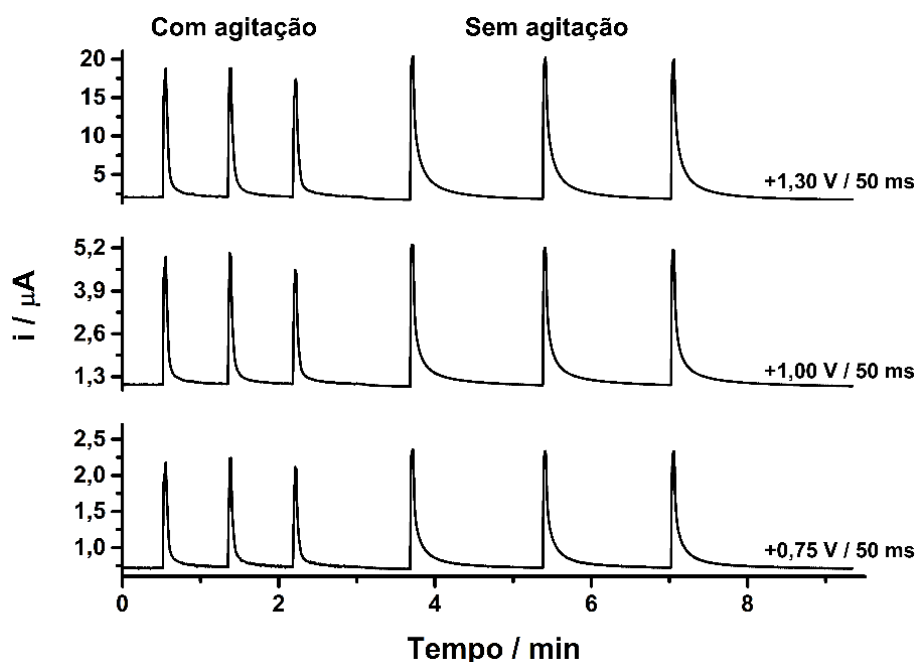


Figura 52. Respostas ($n = 3$) obtidas com o sistema BIA com a solução no interior da célula com e sem a agitação. Velocidade de agitação: 1400 rpm; solução injetada: TMP + SMX + FZP ($10 + 50 + 6,3 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente). Outras condições ver Fig. 50.

Conforme pode ser observado na Fig. 52, essa análise pode ser realizada com ou sem agitação ($1400 \pm 10 \text{ rpm}$) da solução no interior da célula, a diferença é que, sob agitação, a frequência de amostragem pode ser aumentada de 35 para 70 injeções h^{-1} . Como já justificado anteriormente, isto ocorre porque os analitos e os seus respectivos produtos de oxidação são rapidamente removidos da superfície do eletrodo de trabalho, o que, além de aumentar a frequência analítica, reduz a possibilidade de contaminação da superfície do eletrodo.

4.4.4. Estudo da repetibilidade do método

Para estudar a estabilidade do eletrodo de BDD nas condições otimizadas, injeções sucessivas ($n = 15$) de soluções contendo somente SMX, somente FZP e $1,3 + 2,0 +$

10,0 mg L⁻¹ (a) ou 6,3 + 10,0 + 50,0 mg L⁻¹ (b) de FZP + TMP + SMX, respectivamente, foram analisadas. A Figura 53 apresenta os resultados obtidos.

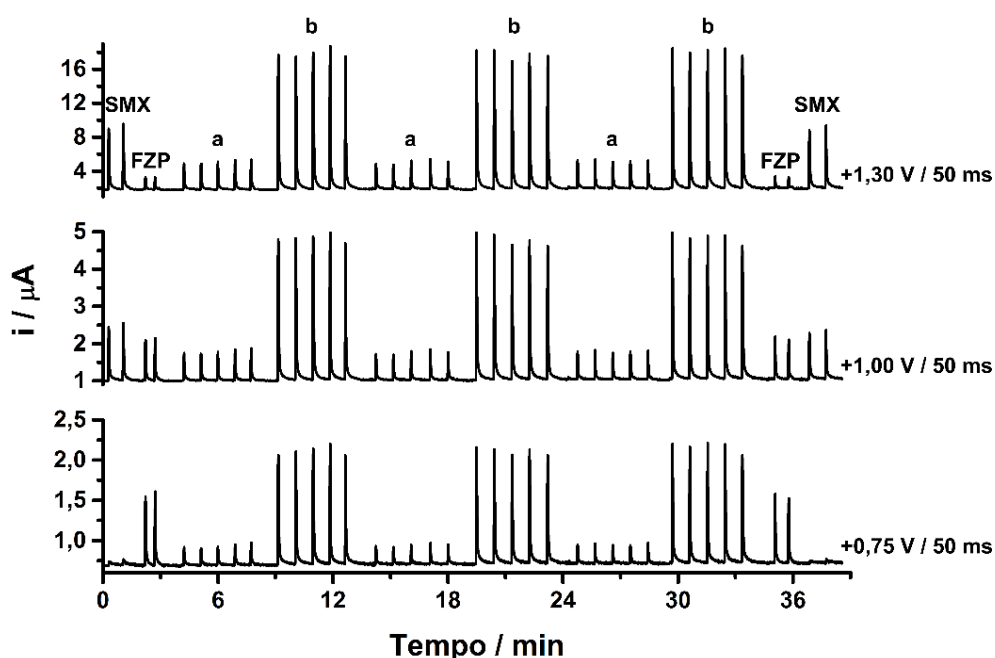


Figura 53. Amperogramas obtidos após injeções de soluções contendo somente SMX (30 mg L⁻¹) para o cálculo do FC₃, somente FZP (3,8 mg L⁻¹) para o cálculo do FC₁ e FC₂ e duas soluções de composições diferentes: **(a)** 1,3 + 2,0 + 10 mg L⁻¹ e **(b)** 6,3 + 10 + 50 mg L⁻¹ de FZP + TMP + SMX, respectivamente. Outras condições ver Fig. 50.

O DPR foi de 2,1% (a) e 1,2% (b) para FZP, 3,5% (a) e 2,5% (b) para TMP e 2,1% (a) e 1,3% (b) para SMX. Esses resultados indicam que o sistema BIA apresentou boa repetibilidade, uma vez que nenhum efeito de memória entre sucessivas injeções foi observado, mesmo trabalhando com soluções com grandes diferenças de concentrações. Tais resultados só foram obtidos após a adição dos pulsos de potenciais de +1,80 V/200 ms e +0,20 V/100 ms (limpeza eletroquímica), na rampa de potenciais aplicados de forma contínua e cíclica durante todo o experimento. A aplicação destes pulsos de potenciais adicionais preveniu ou retardou a contaminação do eletrodo de BDD.

Na ausência destes pulsos de potenciais de limpeza houve uma piora na repetibilidade do método.

4.4.5. Aplicação do sistema BIA-MPA na determinação simultânea de SMX, TMP e FZP em formulações farmacêuticas

A Figura 54 apresenta os amperogramas obtidos para injeções de soluções contendo apenas SMX (30,00 mg L⁻¹), utilizada para calcular o FC₃, apenas FZP (3,75 mg L⁻¹), utilizada para calcular FC₁ e FC₂, cinco soluções padrão contendo concentrações crescentes de FZP (a – e: 1,3 – 6,3 mg L⁻¹), TMP (a – e: 2,0 – 10,0 mg L⁻¹) e SMX (a – e: 10,0 – 50,0 mg L⁻¹) e quatro amostras (f – i) adequadamente diluídas no eletrólito de suporte. As curvas de calibração foram construídas, levando em consideração o intervalo de concentração para a qual os FCs foram relativamente constantes ($FC_1 = 1,13 \pm 0,02$; $FC_2 = 1,88 \pm 0,01$; $FC_3 = 3,35 \pm 0,02$).

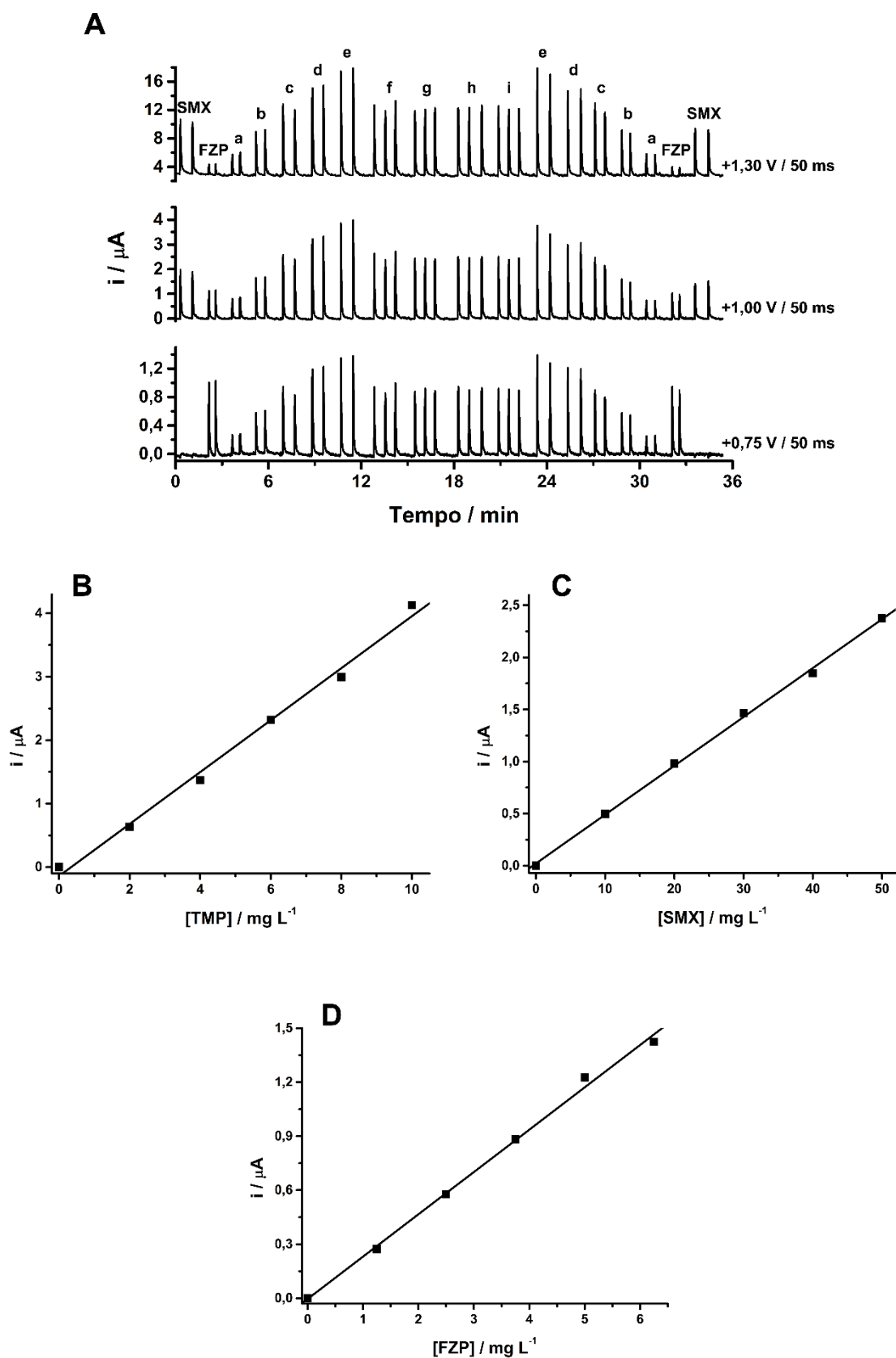


Figura 54. (A) Amperogramas obtidos com o sistema BIA-MPA após a injeção de soluções contendo SMX (30 mg L^{-1}), FZP ($3,8 \text{ mg L}^{-1}$), cinco soluções padrão contendo

simultaneamente concentrações crescentes de FZP (a – e: 1,3 a 6,3 mg L⁻¹), TMP (a – e: 2,0 a 10,0 mg L⁻¹) e SMX (a – e: 10,0 a 50,0 mg L⁻¹), e quatro amostras farmacêuticas (f, g, h e i) devidamente diluídas no eletrólito de suporte; Curvas de calibração: **(B)** TMP; **(C)** SMX e **(D)** FZP. Outras condições ver Fig. 50

As curvas de calibração (Fig. 54B, 54C e 54D) apresentaram boa linearidade na faixa de concentração estudada, com a obtenção das seguintes equações:

$$\text{TMP: } i (\mu\text{A}) = -0,14114 \pm 0,10742 + 0,40953 \pm 0,01774 c (\text{mg L}^{-1}); r = 0,996$$

$$\text{SMX: } i (\mu\text{A}) = 0,02129 \pm 0,02529 + 0,04691 \pm 0,00835 c (\text{mg L}^{-1}); r = 0,999$$

$$\text{FZP: } i (\mu\text{A}) = -0,00414 \pm 0,02573 + 0,23509 \pm 0,00680 c (\text{mg L}^{-1}); r = 0,998$$

As soluções padrão injetadas em ordem crescente e decrescente de concentração apresentaram respostas semelhantes (baixo desvio no valor da inclinação das curvas < 2,10%), o que confirma, mais uma vez, que o fenômeno de efeito de memória ou contaminação do eletrodo foi prevenido. As características analíticas do método BIA-MPA para determinação simultânea de SMX, TMP e FZP são mostradas na Tabela 11.

Tabela 11. Características analíticas do método BIA-MPA para SMX, TMP e FZP

Características	FZP	TMP	SMX
Faixa Linear (mg L⁻¹)	1,0 – 40,0	2,0 – 40,0	4,0 – 320,0
r	0,998	0,996	0,999
LD (mg L⁻¹)	0,05	0,15	0,20
LQ (mg L⁻¹)	0,17	0,50	0,68
Frequência analítica (injeções h⁻¹)	70,0	70,0	70,0
DPR intra-dia (n = 15)	1,2%	2,5%	1,3
DPR inter-dia (n = 8)	1,1%	3,1%	2,8

r = coeficiente de correlação linear; LD = Limite de detecção (3 S_B/b; S_B = desvio padrão do branco, n = 10, b = coeficiente angular da curva de calibração); LQ = Limite de quantificação (3,33 LD)

O método BIA proposto foi usado para determinação simultânea de SMX, TMP e FZP em quatro amostras farmacêuticas e os resultados foram comparados com os obtidos por HPLC. A Tabela 12 mostra os resultados das análises dessas amostras com seus respectivos desvios padrões ($n = 3$).

Tabela 12. Comparação dos resultados obtidos para determinação simultânea de TMP, SMX e FZP por BIA e HPLC ($n = 3$).

Amostras	mg / comprimido			TMP		SMX		FZP	
	TMP	SMX	FZP	BIA	HPLC	BIA	HPLC	BIA	HPLC
1	80	400	50	76 ± 3	79 ± 2	396 ± 6	384 ± 8	50 ± 2	54 ± 2
2	80	400	50	83 ± 2	79 ± 3	375 ± 6	383 ± 8	48 ± 2	54 ± 4
3	80	400	50	82 ± 2	81 ± 2	408 ± 8	395 ± 9	53 ± 1	56 ± 2
4	80	400	50	77 ± 2	80 ± 3	409 ± 6	393 ± 10	52 ± 1	54 ± 3

O teste t de Student para amostras pareadas foi usado para comparar os valores obtidos por HPLC com os encontrados utilizando o método BIA proposto. Em um nível de confiança de 95%, os resultados médios de ambos os métodos podem ser considerados semelhantes ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}} = 3,18$; 3 graus de liberdade). Além disso, o teste F foi utilizado para avaliar a igualdade dos desvios padrão dos resultados obtidos por ambos os métodos e, em todos os casos, o $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}$ (19,0) ao nível de 95% de confiança.

4.4.6. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA e métodos publicados anteriormente.

Na literatura estão disponíveis apenas dois trabalhos [62, 63] que descrevem a determinação simultânea de SMX, TMP e FZP. A Tabela 13 apresenta uma comparação

entre os parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA e pelos métodos descritos anteriormente.

Tabela 13. Comparação entre as características analíticas do método proposto e métodos analíticos anteriores para a determinação simultânea de SMX, TMP e FZP.

Método	Analitos	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	r	LD (mg L ⁻¹)	DPR (%)	F.A. (h ⁻¹)	Ref.
SP-3D	SMX	10,0 – 50,0	0,999	-	1,06	-	[63]
	TMP	4,0 – 20,0	0,999	-	1,72	-	
	FZP	2,5 – 12,5	0,999	-	0,84	-	
SP-PLS-1	SMX	-	0,999	-	1,05	-	[62]
	TMP	-	0,999	-	0,98	-	
	FZP	-	0,999	-	1,90	-	
BIA-MPA	SMX	4,0 – 320,0	0,999	0,20	1,30	70	Tese
	TMP	2,0 – 40,0	0,996	0,15	2,50	70	
	FZP	1,0 – 40,0	0,998	0,05	1,20	70	

SP-3D = espectrofotometria de derivada terceira; SP-PLS-1 = espectrofotometria com calibração multivariada PLS-1;

F.A. = frequência analítica.

A comparação entre o método proposto e os métodos descritos anteriormente para determinação simultânea de SMX, TMP e FZP foi limitada, pois não foram apresentadas informações sobre LDs e F.A. em nenhum desses trabalhos. Em todos os casos, os métodos foram lineares e precisos. A vantagem adicional da técnica BIA-MPA está na aparelhagem simples e de baixo custo, além de ser adaptável em laboratórios com infraestrutura limitada.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou com sucesso a utilização da técnica análise por injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos (BIA-MPA) empregando BDD como eletrodo de trabalho, para determinação simultânea de princípios ativos presentes em quatro medicamentos comerciais: **(1)** NIM e PAR, **(2)** COD e PRO, **(3)** AMD e FMD e **(4)** SMX, TMP e FZP.

Os estudos propostos para determinação simultânea de cada grupo desses princípios ativos apresentaram bons resultados em relação à sensibilidade, seletividade e repetibilidade ($DPR < 3,5\%$), mesmo usando um eletrodo (BDD) não modificado.

A possibilidade de aplicação dos pulsos de potenciais de limpeza foi eficiente para evitar a passivação/contaminação/desativação do eletrodo de trabalho na maioria dos casos, exceto para a determinação simultânea de PRO e COD. Nesse caso houve a necessidade de uso de alíquotas de EtOH para contornar problemas de contaminação que ocorreram após a injeção das amostras (xarope). Ainda assim, o uso do sistema BIA também se mostrou vantajoso, pois alíquotas de EtOH foram adicionadas e o sistema continuou funcionando, sem a necessidade de lavagem ou desmontagem do sistema.

Os resultados obtidos por BIA-MPA mostraram-se semelhantes aos obtidos por HPLC a um nível de confiança de 95%. No entanto, o método proposto apresenta inúmeras vantagens em relação a outros métodos disponíveis na literatura, tais como: simplicidade, portabilidade, alta frequência analítica (50 a 140 injeções h^{-1}), baixo custo (de aquisição e manutenção), uso de pequenas quantidades de reagentes e amostras (geração mínima de resíduos por análise), etapas simples de preparo das amostras (somente dissolução e/ou diluição) e potencialidade para ser empregado em análises fora do laboratório (em campo).

As inúmeras vantagens do sistema BIA-MPA permitem que empresas com menor poder aquisitivo (farmácias de manipulação, por exemplo) possam implantar estas metodologias de controle de qualidade, pois os custos de aquisição, de operação e de manutenção são consideravelmente inferiores, além da instrumentação ser adaptável em laboratórios com mínima infraestrutura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gorog S: **The sacred cow: the questionable role of assay methods in characterising the quality of bulk pharmaceuticals.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005, **36**(5):931-937.
2. Kirtawade R, Salve P, Seervi C, Kulkarni A, Dhabale P: **Simultaneous UV spectrophotometric method for estimation of paracetamol and nimesulide in tablet dosage form.** *International Journal of ChemTech Research* 2010, **2**(2):818-821.
3. AlvarezLueje A, Vasquez P, NunezVergara LJ, Squella JA: **Voltammetric study of nimesulide and its differential pulse polarographic determination in pharmaceuticals.** *Electroanalysis* 1997, **9**(15):1209-1213.
4. Chang Z, Gao N, Li Y, He X: **Preparation of ferrocene immobilized metal-organic-framework modified electrode for the determination of acetaminophen.** *Analytical Methods* 2012, **4**(12):4037-4041.
5. Yin H, Shang K, Meng X, Ai S: **Voltammetric sensing of paracetamol, dopamine and 4-aminophenol at a glassy carbon electrode coated with gold nanoparticles and an organophilic layered double hydroxide.** *Microchimica Acta* 2011, **175**(1-2):39-46.
6. Bosch ME, Sanchez AJR, Rojas FS, Ojeda CB: **Determination of paracetamol: Historical evolution.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006, **42**(3):291-321.
7. Martin FL, McLean AEM: **Comparison of paracetamol-induced hepatotoxicity in the rat in vivo with progression of cell injury in vitro in rat liver slices.** *Drug and Chemical Toxicology* 1998, **21**(4):477-494.
8. Mugford CA, Tarloff JB: **The contribution of oxidation and deacetylation to acetaminophen nephrotoxicity in female Sprague-Dawley rats.** *Toxicology letters* 1997, **93**(1):15-22.
9. Prabakar SJR, Narayanan SS: **Amperometric determination of paracetamol by a surface modified cobalt hexacyanoferrate graphite wax composite electrode.** *Talanta* 2007, **72**(5):1818-1827.

10. Miranda HF, Puig MM, Prieto JC, Pinardi G: **Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain.** *Pain* 2006, **121**(1-2):22-28.
11. Ahmed M, Upadhyaya P, Seth V: **Comparison of analgesic effects of nimesulide, paracetamol, and their combination in animal models.** *Indian Journal of Pharmacology* 2010, **42**(6):354-357.
12. Sane RT, Gadgil M: **Simultaneous determination of paracetamol, chlorzoxazone, and nimesulide by HPTLC.** *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc* 2002, **15**(1):76-78.
13. Chandratrey A, Sharma R: **Simultaneous spectrophotometric estimation and validation of three component tablet formulation containing paracetamol, nimesulide and tizanidine.** *Indian Journal of Chemical Technology* 2010, **17**(3):229-232.
14. Panusa A, Multari G, Incarnato G, Gagliardi L: **High-performance liquid chromatography analysis of anti-inflammatory pharmaceuticals with ultraviolet and electrospray-mass spectrometry detection in suspected counterfeit homeopathic medicinal products.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007, **43**(4):1221-1227.
15. Battu PR: **Simultaneous RP-HPLC determination of nimesulide and paracetamol in tablets.** *International Journal of PharmTech Research* 2009, **1**(3):514-516.
16. More SJ, Tandulwadkar SS, Nikam AR, Rathore AS, Sathiyarayanan L, Mahadik KR: **Application of HPLC for the simultaneous determination of paracetamol, chlorzoxazone, and nimesulide in pharmaceutical dosage form.** *ISRNC Chromatography* 2012, **2012**.
17. Nagoji KEV, Srinivas SV, Rao SS, Patro SS: **Simultaneous estimation of nimesulide and paracetamol in tablets by reverse phase high performance liquid chromatography.** *Asian Journal of Chemistry* 2002, **14**(2):1004-1008.
18. Gharge D, Dhabale P: **Simultaneous estimation of nimesulide and paracetamol in solid dosage form by Rp-Hplc method.** *International Journal of PharmTech Research* 2010, **2**(2):1330-1333.

19. Alizadeh T, Akhoundian M: **Promethazine determination in plasma samples by using carbon paste electrode modified with molecularly imprinted polymer (MIP): Coupling of extraction, preconcentration and electrochemical determination.** *Electrochimica Acta* 2010, **55**(20):5867-5873.
20. Bajorek P, Widdop B, Volans G: **Lack of inhibition of paracetamol absorption by codeine.** *British Journal of Clinical Pharmacology* 1978, **5**(4):346-348.
21. Shih Y, Zen JM, Yang HH: **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):827-833.
22. Somogyi A, Bochner F, Chen ZR: **Lack of effect of paracetamol on the pharmacokinetics and metabolism of codeine in man.** *European Journal of Clinical Pharmacology* 1991, **41**(4):379-382.
23. Williams DG, Hatch DJ, Howard RF: **Codeine phosphate in paediatric medicine.** *British Journal of Anaesthesia* 2001, **86**(3):413-421.
24. Zhou TS, Wang AF, Wu F, Shi GY, Fang YZ: **Studies of active ingredients in cough syrup by capillary zone electrophoresis with amperometric detection.** *Chemical Research in Chinese Universities* 2003, **19**(4):386-389.
25. LI L-j, HAO X-c, LI Y-q, CHENG H: **Determination of promethazine hydrochloride and codeine phosphate in compound codeine phosphate syrup by sweeping micellar electrokinetic chromatography in combination with cation-selective exhaustive injection.** *Journal of Instrumental Analysis* 2010, **4**:394-397.
26. Curea E, Martinovici M: **Thin-layer chromatography and uv spectrophotometry in qualitative and quantitative-analysis of drugs .2. Determination of promethazine in presence of caffeine (or codeine) in drug mixtures.** *Annales Pharmaceutiques Francaises* 1975, **33**(10):505-511.
27. Peralta CM, Fernandez LP, Masi AN: **A novel application of immobilization on membranes for the separation and spectrofluorimetric quantification of amiloride and furosemide in pharmaceutical samples.** *Analytica Chimica Acta* 2010, **661**(1):85-90.
28. Peralta CM, Fernandez LP, Masi AN: **Solid phase extraction using nylon membranes with fluorescence detection as a fast and sensitive method for Amiloride and**

- Furosemide determination in urine samples.** *Microchemical Journal* 2011, **98**(1):39-43.
29. Toral MI, Pope S, Quintanilla S, Richter P: **Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first digital derivative spectrophotometry.** *International Journal of Pharmaceutics* 2002, **249**(1-2):117-126.
 30. Reeuwijk H, Tjaden UR, Vandergreef J: **Simultaneous determination of furosemide and amiloride in plasma using high-performance liquid-chromatography with fluorescence detection.** *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 1992, **575**(2):269-274.
 31. Jankowski A, Skorek Jankowska A, Lamparczyk H: **Determination and pharmacokinetics of a furosemide-amiloride drug combination.** *Journal of Chromatography B* 1997, **693**(2):383-391.
 32. Andreasen F, Hansen U, Husted SE, Jansen JA: **The pharmacokinetics of frusemide are influenced by age.** *British Journal of Clinical Pharmacology* 1983, **16**(4):391-397.
 33. Brooks SG, Christie RB, Roche J, Fairhead AP, Muirhead D, Townsend HA, Shaw HL: **Pharmacokinetics of an oral frusemide amiloride combination tablet.** *Current Medical Research and Opinion* 1984, **9**(2):141-146.
 34. Kantelip JP, Aiache JM, Beyssac E, Abella ML: **Pharmacokinetics and urinary electrolyte excretion effects of oral frusemide and frusemide-amiloride combination tablets in healthy-subjects.** *Therapie* 1991, **46**(6):475-479.
 35. Lee MG, Chiou WL: **Evaluation of potential causes for the incomplete bioavailability of furosemide - gastric 1st-pass metabolism.** *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 1983, **11**(6):623-640.
 36. Ponto LLB, Schoenwald RD: **Furosemide (frusemide) - a pharmacokinetic pharmacodynamic review .1.** *Clinical Pharmacokinetics* 1990, **18**(5):381-408.
 37. Ismail Z, Triggs EJ, Smithurst BA, Parke W: **The pharmacokinetics of amiloride-hydrochlorothiazide combination in the young and elderly.** *European Journal of Clinical Pharmacology* 1989, **37**(2):167-171.
 38. Sabanathan K, Castleden CM, Adam HK, Ryan J, Fitzsimons TJ: **A comparative-study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of atenolol, hydrochlorothiazide**

- and amiloride in normal young and elderly subjects and elderly hypertensive patients.** *European Journal of Clinical Pharmacology* 1987, **32**(1):53-60.
39. Somogyi A, Hewson D, Muirhead M, Bochner F: **Amiloride disposition in geriatric patients - importance of renal-function.** *British Journal of Clinical Pharmacology* 1990, **29**(1):1-8.
 40. Ferraro MCF, Castellano PM, Kaufman TS: **A spectrophotometric-partial least squares (PLS-1) method for the simultaneous determination of furosemide and amiloride hydrochloride in pharmaceutical formulations.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001, **26**(3):443-451.
 41. Amin MKR, Patel DR, Shah RJ, Amin JM, Jain N, Jain DK: **Estimation of Amiloride and Furosemide in human plasma using high performance liquid chromatography.** *Der Pharmacia Sinica* 2010, **1**(3):117-125.
 42. Kachare SS, Mohite SK: **Development and validation of rp-hplc methods for simultaneous estimation of amiloride & furosemide in bulk drug and pharmaceutical dosage form.** *International Journal of Pharmaceutical Research and Development* 2013, **5**(3):51-57.
 43. Idris AM, Elgorashe REE: **Eco-friendly, cost-effective and fast method for the estimation of furosemide and amiloride in tablet formulation by sequential injection chromatography.** *Journal of Analytical Chemistry* 2014, **69**(12):1193-1198.
 44. Sadecka J, Polonsky J: **Determination of some cardiovascular drugs in serum and urine by capillary isotachopheresis.** *Journal of Chromatography A* 1996, **735**(1-2):403-408.
 45. Xu L, Mu G, Luan F, Liu H, Gao Y: **Determination of amiloride hydrochloride and furosemide in compound furosemide tablets by capillary electrophoresis combined with response surface methodology and artificial neural network.** *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2013, **36**(20):2905-2918.
 46. Morra V, Davit P, Capra R, Vincenti M, Di Stilo A, Botre F: **Fast gas chromatographic/mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine - Development and validation of a productive screening protocol for antidoping analysis.** *Journal of Chromatography A* 2006, **1135**(2):219-229.

47. Andrade LS, Rocha-Filho RC, Cass QB, Fatibello-Filho O: **Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode.** *Electroanalysis* 2009, **21**(13):1475-1480.
48. Arvand M, Ansari R, Heydari L: **Electrocatalytic oxidation and differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole using carbon nanotube paste electrode.** *Materials Science and Engineering: C* 2011, **31**(8):1819-1825.
49. Dirany A, Sires I, Oturan N, Oturan MA: **Electrochemical abatement of the antibiotic sulfamethoxazole from water.** *Chemosphere* 2010, **81**(5):594-602.
50. da Silva H, Pacheco JG, Magalhães JM, Viswanathan S, Delerue-Matos C: **MIP-graphene-modified glassy carbon electrode for the determination of trimethoprim.** *Biosensors and Bioelectronics* 2014, **52**:56-61.
51. Rajith L, Jissy A, Kumar KG, Datta A: **Mechanistic study for the facile oxidation of trimethoprim on a manganese porphyrin incorporated glassy carbon electrode.** *The Journal of Physical Chemistry C* 2011, **115**(44):21858-21864.
52. Chen Q, Li K, Zhang Z, Li P, Liu J, Li Q: **Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of phenazopyridine in rat plasma: application to the pharmacokinetic study.** *Biopharmaceutics & drug disposition* 2007, **28**(8):439-444.
53. Citak M, Yilmaz S, Dilgin Y, Turker G, Yagmur S, Erdugan H, Erdugan N: **Osteryoung square wave voltammetric determination of phenazopyridine hydrochloride in human urine and tablet dosage forms based on electrochemical reduction at carbon paste electrode.** *Current Pharmaceutical Analysis* 2007, **3**(2):141-145.
54. Demirtas C, Yilmaz S, Saglikoglu G, Sadikoglu M: **Electrochemical determination of phenazopyridine hydrochloride using poly (p-aminobenzene sulfonic acid) film modified glassy carbon electrode.** *International Journal of Electrochemical Science* 2015, **10**:1883-1892.
55. Fathinia M, Khataee A: **Photocatalytic ozonation of phenazopyridine using TiO₂ nanoparticles coated on ceramic plates: mechanistic studies, degradation intermediates and ecotoxicological assessments.** *Applied Catalysis A: General* 2015, **491**:136-154.

56. Li K-j, Chen Q-h, Zhang Z, Zhou P, Li P, Liu J, Zhu J: **Determination of phenazopyridine in human plasma by GC—MS and its pharmacokinetics.** *Journal of chromatographic science* 2008, **46**(8):686-689.
57. Rezaei B, Jafari M, Rahmanian O: **Selective pretreatment and determination of phenazopyridine using an imprinted polymer-electrospray ionization ion mobility spectrometry system.** *Talanta* 2011, **83**(3):765-769.
58. Taei M, Hasanpour F, Movahedi M, Mohammadian S: **Fast and selective determination of phenazopyridine at a novel multi-walled carbon nanotube modified ZnCrFeO₄ magnetic nanoparticle paste electrode.** *RSC Advances* 2015, **5**(47):37431-37439.
59. Yagmur S, Yilmaz S, Sadikoglu M, Saglikoglu G, Yildiz M, Yengin C, Kilinc E: **Electrooxidation of phenazopyridine hydrochloride and its voltammetric and HPLC determination in human urine and tablet dosage form.** *International Journal of Electrochemical Science* 2013, **8**(5):6818-6828.
60. Pereira A, Cass Q: **High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column.** *Journal of Chromatography B* 2005, **826**(1):139-146.
61. Anderson C, Chimhanda M, Sloan J, Galloway S, Sinacore J, Brubaker L: **Phenazopyridine does not improve catheter discomfort following gynecologic surgery.** *American journal of obstetrics and gynecology* 2011, **204**(3):267. e261-267. e263.
62. Ribone ME, Pagani AP, Olivieri AC: **Simultaneous multivariate spectrophotometric analysis of binary and ternary mixtures of sulfamethoxazole, trimethoprim and phenazopyridine in tablets.** *Analytical letters* 1999, **32**(7):1389-1401.
63. Abdel-Hay MH, El-Walily A: **Simultaneous analysis of a ternary mixture of pharmaceuticals containing trimethoprim, sulphamethoxazole, and phenazopyridine hydrochloride using third-derivative and zero-order photodiode array spectrophotometry.** *Spectroscopy letters* 1993, **26**(9):1745-1759.
64. Cinkova K, Satkovska P, Svorc Lu: **Determination of folic acid in pharmaceutical preparations by square-wave voltammetry using a boron-doped diamond electrode.** *Chemicke Listy* 2015, **109**(10):788-793.

65. Lima AB, Torres LMFC, Guimaraes CFRC, Verly RM, da Silva LM, Carvalho Junior AD, dos Santos WTP: **Simultaneous determination of paracetamol and ibuprofen in pharmaceutical samples by differential pulse voltammetry using a boron-doped diamond electrode.** *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2014, **25**(3):478-483.
66. Dejmekova H, Dag C, Barek J, Zima J: **Voltammetric and amperometric determination of metoclopramide on boron-doped diamond film electrode.** *Central European Journal of Chemistry* 2012, **10**(4):1310-1317.
67. Siangproh W, Wangfuengkanagul N, Chailapakul O: **Electrochemical oxidation of tiopronin at diamond film electrodes and its determination by amperometric flow injection analysis.** *Analytica Chimica Acta* 2003, **499**(1-2):183-189.
68. Gimenes DT, Marra MC, de Freitas JM, Abarza Munoz RA, Richter EM: **Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection.** *Sensors and Actuators B-Chemical* 2015, **212**:411-418.
69. Zhang T, Li C, Mao B, An Y: **Determination of Cd²⁺ by ultrasound-assisted square wave anodic stripping voltammetry with a boron-doped diamond electrode.** *Ionics* 2015, **21**(6):1761-1769.
70. dos Santos VB, Fava EL, Pessoa-Neto OD, Bianchi SR, Faria RC, Fatibello-Filho O: **A versatile and robust electrochemical flow cell with a boron-doped diamond electrode for simultaneous determination of Zn²⁺ and Pb²⁺ ions in water samples.** *Analytical Methods* 2014, **6**(21):8526-8534.
71. Honorio GG, Azevedo GC, Costa Matos MA, Leal de Oliveira MA, Matos RC: **Use of boron-doped diamond electrode pre-treated cathodically for the determination of trace metals in honey by differential pulse voltammetry.** *Food Control* 2014, **36**(1):42-48.
72. Kondo T, Sakai K, Watanabe T, Einaga Y, Yuasa M: **Electrochemical detection of lipophilic antioxidants with high sensitivity at boron-doped diamond electrode.** *Electrochimica Acta* 2013, **95**:205-211.
73. Svorc L, Kalcher K: **Modification-free electrochemical approach for sensitive monitoring of purine DNA bases: Simultaneous determination of guanine and adenine in biological samples using boron-doped diamond electrode.** *Sensors and Actuators B-Chemical* 2014, **194**:332-342.

74. Hason S, Pivonkova H, Vetterl V, Fojta M: **Label-free sequence-specific DNA sensing using copper-enhanced anodic stripping of purine bases at boron-doped diamond electrodes.** *Analytical Chemistry* 2008, **80**(7):2391-2399.
75. Petrucci E, Di Palma L, Lavecchia R, Zuorro A: **Treatment of diazo dye reactive green 19 by anodic oxidation on a boron-doped diamond electrode.** *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2015, **26**:116-121.
76. Medeiros RA, Lourencao BC, Rocha-Filho RC, Fatibello-Filho O: **Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode.** *Talanta* 2012, **99**:883-889.
77. Pino F, Ivandini TA, Naikata K, Fujishima A, Merkoci A, Einaga Y: **Magnetic enzymatic platform for organophosphate pesticide detection using boron-doped diamond electrodes.** *Analytical Sciences* 2015, **31**(10):1061-1068.
78. Svorc L, Rievaj M, Bustin D: **Green electrochemical sensor for environmental monitoring of pesticides: Determination of atrazine in river waters using a boron-doped diamond electrode.** *Sensors and Actuators B-Chemical* 2013, **181**:294-300.
79. Brycht M, Skrzypek S, Kaczmarek K, Burnat B, Leniart A, Gutowska N: **Square-wave voltammetric determination of fungicide fenfuram in real samples on bare boron-doped diamond electrode, and its corrosion properties on stainless steels used to produce agricultural tools.** *Electrochimica Acta* 2015, **169**:117-125.
80. Dornellas RM, Nogueira DB, Aucelio RQ: **The boron-doped diamond electrode voltammetric method for ultra-trace determination of the fungicide pyraclostrobin and evaluation of its photodegradation and thermal degradation.** *Analytical Methods* 2014, **6**(3):944-950.
81. Teixeira ME, Sedenho GC, Stradiotto NR: **Detection of several carbohydrates using boron-doped diamond electrodes modified with nickel hydroxide nanoparticles.** *Analytical Sciences* 2015, **31**(8):773-780.
82. Peckova K, Musilova J, Barek J: **Boron-doped diamond film electrodes-new tool for voltammetric determination of organic substances.** *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2009, **39**(3):148-172.

83. Yu H, Ma C, Quan X, Chen S, Zhao H: **Flow injection analysis of chemical oxygen demand (COD) by using a boron-doped diamond (BDD) electrode.** *Environmental Science & Technology* 2009, **43**(6):1935-1939.
84. Suryanarayanan V, Zhang Y, Yoshihara S, Shirakashi T: **Amperometric determination of sodium thiosulphate using boron-doped diamond electrodes applied to flow injection analysis.** *Sensors and Actuators B-Chemical* 2004, **102**(1):169-173.
85. Sarada BV, Rao TN, Tryk DA, Fujishima A: **Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron doped diamond electrodes.** *Analytical Chemistry* 2000, **72**(7):1632-1638.
86. Pleskov YV: **Electrochemistry of diamond: A review.** *Russian Journal of Electrochemistry* 2002, **38**(12):1275-1291.
87. de Barros RDM, Ribeiro MC, An-Sumodjo PT, Juliao MSD, Serrano SHP, Ferreira NG: **Boron-doped CVD diamond films. Part 1. History, production and characterization.** *Quimica Nova* 2005, **28**(2):317-325.
88. Spear KE, Dismukes JP: **Synthetic diamond: emerging CVD science and technology**, vol. 25: John Wiley & Sons; 1994.
89. Celii F, Butler J: **Diamond chemical vapor deposition.** *Annual Review of Physical Chemistry* 1991, **42**(1):643-684.
90. DeClements R, Hirsche BL, Granger MC, Xu J, Swain GM: **Freestanding diamond thin films grown on glassy carbon substrates.** *Journal of The Electrochemical Society* 1996, **143**(7):L150-L153.
91. Ferreira N, Silva L, Corat E: **Electrochemical activity of boron-doped diamond electrodes grown on carbon fiber cloths.** *Diamond and related materials* 2002, **11**(3):657-661.
92. Swain GM: **Solid electrode materials: pretreatment and activation.** *Handbook of Electrochemistry* 2007, **1**.
93. Kraft A: **Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material.** *International Journal of Electrochemical Science* 2007, **2**(5):355-385.

94. Alfaro MAQ, Ferro S, Martínez-Huitle CA, Vong YM: **Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment.** *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2006, **17**(2):227-236.
95. Pleskov YV: **Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis.** *Journal of Analytical Chemistry* 2000, **55**(11):1045-1050.
96. Suffredini HB, Pedrosa VA, Codognoto L, Machado SAS, Rocha RC, Avaca LA: **Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment.** *Electrochimica Acta* 2004, **49**(22-23):4021-4026.
97. 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.** *The Journal of Physical Chemistry B* 2006, **110**(39):19426-19432.
98. Notsu H, Yagi I, Tatsuma T, Tryk DA, Fujishima A: **Surface carbonyl groups on oxidized diamond electrodes.** *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2000, **492**(1):31-37.
99. 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):1213-1219.
100. Terashima C, Rao TN, Sarada B, Kubota Y, Fujishima A: **Direct electrochemical oxidation of disulfides at anodically pretreated boron-doped diamond electrodes.** *Analytical chemistry* 2003, **75**(7):1564-1572.
101. 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):1183-1188.
102. Sartori ER, Medeiros RA, Rocha-Filho RC, Fatibello-Filho O: **Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need of previous alkaline hydrolysis step.** *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2009, **20**(2):360-366.
103. Panizza M, Cerisola G: **Application of diamond electrodes to electrochemical processes.** *Electrochimica Acta* 2005, **51**(2):191-199.

104. Medeiros RA, Carvalho AE, Rocha-Filho RC, Fatibello-Filho O: **Determinação voltamétrica de ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando um eletrodo de diamante dopado com boro.** *Quim Nova* 2008, **31**(6):1405-1409.
105. Rao T, Fujishima A: **Recent advances in electrochemistry of diamond.** *Diamond and Related Materials* 2000, **9**(3):384-389.
106. Swain GM, Anderson AB, Angus JC: **Applications of diamond thin films in electrochemistry.** *MRS bulletin* 1998, **23**(09):56-60.
107. Martin HB, Argoitia A, Angus JC, Landau U: **Voltammetry studies of single-crystal and polycrystalline diamond electrodes.** *Journal of the Electrochemical Society* 1999, **146**(8):2959-2964.
108. Martin HB, Argoitia A, Landau U, Anderson AB, Angus JC: **Hydrogen and oxygen evolution on boron-doped diamond electrodes.** *Journal of the Electrochemical Society* 1996, **143**(6):L133-L136.
109. Rao TN, Tryk D, Hashimoto K, Fujishima A: **Band-edge movements of semiconducting diamond in aqueous electrolyte induced by anodic surface treatment.** *Journal of the Electrochemical Society* 1999, **146**(2):680-684.
110. Pelskov YV, Sakharova AY, Krotova M, Bouilov L, Spitsyn B: **Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond.** *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry* 1987, **228**(1):19-27.
111. Swain GM, Ramesham R: **The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes.** *Analytical Chemistry* 1993, **65**(4):345-351.
112. Ramesham R: **Effect of annealing and hydrogen plasma treatment on the voltammetric and impedance behavior of the diamond electrode.** *Thin Solid Films* 1998, **315**(1):222-228.
113. Granger MC, Swain GM: **The influence of surface interactions on the reversibility of Ferri/Ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes.** *Journal of the Electrochemical Society* 1999, **146**(12):4551-4558.
114. Goeting CH, Marken F, Gutiérrez-Sosa A, Compton RG, Foord JS: **Electrochemically induced surface modifications of boron-doped diamond electrodes: an X-ray**

- photoelectron spectroscopy study.** *Diamond and Related Materials* 2000, **9**(3):390-396.
115. Notsu H, Yagi I, Tatsuma T, Tryk DA, Fujishima A: **Introduction of oxygen-containing functional groups onto diamond electrode surfaces by oxygen plasma and anodic polarization.** *Electrochemical and solid-state letters* 1999, **2**(10):522-524.
 116. Notsu H, Fukazawa T, Tatsuma T, Tryk DA, Fujishima A: **Hydroxyl groups on boron-doped diamond electrodes and their modification with a silane coupling agent.** *Electrochemical and Solid-State Letters* 2001, **4**(3):H1-H3.
 117. Fujishima A, Rao TN, Popa E, Sarada B, Yagi I, Tryk D: **Electroanalysis of dopamine and NADH at conductive diamond electrodes.** *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1999, **473**(1):179-185.
 118. Ohta N, Nakabayashi S, Fujishima A: **Surface transition kinetics on synthetic metallic diamond.** *Chemistry Letters* 1999(11):1147-1148.
 119. Katsuki N, Takahashi E, Toyoda M, Kurosu T, Iida M, Wakita S, Nishiki Y, Shimamune T: **Water electrolysis using diamond thin-film electrodes.** *Journal of The Electrochemical Society* 1998, **145**(7):2358-2362.
 120. Salazar-Banda GR, Andrade LS, Nascente PAP, Pizani PS, Rocha RC, Avaca LA: **On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments.** *Electrochimica Acta* 2006, **51**(22):4612-4619.
 121. Fisher V, Gandini D, Laufer S, Blank E, Comninellis C: **Preparation and characterization of Ti/Diamond electrodes.** *Electrochimica acta* 1998, **44**(2):521-524.
 122. Perret A, Haenni W, Skinner N, Tang X-M, Gandini D, Comninellis C, Correa B, Foti G: **Electrochemical behavior of synthetic diamond thin film electrodes.** *Diamond and related materials* 1999, **8**(2):820-823.
 123. Mahé E, Devilliers D, Comninellis C: **Electrochemical reactivity at graphitic micro-domains on polycrystalline boron doped diamond thin-films electrodes.** *Electrochimica acta* 2005, **50**(11):2263-2277.
 124. Wang J, Taha Z: **Batch injection analysis.** *Analytical chemistry* 1991, **63**(10):1053-1056.

125. Wang J: **Injection analysis—from flow-injection analysis to batch-injection analysis.** *Microchemical journal* 1992, **45**(2):219-224.
126. Pereira PF, Marra MC, Lima AB, dos Santos WTP, Munoz RAA, Richter EM: **Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode.** *Diamond and Related Materials* 2013, **39**:41-46.
127. Wang J, Chen L, Angnes L, Tian B: **Computerized pipettes with programmable dispensation.** *Analytica chimica acta* 1992, **267**(1):171-177.
128. Gimenes DT, Pereira PF, Cunha RR, Bezerra da Silva RA, Munoz RAA, Richter EM: **A simple strategy to improve the accuracy of the injection step in batch injection analysis systems with amperometric detection.** *Electroanalysis* 2012, **24**(9):1805-1810.
129. Tormin TF, Cunha RR, da Silva RAB, Munoz RAA, Richter EM: **Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system.** *Sensors and Actuators B: Chemical* 2014, **202**:93-98.
130. Wang J, Angnes L: **Batch injection spectroscopy.** *Analytical letters* 1993, **26**(11):2329-2339.
131. Wang J, Rayson G, Taha Z: **Batch injection analysis using fiber-optic fluorometric detection.** *Applied spectroscopy* 1992, **46**(1):107-110.
132. Amine A, Kauffmann J-M, Palleschi G: **Investigation of the batch injection analysis technique with amperometric biocatalytic electrodes using a modified small-volume cell.** *Analytica chimica acta* 1993, **273**(1):213-218.
133. Brett C, Brett AMO, Mitoseriu LC: **Amperometric batch injection analysis: Theoretical aspects of current transients and comparison with wall-jet electrodes in continuous flow.** *Electroanalysis* 1995, **7**(3):225-229.
134. Fernandes JCB, Garcia CAB, Grandin LA, Oliveira Neto Gd, Godinho OE: **Determination of acetylsalicylic acid in tablets with salicylate ion selective electrode in a batch injection analysis system.** *Journal of the Brazilian Chemical Society* 1998, **9**(3):249-251.

135. Brett CM, Oliveira Brett AM, Mitoseriu LC: **Amperometric and voltammetric detection in batch injection analysis.** *Analytical Chemistry* 1994, **66**(19):3145-3150.
136. Brett AMO, Matysik FM, Vieira MT: **Thin-film gold electrodes produced by magnetron sputtering. Voltammetric characteristics and application in batch injection analysis with amperometric detection.** *Electroanalysis* 1997, **9**(3):209-212.
137. Quintino MdSM, Winnischofer H, Nakamura M, Araki K, Toma HE, Angnes L: **Amperometric sensor for glucose based on electrochemically polymerized tetraruthenated nickel-porphyrin.** *Analytica chimica acta* 2005, **539**(1):215-222.
138. Quintino MS, Angnes L: **Bia-amperometric quantification of salbutamol in pharmaceutical products.** *Talanta* 2004, **62**(2):231-236.
139. Brett AMCFO, Brett CMA: **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**, vol. 1: Almedina Coimbra; 1996.
140. Santos WTPd, Gimenes DT, Richter EM, Angnes L: **Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações.** *Química Nova* 2011, **34**:1753-1761.
141. da Silva RAB, Gimenes DT, Tormin TF, Munoz RAA, Richter EM: **Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode.** *Analytical Methods* 2011, **3**(12):2804-2808.
142. Silva WC, Pereira PF, Marra MC, Gimenes DT, Cunha RR, da Silva RAB, Munoz RAA, Richter EM: **A simple strategy for simultaneous determination of paracetamol and caffeine using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection.** *Electroanalysis* 2011, **23**(12):2764-2770.
143. Tormin TF, Cunha RR, Richter EM, Munoz RA: **Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection.** *Talanta* 2012, **99**:527-531.
144. Gimenes DT, Cunha RR, Ribeiro M, Pereira PF, Munoz RAA, Richter EM: **Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac.** *Talanta* 2013, **116**:1026-1032.

145. 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):215-220.
146. dos Santos WTP, de Almeida EGN, Ferreira A, Eustáquio H, Gimenes DT, Richter EM: **Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection.** *Electroanalysis* 2008, **20**(17):1878-1883.
147. dos Santos WTP, Gimenes DT, de Almeida EGN, Eiras SdP, Albuquerque YDT, Richter EM: **Simple flow injection amperometric system for simultaneous determination of dipyrone and paracetamol in pharmaceutical formulations.** *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2009, **20**(7):1249-1255.
148. Santos AM, Vicentini FC, Figueiredo-Filho LC, Deroco PB, Fatibello-Filho O: **Flow injection simultaneous determination of acetaminophen and tramadol in pharmaceutical and biological samples using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode.** *Diamond and Related Materials* 2015, **60**:1-8.
149. Lourencao BC, Medeiros RA, Fatibello-Filho O: **Simultaneous determination of antihypertensive drugs by flow injection analysis using multiple pulse amperometric detection with a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode.** *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2015, **754**:154-159.
150. Medeiros RA, Lourencao BC, Rocha-Filho RC, Fatibello-Filho O: **Simple flow injection analysis system for simultaneous determination of phenolic antioxidants with multiple pulse amperometric detection at a boron-doped diamond electrode.** *Analytical chemistry* 2010, **82**(20):8658-8663.
151. Freitas JM, Oliveira TdC, Gimenes DT, Munoz RAA, Richter EM: **Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection.** *Talanta* 2016, **146**:670-675.
152. Chaves SC, Aguiar PN, Torres LM, Gil ES, Luz R, Damos FS, Munoz RA, Richter EM, dos Santos WT: **Simultaneous determination of caffeine, ibuprofen, and paracetamol by flow-injection analysis with multiple-pulse amperometric detection on boron-doped diamond electrode.** *Electroanalysis* 2015, **27**(12):2785-2791.
153. Silva AA: **Determinação de besilato de amlodipina e atenolol utilizando eletrodo de diamante dopado com boro e análise por injeção em batelada com detecção amperométrica.** *Dissertação de mestrado.* Universidade Federal de Uberlândia; 2015.

154. Quintino MSM, Angnes L: **Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool.** *Electroanalysis* 2004, **16**(7):513-523.
155. Borkar D, Godse V, Bafana Y, Bhosale A, Tal-Purandar D-P: **Simultaneous estimation of paracetamol and promethazine hydrochloride in pharmaceutical formulations by a RP-HPLC method.** *International Journal of ChemTech Research* 2009, **1**(3):667-670.
156. Kachare SS, Mohite SK: **Development and validation of RP-HPLC methods for simultaneous estimation of amiloride and furosemide in bulk drug and pharmaceutical dosage form.** *International Journal of Pharmaceutical Research and Development* 2013, **5**(3):51-57.
157. Pedrotti JJ, Angnes L, Gutz IGR: **Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions.** *Electroanalysis* 1996, **8**(7):673-675.
158. Tormin TF, Gimenes DT, Richter EM, Abarza Munoz RA: **Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection.** *Talanta* 2011, **85**(3):1274-1278.
159. INMETRO: **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008.** Edição 04 - Julho/2011.
160. Skoog DA, West DM, Holler FJ: **Fundamentos de química analítica:** Reverté; 1997.
161. BRITO NM, JUNIOR OPDA, POLESE L, RIBEIRO ML: **Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão.** In: *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente.* vol. 13. Curitiba; 2003: 129-146.
162. Thompson M, Ellison SL, Wood R: **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report).** *Pure and Applied Chemistry* 2002, **74**(5):835-855.
163. Custodio R, Andrade JCd, Augusto F: **Curve fitting of mathematical functions to experimental data.** *Química Nova* 1997, **20**(2):219-225.
164. Chui QS, Zucchini RR, Lichtig J: **Quality of measurements in analytical chemistry study of case: cadmium determination by flame atomic absorption spectrophotometry.** *Química Nova* 2001, **24**(3):374-380.
165. Miner DJ, Rice JR, Riggin RM, Kissinger PT: **Voltammetry of acetaminophen and its metabolites.** *Analytical Chemistry* 1981, **53**(14):2258-2263.

166. Pio dos Santos WT, Nascimento de Almeida EG, Alves Ferreira HE, Gimenes DT, Richter EM: **Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection.** *Electroanalysis* 2008, **20**(17):1878-1883.
167. Wangfuengkanagul N, Chailapakul O: **Electrochemical analysis of acetaminophen using a boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002, **28**(5):841-847.
168. Furlanetto S, Orlandini S, Aldini G, Gotti R, Dreassi E, Pinzauti S: **Designing experiments to optimise and validate the adsorptive stripping voltammetric determination of nimesulide.** *Analytica Chimica Acta* 2000, **413**(1-2):229-239.
169. Pereira PF, Marra MC, Munoz RAA, Richter EM: **Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol.** *Talanta* 2012, **90**:99-102.
170. Catarino RIL, Conceicao ACL, Garcia MBQ, Goncalves MLS, Lima J, dos Santos MMC: **Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003, **33**(4):571-580.
171. Li Y, Li K, Song G, Liu J, Zhang K, Ye B: **Electrochemical behavior of codeine and its sensitive determination on graphene-based modified electrode.** *Sensors and Actuators B-Chemical* 2013, **182**:401-407.
172. Ribeiro FWP, Cardoso AS, Portela RR, Lima JE, Machado SA, de Lima-Neto P, De Souza D, Correia AN: **Electroanalytical determination of promethazine hydrochloride in pharmaceutical formulations on highly boron-doped diamond electrodes using square-wave adsorptive voltammetry.** *Electroanalysis* 2008, **20**(18):2031-2039.
173. Câmpean A, Tertiş M, Săndulescu 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):688-700.
174. Pournaghi-Azar M, 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):293-298.

175. Pournaghi-Azar MH, 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):1689-1695.
176. Baxter R, Svehla G, Kerr B, Woolfson A: **Determination of promethazine by anodic differential-pulse voltammetry.** *Analytica chimica acta* 1984, **164**:171-180.
177. Ni YN, Wang L, Kokot S: **Voltammetric determination of chlorpromazine hydrochloride and promethazine hydrochloride with the use of multivariate calibration.** *Analytica Chimica Acta* 2001, **439**(1):159-168.
178. Uslu B, Biryol I, Ozkan SA, Senturk Z: **Voltammetric determination of promethazine by platinum and glassy carbon electrodes.** *Turkish Journal of Chemistry* 1996, **20**(4):323-328.
179. Blankert B, Hayen H, van Leeuwen S, Karst U, Bodoki E, Lotrean S, Sandulescu R, Diez NM, Dominguez O, Arcos J: **Electrochemical, chemical and enzymatic oxidations of phenothiazines.** *Electroanalysis* 2005, **17**(17):1501-1510.
180. Sackett PH, Mayausky J, Smith T, Kalus S, McCreery RL: **Side-chain effects on phenothiazine cation radical reactions.** *Journal of medicinal chemistry* 1981, **24**(11):1342-1347.
181. de Miranda JA, Cunha RR, Gimenes DT, Munoz RA, Richter EM: **Determinação simultânea de ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica pulsada.** *Quim Nova* 2012, **35**(7):1459-1463.
182. Pereira PF, Marra MC, Cunha RR, da Silva WP, Munoz RAA, Richter EM: **Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine.** *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2014, **713**:32-38.
183. Barroso MB, Alonso RM, Jiménez RM: **Electrochemical determination of the loop diuretics piretanide and furosemide in pharmaceutical formulations and urine.** *Analytica chimica acta* 1995, **305**(1):332-339.
184. Malode SJ, Abbar JC, Shetti NP, Nandibewoor ST: **Voltammetric oxidation and determination of loop diuretic furosemide at a multi-walled carbon nanotubes paste electrode.** *Electrochimica Acta* 2012, **60**:95-101.

185. Semaan FS, Pinto EM, Cavaleiro ETG, Brett CMA: **A graphite-polyurethane composite electrode for the analysis of furosemide.** *Electroanalysis* 2008, **20**(21):2287-2293.
186. Desai PB, Srivastava AK: **Determination of amiloride at Nafion-CNT-nano-composite film sensor employing adsorptive stripping differential pulse voltammetry.** *Sensors and Actuators B-Chemical* 2012, **169**:341-348.
187. Zayed SIM, Arida HAM: **Preparation of carbon paste electrodes and its using in voltammetric determination of amiloride hydrochloride using in the treatment of high blood pressure.** *International Journal of Electrochemical Science* 2013, **8**(1):1340-1348.
188. Andrade LS, Rocha-Filho RC, Cass QB, Fatibello-Filho O: **A novel multicommutation stopped-flow system for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by differential pulse voltammetry on a boron-doped diamond electrode.** *Analytical Methods* 2010, **2**(4):402-407.
189. Pereira PF, Silva WPd, Muñoz RAA, Richter EM: **Fast and simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim using batch injection analysis with amperometric detection and boron-doped diamond electrode.** *Química Nova* 2015, **38**(5):663-668.
190. Cesarino I, Cesarino V, Lanza MRV: **Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles in a paraffin composite electrode: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim.** *Sensors and Actuators B-Chemical* 2013, **188**:1293-1299.
191. Fabiańska A, Bogdanowicz R, Zięba P, Ossowski T, Gnyba M, Ryl J, Zielinski A, Janssens SD, Haenen K, Siedlecka EM: **Electrochemical oxidation of sulphamerazine at boron-doped diamond electrodes: Influence of boron concentration.** *physica status solidi (a)* 2013, **210**(10):2040-2047.
192. Souza CD, Braga OC, Vieira IC, Spinelli A: **Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode.** *Sensors and Actuators B-Chemical* 2008, **135**(1):66-73.
193. Rajith L, Jissy AK, Kumar KG, Datta A: **Mechanistic study for the facile oxidation of trimethoprim on a manganese porphyrin incorporated glassy carbon electrode.** *Journal of Physical Chemistry C* 2011, **115**(44):21858-21864.

194. Ensafi AA, Arashpour B, Rezaei B, Allafchian AR: **Highly selective differential pulse voltammetric determination of phenazopyridine using MgCr_2O_4 nanoparticles decorated MWCNTs-modified glassy carbon electrode.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013, **111**:270-276.
195. Vijaybhaskar P, Ramachandraiah A: **Spectral and electrochemical studies of phenazopyridine.** *Journal of Chemistry* 2009, **6**(4):1181-1187.