

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado

**Determinação simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína  
utilizando eletrodo de diamante dopado com boro**

**WEBERSON PEREIRA DA SILVA**  
Dissertação de mestrado

**UBERLÂNDIA**  
**2017**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Determinação simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína  
utilizando eletrodo de diamante dopado com boro**

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

**Aluno:** Weberson Pereira da Silva

**Orientador:** Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

**Área de concentração:** Química Analítica

**UBERLÂNDIA**

**2017**

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

---

S586d  
2017      Silva, Weberson Pereira da, 1991-  
            Determinação simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína  
            utilizando eletrodo de diamante dopado com boro / Weberson Pereira da  
            Silva. - 2017.  
            96 f. : il.

            Orientador: Eduardo Mathias Richter.  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
            Programa de Pós-Graduação em Química.  
            Inclui bibliografia.

            1. Química - Teses. 2. Voltametria - Teses. 3. Análise  
            condutimétrica - Teses. 4. Acetaminofen - Teses. I. Richter, Eduardo  
            Mathias. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
            Graduação em Química. III. Título.



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



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em  
Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 250/PPQUI.

DATA: 16/02/2017

DISCENTE: Weberson Pereira da Silva

MATRÍCULA: 11512QMI016

TÍTULO DO TRABALHO: Determinação simultânea de propifenazone, paracetamol e cafeína utilizando eletrodo de diamante dopado com boro.

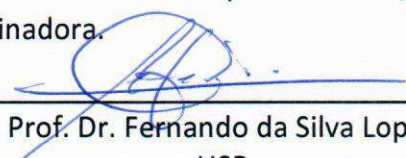
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

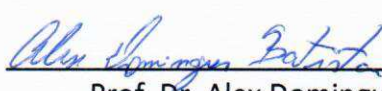
LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada


PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Uso do sistema de análise por injeção em batelada no desenvolvimento de métodos portáteis para identificação de adulterações ou falsificações em medicamentos ou suplementos alimentares.

Às oito horas e trinta minutos do dia dezesseis de fevereiro do ano dois mil e dezessete, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Fernando da Silva Lopes, da Universidade de São Paulo, Alex Domingues Batista e Eduardo Mathias Richter, da Universidade Federal de Uberlândia, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em 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) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido o mesmo

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

  
Prof. Dr. Fernando da Silva Lopes  
USP

  
Prof. Dr. Alex Domingues Batista  
UFU

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

## AGRADECIMENTOS

- ✚ *À Deus, por sempre estar presente em todos os momentos e me guiando nesta jornada da vida.*
- ✚ *À toda a minha família pelo apoio, carinho, motivação em todos os momentos que precisei.*
- ✚ *Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter, por todos os ensinamentos, orientações, confiança e incentivo sempre oferecidos.*
- ✚ *Ao Prof. Dr. Rodrigo Muñoz, por todo o apoio durante o trabalho.*
- ✚ *À todos os companheiros do Núcleo de Pesquisa em Eletroanalítica (NuPE), pela ajuda, paciência e ensinamentos nesses anos de trabalho.*
- ✚ *Aos meus amigos e companheiros (marmotas) que estiveram comigo durante toda esta caminhada pela amizade, ajuda, e pelos inúmeros momentos de descontração.*
- ✚ *À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Química pela disponibilidade do laboratório para realização deste trabalho.*
- ✚ *À FAPEMIG, pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.*
- ✚ *Aos examinadores da banca, por dedicarem seu tempo à leitura e estudo do meu trabalho e contribuição para seu aprimoramento.*

## RESUMO

No presente trabalho investigou-se o desenvolvimento de novos procedimentos analíticos para a determinação simultânea de paracetamol (PAR), propifenazona (PRO) e cafeína (CAF) em formulações farmacêuticas. Três métodos foram desenvolvidos usando as técnicas de voltametria de onda quadrada (SWV) e amperometria de múltiplos pulsos (MPA) e diamante dopado com boro (BDD) como eletrodo de trabalho. Empregando a SWV, duas estratégias de análise foram desenvolvidas: (I) uso de uma célula eletroquímica convencional (modo estacionário) e o método de adição de padrão; (II) uso de análise por injeção em batelada com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV) e o método de calibração externa. Os métodos propostos foram desenvolvidos usando como eletrólito de suporte  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e os parâmetros otimizados da SWV foram: potencial de condicionamento: -1,5 V durante 20 s; frequência: 60  $\text{s}^{-1}$ ; amplitude: 50 mV e incremento de potencial: 4 mV. No método proposto empregando BIA-SWV, o volume e a velocidade de injeção otimizados foram de 100  $\mu\text{L}$  e 28  $\mu\text{L s}^{-1}$ , respectivamente. Um terceiro método proposto para determinação simultânea de PAR, PRO e CAF, o procedimento de análise por injeção em batelada com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (BIA-MPA) foi empregado. Três pulsos de potenciais foram selecionados para realização da análise: +0,90 V /50 ms: apenas o PAR foi oxidado sem a interferência dos outros dois compostos; +1,20 V /50 ms: oxidação do PAR e da PRO livre da interferência da CAF; +1,60 V /50 ms: oxidação dos três compostos (PAR, PRO e CAF). A seletividade na detecção da PRO e CAF foi obtida mediante subtração de correntes entre os amperogramas adquiridos nos potenciais selecionados e o uso de fatores de correção (FCs). Todos os procedimentos de análise desenvolvidos mostraram-se estáveis (DPR < 4,1%) e lineares ( $r > 0,997$ ). O método empregando uma célula eletroquímica convencional apresentou frequência analítica de 20 análises  $\text{h}^{-1}$  e limites de detecção de 0,005, 0,009 e 0,006  $\text{mg L}^{-1}$  para PAR, PRO e CAF, respectivamente. Os métodos BIA-SWV e BIA-MPA apresentaram frequência analítica muito superior: 80 e 75 análises  $\text{h}^{-1}$ , respectivamente. Os limites de detecção foram de 0,3, 0,2 e 0,3  $\text{mg L}^{-1}$  (BIA-SWV) e 0,2, 0,3 e 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  (BIA-MPA) para PAR, PRO e CAF, respectivamente.

**Palavras-chave:** Voltametria de onda quadrada (SWV). Amperometria de múltiplos pulsos (MPA). Análise por injeção em batelada (BIA). Formulações farmacêuticas.

## ABSTRACT

In this work we investigated the development of new analytical procedures for simultaneous determination of paracetamol (PAR), propyphenazone (PRO) and caffeine (CAF) in pharmaceutical formulations. Three methods were developed using square wave voltammetry (SWV), multiple pulse amperometry (MPA) and boron doped diamond (BDD) with working electrode. Employing SWV, two analysis strategies were developed (I) Use of a conventional electrochemical cell (stationary mode) and the standard addition method; (II) use of batch injection analysis with detection by square wave voltammetry (BIA-SWV) and external calibration method. The proposed methods were developed using  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  as supporting electrolyte and optimized parameters of the SWV: Conditioning potential:  $-1.5 \text{ V}$  during  $20 \text{ s}$ ; frequency:  $60 \text{ s}^{-1}$ ; amplitude:  $50 \text{ mV}$  and step potential:  $4 \text{ mV}$ . In the proposed method using BIA-SWV, volume and speed of optimized injection were  $100 \mu\text{L}$  and  $28 \mu\text{L s}^{-1}$ , respectively. On the third method proposed for simultaneous determination of the PAR, PRO and CAF, the batch injection analysis procedure with multiple pulse amperometry detection (BIA-MPA) was employed. Three potential pulses were selected for the analysis:  $+0.90 \text{ V}/50 \text{ ms}$ : only PAR was oxidized without the interference of the other two compounds;  $+1.20 \text{ V}/50 \text{ ms}$ : oxidation PAR and PRO without the interference of the CAF;  $+1.60 \text{ V}/50 \text{ ms}$ : oxidation of the three compounds (PAR, PRO and CAF). The selectivity in the detection of PRO and CAF was obtained by subtracting currents between the amperograms acquired in the selected potentials and the use of correction factors (CFs). All developed analysis procedures remained stable ( $\text{RSD} < 4.1\%$ ) and linear ( $r > 0.997$ ). The method using a conventional electrochemical cell showed an analytical frequency of  $20 \text{ analysis h}^{-1}$  and limits of detection of  $0.005$ ,  $0.009$ , and  $0.006 \text{ mg L}^{-1}$  for PAR, PRO, and CAF, respectively. The BIA-SWV and BIA-MPA methods presented higher analytical frequency:  $80$  and  $75 \text{ analysis h}^{-1}$ , respectively. The limits of detection were  $0.3$ ,  $0.2$ , and  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  (BIA-SWV) and  $0.2$ ,  $0.3$ , and  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  (BIA-MPA) for PAR, PRO and CAF, respectively.

**Keywords:** Square wave voltammetry (SWV). Multiple pulse amperometry (MPA). Batch injection analysis (BIA). Pharmaceutical formulations.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Fórmula estrutural do paracetamol. ....	16
<b>Figura 2.</b> Fórmula estrutural da cafeína.....	17
<b>Figura 3.</b> Fórmula estrutural da propifenazona. ....	18
<b>Figura 4.</b> Esquema de uma célula BIA adaptada para o uso do eletrodo de BDD. ....	22
<b>Figura 5.</b> Etapas de operação de um sistema BIA com detecção eletroquímica (amperometria) e respectivo pico transiente obtido <b>(A)</b> antes da injeção <b>(B)</b> durante a injeção <b>(C)</b> final da injeção <b>(D)</b> dispersão <b>(E)</b> equilíbrio final. ....	23
<b>Figura 6.</b> Forma de aplicação do potencial na varredura por onda quadrada. Adaptado de WANG, 2006.....	25
<b>Figura 7.</b> Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox <b>(A)</b> sistema reversível e <b>(B)</b> sistema irreversível. Adaptado de DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003. ....	26
<b>Figura 8.</b> Esquema mostrando um procedimento de análise com o sistema BIA-SWV: <b>(a)</b> eletrodo de referência; <b>(b)</b> eletrodo auxiliar; <b>(c)</b> ponteira da micropipeta; <b>(d)</b> micromotor DC. Os estágios do procedimento são: <b>(A)</b> Etapa de condicionamento; <b>(B)</b> etapa de injeção; <b>(C)</b> aplicação da SWV; <b>(D)</b> sistema BIA-SWV pronto para uma nova injeção. Adaptado de OLIVEIRA et al., 2016. ....	27
<b>Figura 9.</b> <b>(A)</b> Esquema de fixação e contato elétrico do eletrodo de BDD na célula eletroquímica convencional. <b>(B)</b> Vista frontal da célula eletroquímica (modo convencional ou estacionário); <b>(C)</b> Vista superior da célula com o eletrodo de BDD posicionado no fundo da mesma (área geométrica definida pelo O-ring). ....	34
<b>Figura 10.</b> <b>(A)</b> Esquema de uma célula BIA e <b>(B)</b> Imagem da célula BIA usada nos estudos. ....	35
<b>Figura 11.</b> Sistema de agitação para a célula BIA e micropipeta eletrônica usada no procedimento de injeção do sistema BIA. ....	36
<b>Figura 12.</b> Separação entre os potenciais de oxidação de PAR (■), PRO (●) ou CAF (▲) em função do pH do meio. Eletrólito: tampão BR 0,12 mol L <sup>-1</sup> usando NaOH para acerto do pH (2 a 7); concentração: 0,5 mmol L <sup>-1</sup> de cada espécie; técnica: voltametria cíclica; velocidade de varredura: 50 mV s <sup>-1</sup> ; incremento de potencial: 5 mV. ....	41
<b>Figura 13.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> antes (—) e após a adição de 1 mmol L <sup>-1</sup> de PAR (—) ou PRO (—) ou CAF (—). Velocidade de varredura: 50 mV s <sup>-1</sup> ; incremento de potencial: 5 mV.....	42



<b>Figura 14.</b> Mecanismo simplificado da oxidação do PAR. ....	42
<b>Figura 15.</b> Mecanismo simplificado da oxidação da cafeína. ....	43
<b>Figura 16.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para a oxidação da PRO 1,0 mmol L <sup>-1</sup> . Eletrodo de trabalho: BDD; eletrólito de suporte: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; incremento de potencial: 5 mV. ....	44
<b>Figura 17.</b> Relação entre corrente de pico e velocidade de varredura para oxidação da PRO 1 mmol L <sup>-1</sup> sobre eletrodo de BDD em meio de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0, mol L <sup>-1</sup> . (A) $i_p$ vs $v^{1/2}$ (B) $\log i_p$ vs $\log v$ . ....	44
<b>Figura 18.</b> Relação entre potencial de pico ( $E_p$ ) e $\log v$ para oxidação da PRO. ....	45
<b>Figura 19.</b> Variação do $E_p$ em função do pH para PRO. Outras condições, ver Figura 12. ....	46
<b>Figura 20.</b> Mecanismo proposto para a oxidação da PRO. ....	47
<b>Figura 21.</b> Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução contendo 4 mg L <sup>-1</sup> de PAR, PRO e CAF após a ativação anódica (- - -) e ativação catódica (—) do eletrodo de BDD. Eletrólito: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; $f = 60$ s <sup>-1</sup> ; $a = 50$ mV; $\Delta E = 4$ mV. Com correção de linha de base. ....	48
<b>Figura 22.</b> Relação entre corrente de pico e a raiz quadrada da frequência de aplicação dos pulsos ( $f^{1/2}$ ) de potenciais para (A) PAR 4 mg L <sup>-1</sup> , (B) PRO 4 mg L <sup>-1</sup> ; (C) CAF 4 mg L <sup>-1</sup> ; $a = 50$ mV; $\Delta E = 4$ mV; ....	49
<b>Figura 23.</b> Variação da área de pico para uma solução contendo 4 mg L <sup>-1</sup> de PAR, PRO e CAF em função da frequência de aplicação do pulso de potencial. Eletrólito: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; $a = 50$ mV e $\Delta E = 4$ mV. ....	50
<b>Figura 24.</b> Relação entre área de pico e amplitude de pulso aplicada para uma solução contendo 4 mg L <sup>-1</sup> de PAR, PRO e CAF. Eletrólito: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; $f = 60$ s <sup>-1</sup> e $\Delta E = 4$ mV. ....	51
<b>Figura 25.</b> Relação entre área de pico e incremento de potencial para solução contendo 4 mg L <sup>-1</sup> de PAR, PRO e CAF. Eletrólito: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; $f = 60$ s <sup>-1</sup> ; $a = 50$ mV. ....	52
<b>Figura 26.</b> Voltamogramas de onda quadrada obtidos para soluções contendo concentrações crescentes de PAR, PRO e CAF (1 – 100 mg L <sup>-1</sup> ). Eletrólito: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; $f = 60$ s <sup>-1</sup> ; $a = 40$ mV e $\Delta E = 4$ mV. ....	53
<b>Figura 27.</b> Resultados obtidos por SWV na análise sucessivas de duas soluções com concentrações diferentes (A) 1,5 mg L <sup>-1</sup> + 4,5 mg L <sup>-1</sup> + 7,5 mg L <sup>-1</sup> e (B) 4,5 + 13,5 + 22,5 de CAF, PRO e CAF, respectivamente ( $n = 10$ ). ....	54
<b>Figura 28.</b> Voltamogramas de onda quadrada obtidos para soluções contendo concentrações (A) crescentes de PAR (4 – 36 mg L <sup>-1</sup> ) e constantes de PRO e CAF (4 mg L <sup>-1</sup> ); (B) crescentes de PRO (4 – 36 mg L <sup>-1</sup> ) e constantes de PAR e CAF (4 mg L <sup>-1</sup> ); (C) crescentes de CAF (4 – 36	

mg L <sup>-1</sup> ) e constantes de PAR e PRO (4 mg L <sup>-1</sup> ). Variação das áreas dos picos do (D;■) PAR, (E;●) PRO e (F;▲) CAF em relação as suas respectivas concentrações. Demais condições experimentais como na Figura 26.....	56
<b>Figura 29.</b> Voltamogramas de onda quadrada obtidas para uma solução amostra e adições de concentrações crescentes de PAR (7,5; 15,0 e 22,5 mg L <sup>-1</sup> ), PRO (4,5; 9,0 e 13,5 mg L <sup>-1</sup> ) e CAF (1,5; 3,0 e 4,5 mg L <sup>-1</sup> ). Demais condições experimentais como na Figura 26. ....	58
<b>Figura 30.</b> Curvas de adição de padrão obtidas para (A) PAR, (B) PRO e (C) CAF a partir de dados obtidos dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 29. ....	58
<b>Figura 31.</b> Variação da área de pico para PAR (37,5 mg L <sup>-1</sup> ), PRO (22,5 mg L <sup>-1</sup> ) e CAF (7,5 mg L <sup>-1</sup> ) em função do volume injetado. Velocidade de injeção: 75 µL s <sup>-1</sup> . Demais condições idem Figura 26.....	61
<b>Figura 32.</b> Variação da área dos picos para PAR (37,5 mg L <sup>-1</sup> ), PRO (22,5 mg L <sup>-1</sup> ) e CAF (7,5 mg L <sup>-1</sup> ) em função da velocidade de injeção. Volume injetado: 100 µL. Demais condições idem Figura 26.....	62
<b>Figura 33.</b> Voltamogramas de onda quadrada obtidos para soluções contendo concentrações crescentes (2 – 100 mg L <sup>-1</sup> ) de (A) PAR, (B) PRO e (C) CAF em meio de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> . Volume injetado: 100 µL; velocidade de injeção: 28 µ s <sup>-1</sup> ; $f = 60$ s <sup>-1</sup> ; $a = 40$ mV e $\Delta E = 4$ mV. ....	63
<b>Figura 34.</b> Resultados obtidos por BIA-SWV para injeções sucessivas (n = 10) de duas soluções diferentes: (A) 1,5 mg L <sup>-1</sup> + 4,5 mg L <sup>-1</sup> + 7,5 mg L <sup>-1</sup> ; (B) 7,5 + 22,5 + 37,5 de CAF, PRO e PAR, respectivamente. Velocidade de injeção: 28 µ s <sup>-1</sup> ; volume de injeção: 100 µL. ....	64
<b>Figura 35.</b> Voltamogramas de onda quadrada obtidos por BIA-SWV para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de (A) PAR (7,5 - 37,5 mg L <sup>-1</sup> ), PRO (4,5 mg L <sup>-1</sup> ) e CAF (1,5 mg L <sup>-1</sup> ); (B) PAR (7,5 mg L <sup>-1</sup> ), PRO (4,5-22,5 mg L <sup>-1</sup> ) e CAF (1,5 mg L <sup>-1</sup> ); e (C) PAR (7,5 mg L <sup>-1</sup> ), PRO (4,5 mg L <sup>-1</sup> ) e CAF (1,5-7,5 mg L <sup>-1</sup> ). Variação das áreas de pico do (D) PAR, (E) PRO e (F) CAF em relação a sua respectiva concentração. Demais condições experimentais ver Figura 33.....	65
<b>Figura 36.</b> Voltamogramas de onda quadrada obtidos por BIA-SWV para soluções contendo concentrações crescentes de PAR (15 - 45 mg L <sup>-1</sup> ), PRO (9 - 27 mg L <sup>-1</sup> ) e CAF (3 - 9 mg L <sup>-1</sup> ). Demais condições ver Figura 33. ....	66
<b>Figura 37.</b> Curvas de calibração obtidas para PAR (r = 0,997), PRO (r = 0,998) e CAF (r = 0,997). Os dados foram obtidos a partir dos voltamogramas da Figura 33.....	67
<b>Figura 38.</b> Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos pela injeção de soluções contendo 10 mg L <sup>-1</sup> de CAF (▲) ou 30 mg L <sup>-1</sup> de PRO (●) ou 50 mg L <sup>-1</sup> de PAR (■) no sistema BIA-MPA.	

Eletrólito de suporte: $\text{H}_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume injetado: $150 \text{ }\mu\text{L}$ ; velocidade de injeção: $75 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ .....	69
<b>Figura 39.</b> (A) Escada de potenciais aplicado ao eletrodo de BDD. (B) Amperogramas obtidos após injeções de soluções contendo somente PAR ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ), PRO ( $18 \text{ mg L}^{-1}$ ), CAF ( $6 \text{ mg L}^{-1}$ ) e PAR + PRO + CAF ( $30 + 18 + 6 \text{ mg L}^{-1}$ ). Velocidade de agitação: $1400 \text{ rpm}$ ; volume de injeção: $150 \text{ }\mu\text{L}$ ; velocidade de injeção: $100 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ . .....	70
<b>Figura 40.</b> Variação da corrente de oxidação e respectivos FCs em função do volume injetado no sistema BIA-MPA. (A) PAR $30 \text{ mg L}^{-1}$ detectado em $+0,90 \text{ V}$ , $+1,20 \text{ V}$ e $+1,60 \text{ V}$ ; (B) PRO $18 \text{ mg L}^{-1}$ detectado em $+1,20 \text{ V}$ e $+1,60 \text{ V}$ . Velocidade de injeção: $75 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ .....	72
<b>Figura 41.</b> Variação da corrente de oxidação e respectivos FCs em função da velocidade de injeção no sistema BIA-MPA. (A) PAR $30 \text{ mg L}^{-1}$ detectado em $+0,90 \text{ V}$ , $+1,20 \text{ V}$ e $+1,60 \text{ V}$ ; (B) PRO $18 \text{ mg L}^{-1}$ detectado em $+1,20 \text{ V}$ e $+1,60 \text{ V}$ . Volume injetado: $100 \text{ }\mu\text{L}$ . .....	73
<b>Figura 42.</b> Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA sem (a) e com agitação de $1000 \text{ rpm}$ (b) e $1400 \text{ rpm}$ (c). Concentração da PAR: $30 \text{ mg L}^{-1}$ ; volume de injeção: $150 \text{ }\mu\text{L}$ ; velocidade de injeção: $100 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ .....	75
<b>Figura 43.</b> Relação existente entre concentração e corrente de oxidação para injeção de soluções contendo concentrações crescentes de (A) PRO ( $2 \text{ mg L}^{-1} - 100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e (B) PAR ( $10 \text{ mg L}^{-1} - 85 \text{ mg L}^{-1}$ ). Eletrólito: $\text{H}_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; velocidade de agitação: $1400 \text{ rpm}$ ; volume de injeção: $150 \text{ }\mu\text{L}$ ; velocidade de injeção: $100 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ .....	76
<b>Figura 44.</b> Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo (a) PAR + PRO + CAF ( $20 \text{ mgL}^{-1} + 12 \text{ mgL}^{-1} + 4 \text{ mgL}^{-1}$ ), (b) PAR + PRO + CAF ( $60 \text{ mgL}^{-1} + 36 \text{ mgL}^{-1} + 12 \text{ mgL}^{-1}$ ). Outras condições ver Figura 43. ....	77
<b>Figura 45.</b> (A) Amperogramas obtidos com o sistema BIA-MPA para injeções de soluções contendo somente PAR $20 \text{ mg L}^{-1}$ , somente PRO $12 \text{ mg L}^{-1}$ , cinco soluções padrão contendo concentrações crescentes de CAF (a – e: $2 - 10 \text{ mg L}^{-1}$ ), PRO (a – e: $6 - 30 \text{ mg L}^{-1}$ ) e PAR (a – e: $10 - 50 \text{ mg L}^{-1}$ ) e duas amostras farmacêuticas (f – g). Curvas de calibração: (B) PAR; (C) PRO e (D) CAF. Outras condições ver Figura 43. ....	79
<b>Figura 46.</b> Cromatograma obtido para a injeção de uma solução padrão contendo PAR + PRO + CAF ( $20 + 12 + 4 \text{ mg L}^{-1}$ ). Fase móvel: metanol/água ( $55:45 \text{ v/v}$ ); coluna: $\text{C}_{18}$ ; comprimento de onda: $260 \text{ nm}$ ; vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Reagentes usados neste trabalho e sua respectiva procedência .....	37
<b>Tabela 2.</b> Resultado para a análise de PAR, PRO e CAF em amostras farmacêuticas utilizando o método proposto. ....	59
<b>Tabela 3.</b> Características do método proposto para determinação simultânea de PAR, PRO e CAF. ....	59
<b>Tabela 4.</b> Resultados para a análise de amostra farmacêutica por BIA-SWV.....	67
<b>Tabela 5.</b> Características analíticas do método proposto (BIA-SWV). ....	68
<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos para análise de amostras farmacêuticas por BIA-MPA.....	80
<b>Tabela 7.</b> Comparação entre as características analíticas dos métodos propostos e métodos da literatura que possibilitam a determinação simultânea de PAR, PRO e CAF. ....	81
<b>Tabela 8.</b> Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos desenvolvidos e por HPLC. ....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$a$  – Amplitude de aplicação do pulso de potencial

BDD – Diamante dopado com boro, do inglês, “Boron-doped diamond”

BIA – Análise por injeção em batelada, do inglês, “*Batch injection analysis*”

BR – Britton-Robinson

CAF – Cafeína

CVD – Deposição química a partir da fase vapor, do inglês, “*chemical vapor deposition*”

DC – Corrente direta, do inglês, “*direct current*”

DPb – Desvio padrão do branco

DPR – Desvio padrão relativo

DPx – Desvio padrão da concentração

$E_p$  – Potencial de pico

$f$  – Frequência de aplicação do pulso de potencial

FC – Fator de correção

FIA – Análise por injeção em fluxo, do inglês, “*Flow injection analysis*”

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, “*High Performance Liquid Chromatography*”

$i_c$  – Corrente capacitiva

$i_d$  – Corrente direta

$i_f$  – Corrente faradaica

$i_p$  – Corrente de pico

$i_r$  – Corrente reversa

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MEKC – Cromatografia capilar eletrocinética micelar, do inglês, “*micellar electrokinetic capillary chromatography*”

MPA – Amperometria de múltiplos pulsos, do inglês, “*Multiple pulse amperometry*”

PAD – Detecção amperométrica pulsada, do inglês, “*Pulsed Amperometric Detection*”)

PAR – Paracetamol

PRO – Propifenazona

r – Coeficiente de correlação linear

rpm – rotações por minuto

SWV – Voltametria de onda quadrada, do inglês, “*Square wave voltammetry*”

UV-Vis – Ultravioleta / visível

$\nu$  – Velocidade de varredura

$\alpha$  – Coeficiente de transferência de carga

$\Delta E_s$  – Incremento de potencial

## SUMÁRIO

RESUMO .....	3
ABSTRACT .....	4
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	5
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	10
1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1. Considerações gerais.....	15
1.2. Espécies químicas estudadas.....	15
1.2.1. Paracetamol .....	15
1.2.2. Cafeína.....	16
1.2.3. Propifenazona .....	17
1.3. Eletrodo de diamante dopado com boro .....	19
1.4. Análise por injeção em batelada (BIA).....	21
1.5. Voltametria de onda quadrada .....	24
1.6. Amperometria .....	27
2. OBJETIVOS DO TRABALHO .....	32
3. PARTE EXPERIMENTAL .....	33
3.1. Instrumentação .....	33
3.1.1. Detecção eletroquímica .....	33
3.1.2. Eletrodos de trabalho, referência e auxiliar .....	33
3.1.3. Células eletroquímicas.....	34
3.1.4. Análises comparativas por cromatografia líquida .....	36
3.2. Soluções, reagentes e preparação das amostras .....	37
3.3. Procedimentos empregados no cálculo de alguns parâmetros analíticos .....	38
3.3.1. Limite de detecção.....	38



3.3.2.	Limite de quantificação .....	38
3.3.3.	Repetibilidade .....	38
3.3.4.	Especificidade e seletividade .....	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	40
4.1.	Considerações gerais .....	40
4.2.	Parte I: Determinação simultânea de PAR, PRO e CAF em formulações farmacêuticas por voltametria de onda quadrada .....	40
4.2.1.	Comportamento eletroquímico do PAR, PRO e CAF em eletrodo de BDD .....	40
4.2.2.	Efeito da ativação do eletrodo de BDD .....	47
4.2.3.	Otimização dos parâmetros de voltametria de onda quadrada .....	48
4.2.3.1.	Frequência de aplicação de pulsos de potenciais .....	49
4.2.3.2.	Amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais .....	50
4.2.3.3.	Incremento de varredura de potencial .....	51
4.2.4.	Definição das faixas lineares de resposta .....	52
4.2.5.	Repetibilidade .....	53
4.2.6.	Interferência entre PAR, PRO e CAF .....	54
4.2.7.	Análises de formulações farmacêuticas contendo PAR, PRO e CAF por SWV .....	57
4.3.	Parte II: Determinação simultânea de PAR, PRO e CAF por análise por injeção em batelada com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV) .....	60
4.3.1.	Volume de injeção .....	60
4.3.2.	Velocidade de injeção .....	61
4.3.3.	Linearidade .....	62
4.3.4.	Repetibilidade .....	64
4.3.5.	Interferência entre PAR, PRO e CAF .....	64
4.3.6.	Análise de formulações farmacêuticas contendo PAR, PRO e CAF por BIA-SWV .....	66
4.4.	Parte III: Determinação simultânea de PAR, PRO e CAF por BIA-MPA .....	69
4.4.1.	Comportamento eletroquímico .....	69

4.4.2.	Seleção dos pulsos de potenciais para a determinação simultânea de PAR, PRO e CAF por BIA-MPA .....	70
4.4.3.	Otimização dos parâmetros experimentais do sistema BIA-MPA .....	72
4.4.3.1	Volume de injeção.....	72
4.4.3.2	Velocidade de injeção .....	73
4.4.3.3	Velocidade de agitação da solução no interior da célula BIA.....	74
4.4.4.	Influência da concentração de PAR e PRO no FC .....	75
4.4.5.	Estudo da repetibilidade do método .....	76
4.4.6.	Aplicação do sistema BIA-MPA para a determinação simultânea de PAR, PRO e CAF em amostras farmacêuticas .....	77
4.5.	Comparação entre os métodos propostos neste trabalho com métodos encontrados na literatura.....	80
5.	CONCLUSÕES .....	84
6.	REFERÊNCIAS .....	85

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Considerações gerais

O controle de qualidade dos medicamentos é de grande importância para garantir sua eficiência. Dessa forma, indústrias farmacêuticas e órgãos governamentais de regulamentação tem recomendado o uso de métodos normatizados, tais como os descritos nas Farmacopeias. Os métodos recomendados envolvem métodos clássicos e instrumentais que visam principalmente a quantificação dos princípios ativos em formulações farmacêuticas.

A técnica mais empregada no controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo mais de um princípio ativo é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (GÖRÖG, 2005). De forma geral os resultados obtidos com a técnica são de boa qualidade, entretanto, o uso em análises de rotina impõem algumas dificuldades, como alto custo tanto de aquisição e manutenção (uso de solventes de alto grau de pureza) e geração de grande quantidade de resíduos. 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. Assim, a operação da técnica em laboratórios com infraestrutura mínima é restrita.

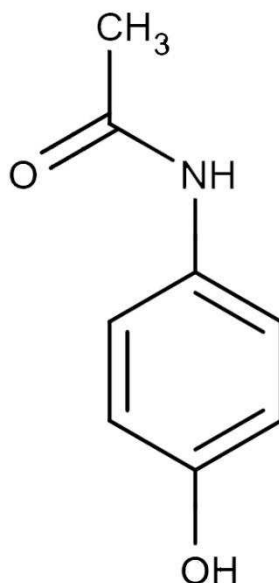
Dessa forma há uma demanda constante por métodos que permitam o controle de qualidade de fármacos que sejam de custo reduzido, com geração mínima de resíduos químicos, alta frequência analítica e com a manutenção da qualidade dos resultados. Nesse contexto a análise por injeção em batelada (BIA, do inglês, “*Batch Injection Analysis*”) (WANG; TAHA, 1991) se torna uma boa alternativa, pois apresenta várias dessas características.

### 1.2. Espécies químicas estudadas

#### 1.2.1. Paracetamol

O paracetamol (PAR) ou N-acetil-p-aminofenol ou acetaminofeno (Figura 1) é um pó branco cristalino facilmente solúvel em água e em etanol. É um medicamento amplamente utilizado no mundo como analgésico e antipirético, sendo geralmente empregado no alívio de dores de cabeça e outras dores menores em adultos e crianças. Também é empregado no tratamento de sintomas relacionados ao resfriado (CHANG et al., 2012; LOURENÇÃO et al., 2009). É eficiente na redução da febre, não é cancerígeno e é utilizado como uma alternativa ao uso da aspirina em muitos países. Por se tratar de uma droga rapidamente metabolizada, seu consumo normalmente não traz efeitos colaterais prejudiciais à saúde (YIN et al., 2011).

Entretanto, seu uso excessivo (4 g diárias) pode causar problemas sérios a saúde, como inflamação no pâncreas, erupções cutâneas, doenças hepáticas e hepatotoxicidade fatal (BOSCH et al., 2006; PRABAKAR; NARAYANAN, 2007).

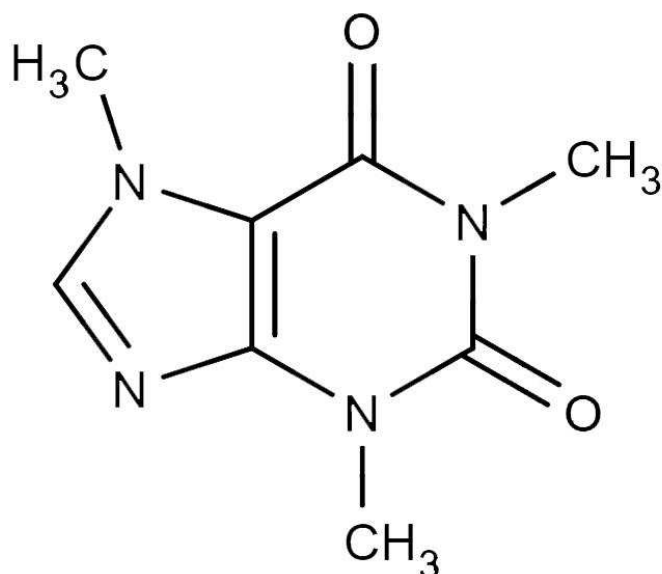


**Figura 1.** Fórmula estrutural do paracetamol.

O PAR está presente em inúmeras formulações farmacêuticas, em função disso, diversos métodos analíticos são encontrados na literatura para sua quantificação em amostras biológicas, farmacêuticas e águas, tais como: métodos espectrofotométricos (UV-Vis e IR), espectrofluorimétricos, quimiluminescentes, cromatográficos, eletroforéticos e eletroquímicos (BOSCH et al., 2006).

### 1.2.2. Cafeína

A cafeína (CAF) ou 1,3,7-trimetil-2,3,6,7-tetrahidro-1H-purina-2,6-diona (Figura 2) é um alcaloide natural derivada do grupo das xantinas. É encontrada em vários tipos de comidas e bebidas como chá, café, refrigerantes e chocolate. Apresenta muitos efeitos fisiológicos, tais como secreção de ácido gástrico, diurese e estimulação do sistema nervoso central. Em formulações farmacêuticas, devido a sua ação diurética, a cafeína geralmente é encontrada com outros fármacos, como anti-inflamatórios não esteroides e analgésicos (LOURENÇÃO et al., 2009; ŠVORC et al., 2012a).



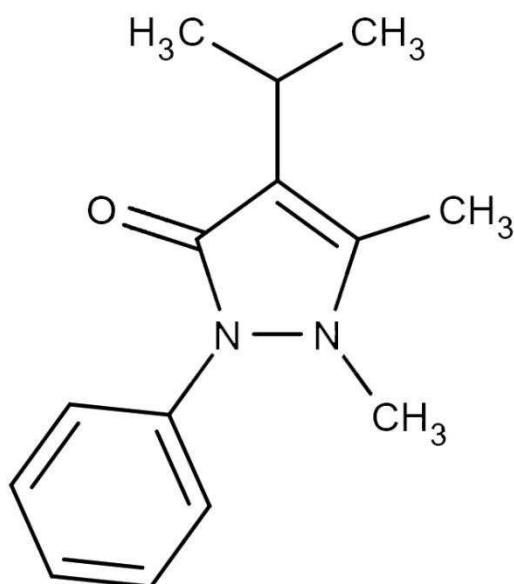
**Figura 2.** Fórmula estrutural da cafeína.

A CAF é um composto bastante popular pela sua presença em diversos tipos de produtos e também em várias formulações farmacêuticas. Para a determinação de CAF em amostras farmacêuticas, café, chá, urina e refrigerantes, são encontrados na literatura diversos métodos que permitem sua determinação. As técnicas já empregadas para este fim foram a gravimetria, espectrofotometria UV-Vis, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa, HPLC, eletroforese capilar, espectroscopia IR e eletroquímica (DE MARIA; MOREIRA, 2007; ŠVORC, 2013).

### 1.2.3. Propifenazona

Propifenazona (PRO) ou 1,5-dimetil-2-fenil-4-(propan-2-il)-2,3-di-hidro-1H-pirazol-3-ona (Figura 3) faz parte do grupo das pirazolonas, possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas (MAZZARINO et al., 2010; SOPONAR *et al.*, 2013). É rapidamente absorvida pelo organismo e possui potência analgésica cerca duas vezes maior do que a da aspirina quando administrada sozinha (em base por miligrama) (KIERSCH; MINIĆ, 2002). Combinada com paracetamol e cafeína apresenta atividade terapêutica mais eficiente devido aos diferentes sítios ativos que essas drogas possuem, sendo essa combinação mais eficiente do que ibuprofeno e ácido acetilsalicílico quando administrados sozinhos (BURDAN, 2004; HAŁKA-GRYSIŃSKA et al., 2012). A CAF é ainda conhecida por aumentar o efeito

analgésico do PAR e PRO sinergicamente (KRAETSCH et al., 1996) e promover o alívio de sintomas, como dor de cabeça, dores musculares, neuralgia, dores nas costas, articulares, reumática, enxaqueca, dor de dente e dor menstrual. Essa combinação também é eficaz no controle da febre proveniente de infecção bacteriana ou viral. Com efeitos colaterais limitados, é adequada para todas as idades (DELVADIYA et al., 2014).



**Figura 3.** Fórmula estrutural da propifenazona.

A PRO é encontrada geralmente combinada com PAR e CAF, em função disso, poucos métodos descritos na literatura fazem apenas a determinação de PRO. Os métodos disponíveis empregam a cromatografia gasosa (BOSCH; DE VOS, 1979) e HPLC (ROUAN et al., 1992).

Para a determinação simultânea de PAR, PRO e CAF, alguns métodos foram localizados na literatura. Entre os procedimentos empregados, podemos citar a cromatográfica líquida de alta eficiência (AVRAMOVA, 1989; DELVADIYA et al., 2014; ISSA; HASSOUNA; ZAYED, 2012; SOPONAR et al., 2013), espectrofotometria UV-Vis (DINÇ; KÖKDİL; ONUR, 2001; DUMANOVIC; MARKOVIC; MUK, 1989; ÖZGÜR; ALPDOĞAN; AŞÇI, 2002; VIDAL; BARRALES; DÍAZ, 2003), cromatografia capilar eletrocínética micelar (EMRE; ÖZALTIN, 2007), eletrocromatografia planar pressurizada e cromatografia de camada delgada de alto desempenho (HAŁKA-GRYSIŃSKA et al., 2012). Porém, até o

momento, não existem na literatura métodos eletroquímicos para a determinação simultânea desses três compostos.

### 1.3. Eletrodo de diamante dopado com boro

O eletrodo de diamante dopado com boro, (BDD, do inglês, “*boron doped diamond*”), material a base de carbono de alta dureza e resistência mecânica vem sendo utilizado com grande sucesso no desenvolvimento de vários métodos eletroquímicos de análise aplicados a diversos tipos de amostras (FREITAS et al., 2016; HASONĚ et al., 2008; KONDO et al., 2013; LOURENÇÃO et al., 2009; PETRUCCI et al., 2015; PINO et al., 2015; SARADA et al., 2000; TEIXEIRA; SEDENHO; STRADIOTTO, 2015; ZHANG et al., 2015).

A produção do eletrodo de BDD é realizada principalmente pela deposição química a partir da fase vapor (CVD, do inglês, “*chemical vapor deposition*”) ou pelo crescimento a alta-pressão/alta-temperatura (HPHT, do inglês “*high-pressure/high-temperature*”). O método HPHT necessita de temperaturas acima de 1670 K e de pressões da faixa de  $5 \times 10^9$  Pa. Já o método CVD trabalha a temperaturas da ordem de 1270 K e baixas pressões que variam de 1000 a 10000 Pa. Atualmente, o método de crescimento de diamantes CVD é o mais utilizado, por ser mais econômico, difundido e permitir que o crescimento dos filmes de diamante sejam feitos em vários substratos de tamanhos e formatos diferentes (DE BARROS et al., 2005; PLESKOV, 2002). O desenvolvimento de novas técnicas que possibilitaram a criação de filmes de diamante sobre vários tipos de substratos diferentes, como grafite, silício e carbono vítreo fez com que o interesse no uso do diamante na eletroquímica aumentasse (CELII; BUTLER, 1991; DECLEMENTS, 1996; FERREIRA; SILVA; CORAT, 2002).

O diamante puro não é um material condutor de eletricidade, devido as suas características isolantes (band-gap de 5 eV e resistividade da ordem de  $1 \times 10^{16} \Omega \text{ cm}$ ). Entretanto, quando devidamente dopado passa a se tornar um material condutor, e portanto, promissor para ser utilizado como eletrodo (SWAIN, 2007). O boro é o dopante mais utilizado para produzir eletrodos de diamante (semicondutor tipo p) e isso se deve ao fato de o boro apresentar energia de ativação mais baixa como transportador de carga (0,37 eV) (KRAFT, 2007).

O método CVD é baseado na disposição de um filme de diamante sobre vários tipos de substratos diferentes por meio da ativação de uma fase gasosa introduzida em um reator



(reatores com ativação por filamento quente de tungstênio ou por plasma de micro-ondas, dentre outros). Geralmente, o reagente gasoso utilizado é o metano (diluído em hidrogênio). Porém, outras substâncias orgânicas podem ser usadas como fonte de carbono, como metanol, acetona e etanol. Os dopantes mais empregados são o boro e seus derivados, como  $B_2H_6$ , que por não possuir carbono ou oxigênio em sua composição, evita a inclusão de outros elementos dentro do reator além de ser mais facilmente encontrado, porém, é altamente tóxico, explosivo e reativo. Outros dopantes geralmente utilizados são trimetilborato e  $B_2O_3$  (que é o mais comum), mas antes devem ser solubilizados em acetona ou metanol (DE BARROS et al., 2005; KRAFT, 2007).

As propriedades dos filmes de diamante variam de acordo com a concentração de boro, que deve ser ao menos  $1 \times 10^{19}$  átomos  $cm^{-3}$ . A resistividade dos filmes de diamante varia de acordo com a concentração de boro que pode variar de  $10^4 \Omega cm$  (para uma concentração de boro próxima a  $10^{18}$  átomos  $cm^{-3}$ ) até décimos de  $\Omega cm$  (para uma concentração de boro próxima a  $10^{21}$  átomos  $cm^{-3}$ ) (PLESKOV, 2000).

Os filmes de diamantes quando preparados apresentam terminações superficiais em hidrogênio (KRAFT, 2007; SWAIN; ANDERSON; ANGUS, 1998), o que se deve a atmosfera contendo hidrogênio durante o processo de produção. Essa superfície terminada em hidrogênio (apolar) faz com que o eletrodo apresente caráter hidrofóbico (KRAFT, 2007; MARTIN, 1996, 1999) e um potencial de banda quase independente do pH (RAO et al., 1999).

O eletrodo de BDD apresenta várias características que o diferem dos outros eletrodos à base de carbono, como: corrente de fundo baixa e estável ao longo de uma faixa ampla de potenciais, ampla faixa de potencial de trabalho em meio aquoso, alta sensibilidade, resistência a corrosão, baixa adsorção molecular e cinética de transferência de elétrons relativamente rápida para vários sistemas redox sem prévio tratamento convencional (polimento) (MEDEIROS et al., 2008; NOTSU et al., 2000; PANIZZA; CERISOLA, 2005; SUFFREDINI et al., 2004; SWAIN; ANDERSON; ANGUS, 1998; TERASHIMA et al., 2003).

Em 1987, PLESKOV et al. descreveram, pela primeira vez, o comportamento eletroquímico de filmes de diamante demonstrando que estes não eram tão eletroquimicamente inertes quanto se acreditava. Neste trabalho pode ser observado que as propriedades superficiais do eletrodo de BDD podem ser sensivelmente alteradas por pré-tratamento. A partir desse estudo, o comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD tem sido muito estudado em função das alterações impostas a sua superfície, por tratamentos eletroquímicos catódicos e

anódicos (GOETING et al., 2000; GRANGER, 1999; NOTSU et al., 2000; RAMESHAM, 1998; SWAIN, 2007; TERASHIMA et al., 2003).

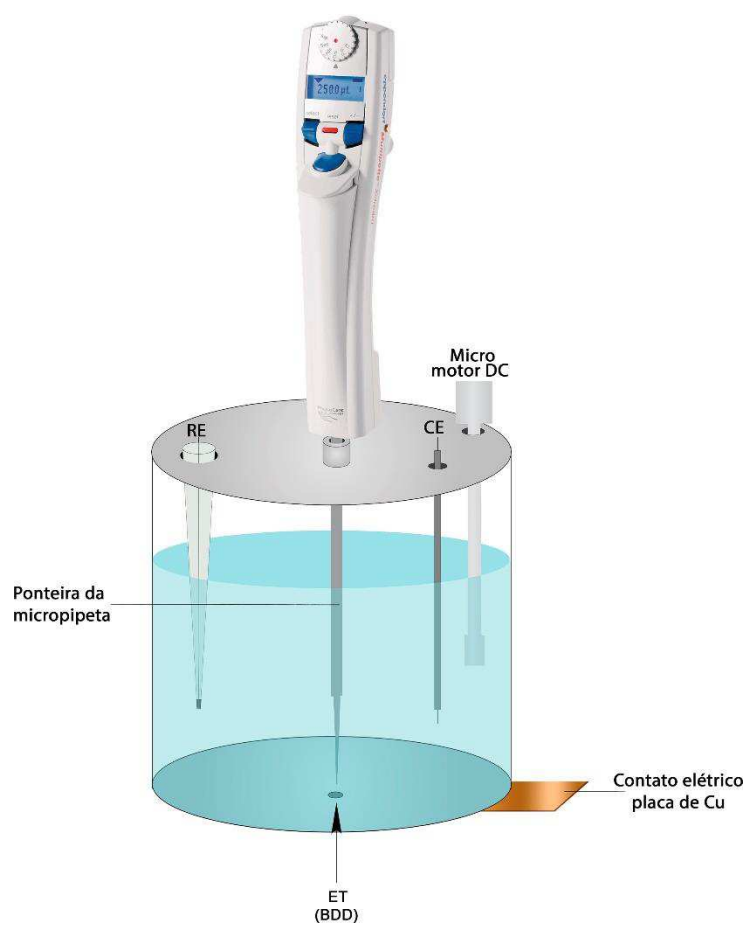
Quando o eletrodo de BDD recebe tratamento anódico, a superfície terminada em hidrogênio é alterada para oxigênio, pois há um aumento da relação O/C na superfície do filme, o que faz com que a cinética de transferência de carga de alguns pares redox se torne mais lenta, como por exemplo, os pares  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$  e  $[\text{IrCl}_6]^{-2/-3}$  (DE BARROS et al., 2005). Para essas espécies, a reversibilidade da reação de transferência de carga aumenta com a diminuição do pH, o que indica que pode haver grupos carboxila negativamente carregados na superfície do filme, o que leva a diminuição da reversibilidade da reação de transferência eletrônica por exclusão de carga (GRANGER, 1999).

Frequentemente, a resposta eletroquímica do BDD é dependente do pré-tratamento realizado na sua superfície. Há alguns trabalhos que relatam o uso preferencial do tratamento anódico (FISHER et al., 1998; PERRET et al., 1999), porém, outros trabalhos reportam que o tratamento catódico (MAHÉ; DEVILLIERS; COMNINELLIS, 2005; SUFFREDINI et al., 2004) melhora de forma significativa a reversibilidade e transferência de carga para alguns pares redox. Dessa forma, a escolha do pré-tratamento a ser utilizado dependerá da espécie química estudada.

#### **1.4. Análise por injeção em batelada (BIA)**

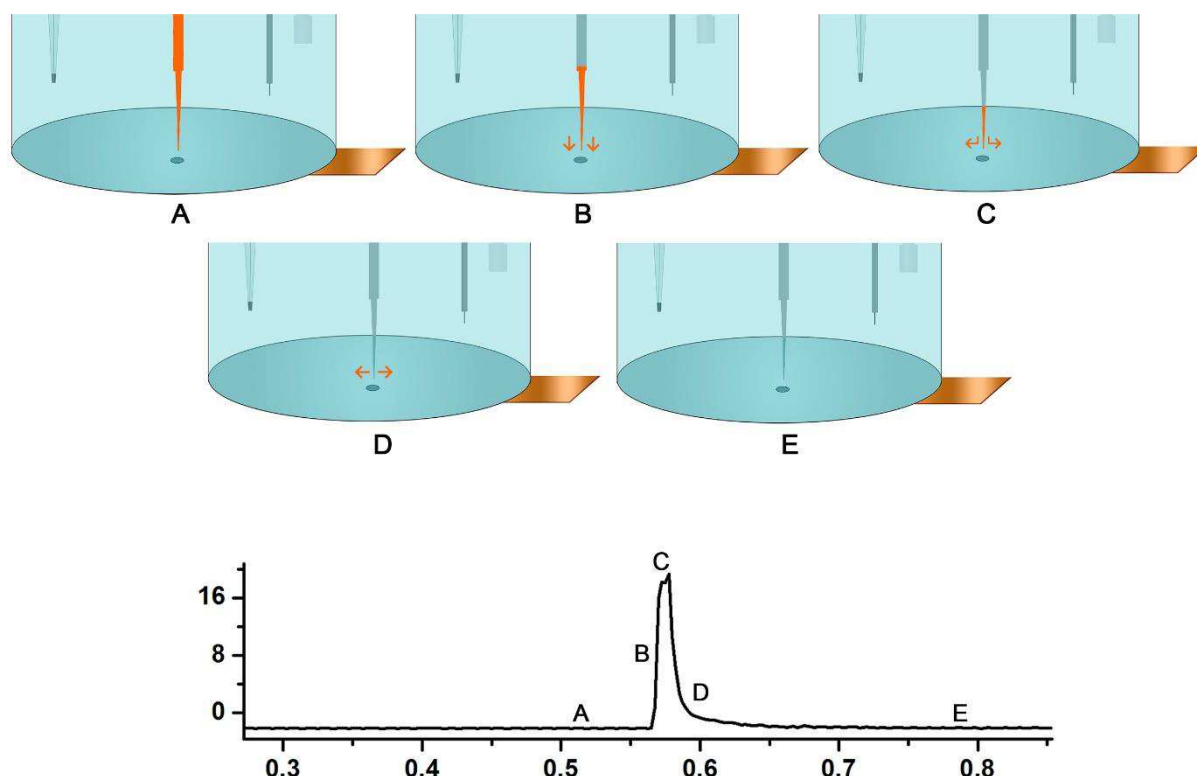
A análise por injeção em batelada (BIA, do inglês, “*batch injection analysis*”) é um procedimento analítico apresentada na literatura na década de 90 (WANG; TAHA, 1991). O procedimento foi proposto para ser usado em análises simples e rápidos que envolvem a injeção de uma pequena alíquota de amostra ou solução padrão (geralmente de 50 a 150  $\mu\text{L}$ ) com o auxílio de uma micropipeta (geralmente eletrônica) sobre a superfície do eletrodo de trabalho que está imerso em um grande volume de solução inerte (detecção eletroquímica).

A Figura 4 mostra o esquema de uma célula BIA adaptada para o uso do eletrodo de BDD. A injeção da solução é feita na posição oposta ao eletrodo de trabalho (configuração “*wall-jet*”). O sistema pode ainda ser operado com ou sem a agitação da solução no interior da célula (PEREIRA et al., 2012).



**Figura 4.** Esquema de uma célula BIA adaptada para o uso do eletrodo de BDD.

A passagem da espécie analítica sobre a superfície do eletrodo de trabalho resulta em sinais transientes (picos), onde os conceitos envolvendo um sistema BIA com detecção eletroquímica podem ser explicados pelas etapas apresentadas na Figura 5:



**Figura 5.** Etapas de operação de um sistema BIA com detecção eletroquímica (amperometria) e respectivo pico transiente obtido **(A)** antes da injeção **(B)** durante a injeção **(C)** final da injeção **(D)** dispersão **(E)** equilíbrio final.

Antes da injeção da solução contendo a espécie estudada observa-se uma corrente residual constante gerada a partir do eletrólito inerte e aplicação de um potencial (Figura 5A). Quando ocorre a injeção da solução sobre o eletrodo de trabalho (Figura 5B), há um rápido aumento da corrente faradaica até chegar em um valor máximo (Figura 5C). A magnitude da corrente observada é proporcional a concentração da solução injetada, se esta se encontra na faixa linear de resposta. Após a injeção ocorre uma queda do sinal em direção a linha de base (Figura 5D) até atingir o equilíbrio existente antes da injeção (corrente residual; Figura 5E). O retorno da corrente ao patamar da linha de base antes da injeção pode ser acelerada através do uso de agitação mecânica da solução no interior da célula BIA (PEREIRA et al., 2012).

Na operação do sistema BIA, parâmetros como velocidade e volume de injeção necessitam ser reprodutíveis. Para este fim, a utilização de pipetas eletrônicas com dispensação programável (WANG et al., 1992) possibilita que esta operação tenha alta reprodutibilidade. Porém, seringas de insulina descartáveis ou pipetas manuais podem ser utilizadas em

substituição as pipetas eletrônicas. Neste caso é necessário utilizar um padrão interno adequado para corrigir eventuais erros causados por variações no volume e velocidade de injeção da solução (GIMENES et al., 2012).

O sistema BIA apresenta diversas vantagens em relação a outras técnicas analíticas, tais como: uso de instrumentação de baixo custo (aquisição e manutenção), baixo consumo de reagentes e amostras e consequentemente, pequena geração de resíduos, frequência analítica elevada e sistema estável e reproduzível. Quando o sistema BIA é combinado com detecção eletroquímica (amperometria, potenciometria ou voltametria), outras vantagens podem ser obtidas em relação a seletividade, sensibilidade e facilidade de uso em laboratórios com infraestrutura mínima ou ainda em análises em campo (TORMIN et al., 2014). Porém, o sistema BIA também apresenta limitações relacionadas a automação e procedimentos de derivatização/diluição em linha.

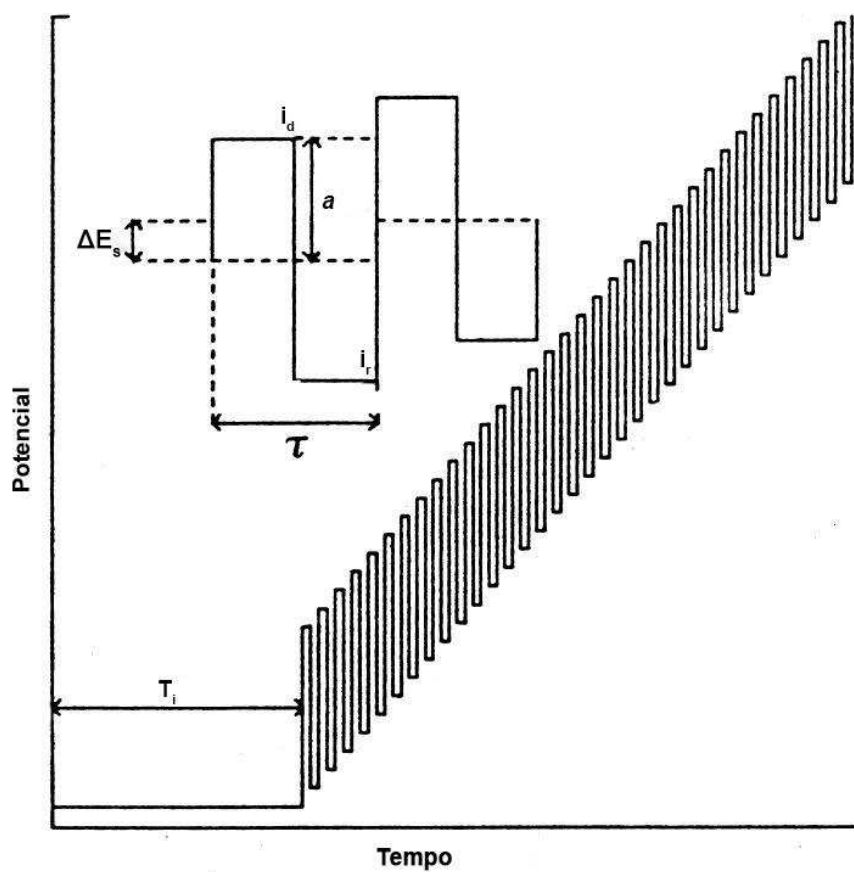
O sistema BIA pode ser associado a diferentes tipos de detecção, tais como calorimetria (THAVARUNGKUL et al., 1999), espectrofotometria (WANG; ANGNES, 1993), fluorescência (WANG; RAYSON; TAHA, 1992), potenciometria (FERNANDES et al., 1998), amperometria (BRETT; BRETT; MITOSERIU, 1995) e voltametria (BRETT; BRETT; MITOSERLU, 1994). Entre essas técnicas, a amperometria é a que vem sendo mais empregada com a utilização de diferentes tipos de materiais como eletrodos de trabalho (BRETT; MATYSIK; VIEIRA, 1997; QUINTINO et al., 2005; QUINTINO; ANGNES, 2004a).

### 1.5. Voltametria de onda quadrada

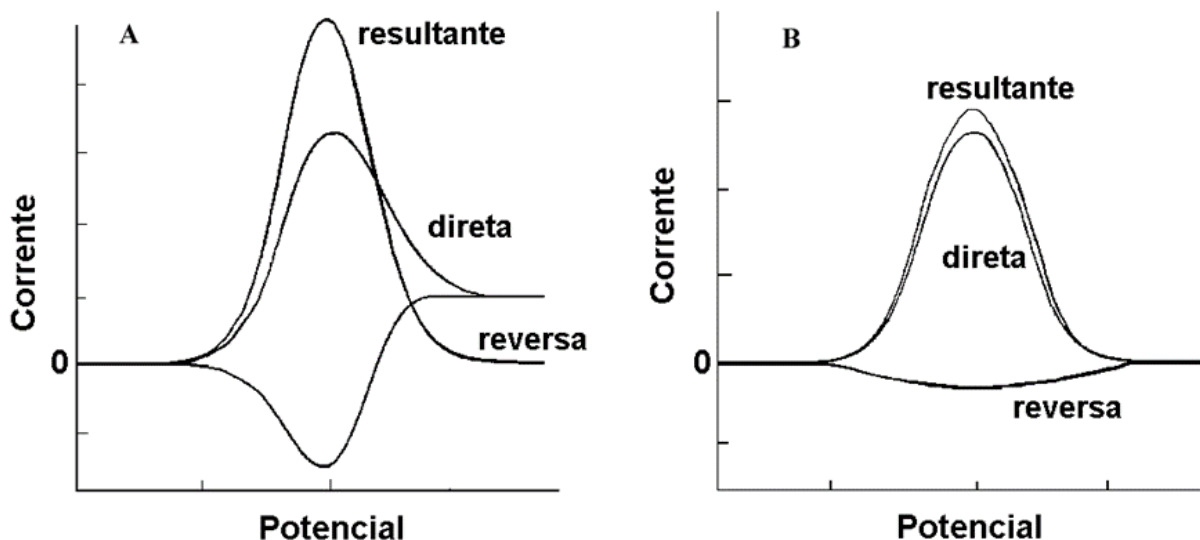
A voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês “*square-wave voltammetry*”) é uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis. A técnica é muito usada em análises químicas, no entanto, estudos cinéticos e de mecanismos de reações redox que ocorrem no eletrodo de trabalho também são possíveis (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Na SWV é aplicada ao eletrodo de trabalho uma onda quadrada simétrica de amplitude  $\alpha$  (amplitude do pulso de potencial) sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada com incrementos ( $\Delta E_s$ ) e tempo de aplicação ( $\tau$ ) definidos, como apresentado na Figura 6. A corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da varredura, e outra ao final do pulso reverso, onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura, como mostrado na Figura 7. O sinal é obtido como uma intensidade da

corrente resultante diferencial ( $\Delta i = i_d - i_r$ ) (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; PACHECO et al., 2013).



**Figura 6.** Forma de aplicação do potencial na varredura por onda quadrada. Adaptado de WANG, 2006.



**Figura 7.** Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox **(A)** sistema reversível e **(B)** sistema irreversível. Adaptado de DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003.

Como o intervalo entre o pulso direto e reverso é pequeno, a corrente capacitiva é relativamente constante nesse intervalo e, dessa forma, o cálculo da diferença entre a resposta do pulso direto e reverso anula de forma efetiva as contribuições capacitivas. Consequentemente, velocidades de varredura mais elevadas podem ser utilizadas na SWV, pela forma eficiente pela qual a corrente de fundo é subtraída a partir da forma de aquisição da corrente. Outra característica bastante importante da SWV é a possibilidade de obtenção de informações precisas em relação ao mecanismo redox do sistema eletroquímico em estudo observando os sinais das varreduras direta e reversa e velocidades de varredura (ZACHOWSKI; WOJCIECHOWSKI; OSTERYOUNG, 1986).

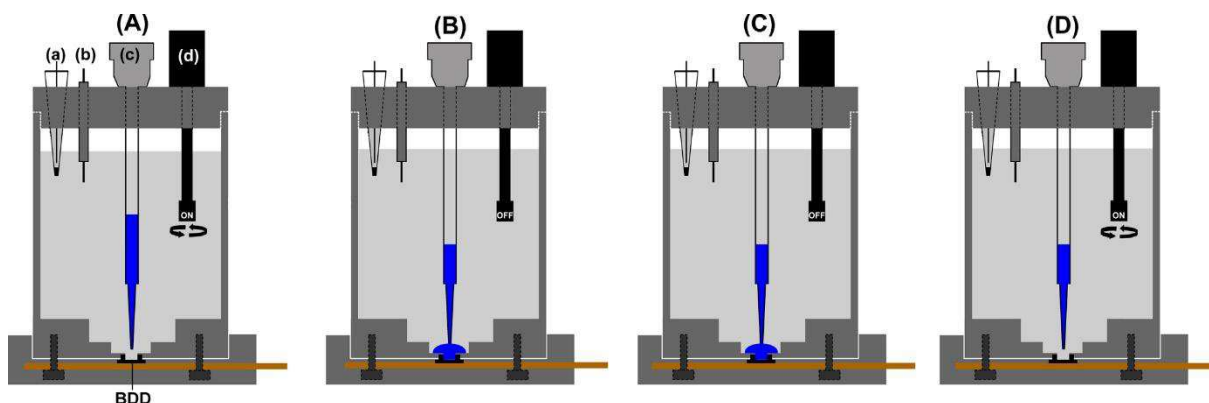
A SWV apresenta outra importante vantagem que é a possibilidade de realizar análises sem a necessidade de remover previamente o oxigênio da solução quando este não interfere de forma direta na reação eletródica em estudo. Isso ocorre porque na região de corrente limitante para a redução do oxigênio, a contribuição dos pulsos direto e reverso são iguais levando a uma corrente líquida igual a zero. Outro motivo é que durante uma varredura de potenciais negativos no sentido positivo, a elevada velocidade de varredura limita o tempo para que espécies eletroativas de oxigênio difundam para a superfície do eletrodo, (BARD; FAULKNER, 1944).

A SWV com redissolução anódica associada a sistemas BIA vem sendo utilizada com sucesso para a determinação de metais (BRETT; BRETT; TUGULEA, 1996a, 1996b; BRETT; FUNGARO, 2000; BRETT; MORGADO, 2000). Também são encontrados na literatura



trabalhos de determinação de moléculas orgânicas (OLIVEIRA et al., 2016; SIMÕES; VAZ; BRETT, 2007) empregando BIA-SWV.

A Figura 8 mostra um esquema de como geralmente ocorre a análise em um sistema BIA-SWV. **(A)** um potencial de condicionamento (opcional) é aplicado ao eletrodo de trabalho. Durante essa etapa, para maior eficiência, a solução dentro da célula BIA normalmente é agitada; **(B)** uma alíquota de solução amostra ou padrão ( $\sim 100 \mu\text{L}$ ) é injetada sobre a superfície do eletrodo de trabalho com solução no interior da célula no estado estacionário (a alíquota injetada permanece junto ao eletrodo); **(C)** após a injeção, uma varredura por SWV é realizada na faixa de potencial selecionada; **(D)** a solução no interior da célula BIA é agitada novamente para que a alíquota injetada seja removida da superfície do eletrodo. Após essa etapa um novo procedimento de análise pode ser realizado.



**Figura 8.** Esquema mostrando um procedimento de análise com o sistema BIA-SWV: **(a)** eletrodo de referência; **(b)** eletrodo auxiliar; **(c)** ponteira da micropipeta; **(d)** micromotor DC. Os estágios do procedimento são: **(A)** Etapa de condicionamento; **(B)** etapa de injeção; **(C)** aplicação da SWV; **(D)** sistema BIA-SWV pronto para uma nova injeção. Adaptado de OLIVEIRA et al., 2016.

### 1.6. Amperometria

Um sensor amperométrico pode ser também considerado um sensor voltamétrico para um determinado potencial aplicado fixo (BRETT; BRETT, 1996). Enquanto um sensor voltamétrico registra vários pontos em uma região selecionada do perfil corrente-potencial, o sensor amperométrico é mantido em um potencial constante em função do tempo (amperometria convencional) onde os compostos eletroativos podem ser oxidados ou reduzidos na interface eletrodo/solução.

Este tipo de detecção é amplamente utilizada, conforme pode ser verificado na literatura (BURATTI; BRUNETTI; MANNINO, 2008; HSU; CIOU; CHEN, 2008; JIA et al., 2008; RICHTER et al., 2004; ZHANG et al., 2009). Porém, determinações simultâneas de compostos eletroativos em potenciais redox distintos ( $\Delta E > 0,1 \text{ V}$ ) (HAGHIGHI et al., 2007) somente podem ser realizadas utilizando a técnica de amperometria a potencial constante se mais de um eletrodo de trabalho for empregado na detecção (MATOS et al., 2000; PAIXÃO; MATOS; BERTOTTI, 2003; THANGARAJ et al., 2014).

A amperometria convencional apresenta elevada sensibilidade, pois permite a aquisição de correntes faradaicas muito baixas (e, portanto, a detecção de baixas concentrações) devido a baixa corrente capacitiva gerada nesta condição. Entretanto, existe a possibilidade de ocorrer a contaminação (adsorção de alguns compostos, produtos de reação e/ou impurezas) e/ou passivação da superfície do eletrodo de trabalho. Assim, a taxa de transferência de carga entre o eletrodo e a espécie analítica de interesse pode variar com o tempo e causar perdas na repetibilidade em análises sucessivas (DE CARVALHO et al., 2004). Portanto, procedimentos de limpeza da superfície do eletrodo de trabalho (mecânica ou eletroquímica) necessitam ser realizados constantemente para a obtenção de resultados reprodutivos durante a análise (CHAILAPAKUL et al., 2006).

Algumas alternativas para evitar a contaminação de eletrodos já foram estudadas, tais como a adição de EDTA ao eletrólito de suporte (DE CARVALHO et al., 2004), uso de eletrodos modificados (HAGHIGHI et al., 2007; PEDROSA; LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006) ou a constante renovação da superfície do eletrodo ("*on line*") (CATARINO et al., 2003). A utilização do sistema BIA associado à detecção amperométrica, pode em muitos casos minimizar o problema da contaminação da superfície do eletrodo, porque geralmente pequenos volumes de amostras são injetados (alguns microlitros). Dessa forma a contaminação pode levar mais tempo para ocorrer, já que a amostra não permanece o tempo todo em contato com o eletrodo (sinais transientes) (GIMENES, 2009).

Outra alternativa para contornar problemas de contaminação do eletrodo de trabalho é utilizar a amperometria de modo pulsado, sendo as mais comuns, a detecção amperométrica pulsada (PAD, do inglês, "*Pulsed Amperometric Detection*") e amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês, "*Multiple Pulse Amperometry*"). As técnicas amperométricas pulsadas conseguem contornar a limitação da detecção amperométrica convencional em relação a estabilidade do sinal eletroquímico durante as análises. Isso é possível porque a limpeza eletroquímica do eletrodo pode ser feita periodicamente com a aplicação (de forma alternada e

cíclica) de pulsos de potenciais em função do tempo com o objetivo de realizar a limpeza e/ou condicionamento da superfície do eletrodo (diminuindo ou evitando a contaminação). Na técnica PAD, o número de pulsos de potenciais aplicáveis varia de 2 a 6 (varia conforme o fabricante do equipamento e programa de aquisição e controle), entretanto, a aquisição da corrente é normalmente possível em apenas um pulso de potencial. A MPA, entretanto, permite a aplicação de até 10 pulsos de potenciais e permite a aquisição da corrente em função do tempo para cada um dos pulsos de potenciais aplicados (obtenção simultânea de até 10 amperogramas; programa GPES – Metrohm Autolab). Dessa forma empregando um único eletrodo de trabalho é possível fazer determinações simultâneas utilizando a técnica MPA na detecção. (SANTOS et al., 2011).

Várias estratégias diferentes podem ser adotadas dependendo da natureza dos compostos oxidados e/ou reduzidos no eletrodo de trabalho para determinação simultânea de duas espécies empregando a técnica de MPA. O procedimento pode ser implementado em FIA ou BIA. A forma mais comum é a aplicação de dois pulsos de potenciais ( $E_1$  e  $E_2$ ) e a aquisição de dois amperogramas distintos "simultaneamente":

- No potencial  $E_1$ , somente uma das espécies é reduzida ou oxidada, sendo o sinal de corrente proporcional à concentração desta espécie (sem a interferência da outra espécie).
- No potencial  $E_2$ , ambas as espécies são oxidadas ou reduzidas.

A corrente proveniente da espécie que somente é oxidada em  $E_2$  pode ser obtida mediante subtração da corrente detectada em  $E_1$  sem (MEDEIROS et al., 2010; SURAREUNGCHAI; DEEPUNYA; TASAKORN, 2001) e com (PEREIRA et al., 2014; SILVA et al., 2011; TORMIN et al., 2012) o uso de um fator de correção (FC). Porém o uso do FC é mais comum, porque os valores de correntes da espécie detectada nos dois pulsos de potenciais geralmente não são iguais. Este procedimento pode ser realizado em sistemas FIA (SILVA et al., 2011) ou BIA (DA SILVA et al., 2011). Há também a possibilidade de aplicação de três pulsos de potenciais ( $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_3$ ) com a mesma finalidade do anterior, porém um dos compostos que sofre oxidação no  $E_2$  sofre redução em  $E_3$  e pode ser seletivamente detectado no terceiro potencial aplicado ( $E_3$ ) (DOS SANTOS et al., 2008, 2009). A técnica MPA acoplada a sistemas FIA ou BIA também permite a aplicação de um pulso de potencial adicional para prevenir a contaminação/passivação do eletrodo de trabalho (limpeza eletroquímica constante). O procedimento é similar ao que ocorre na PAD, porém, neste caso (MPA), a aquisição de corrente não se restringe a um potencial apenas (limitação do software).

A determinação de três compostos simultaneamente também já foi demonstrada empregando BIA-MPA (FREITAS et al., 2016). Neste trabalho foi desenvolvido um método para a determinação simultânea de 8-cloroteofilina, piridoxina e difenidramina. Nesta análise, uma sequência de três pulsos de potenciais (+1,25 V, +1,60 V e +1,80 V /50 ms) foram aplicados ao eletrodo de trabalho e obtidos três amperogramas distintos. A 8-cloroteofilina foi detectada seletivamente no potencial de +1,25 V, piridoxina e 8-cloroteofilina foram detectadas simultaneamente em +1,60 V e os três compostos foram detectados simultaneamente em +1,80 V. Para a obtenção da corrente proveniente da oxidação da piridoxina e difenidramina foi realizada a subtração da corrente detectada nos três potenciais (com a ajuda de FCs). Outros trabalhos que demonstram a possibilidade da determinação de três espécies empregando MPA também podem ser encontrados na literatura (CHAVES et al., 2015; PEREIRA et al., 2016).

Aspectos teóricos que envolvem a detecção utilizando a MPA são pouco divulgados na literatura, o que contribui para a pequena quantidade de trabalhos publicados que empregam essa técnica. No entanto pode ser encontrado na literatura um artigo de revisão (SANTOS et al., 2011) onde alguns conceitos teóricos sobre essa técnica são abordados, além das potencialidades (determinação simultânea, análises indiretas, limpeza eletroquímica, inserção de padrão interno para correção de variáveis do sistema em fluxo, etc.) que a técnica apresenta.

Na técnica MPA quando pulsos de potenciais são aplicados alternadamente, a corrente amperométrica monitorada é governada por dois componentes de corrente, a corrente capacitiva,  $i_C$  (referente ao carregamento da dupla camada elétrica quando um potencial é aplicado e não envolve a ocorrência de reação química) e a corrente faradaica,  $i_F$  (referente a transferências de elétrons que ocorrem na interface eletrodo-solução) (BARD; FAULKNER, 1944). Quando há na solução espécies que podem ser oxidadas ou reduzidas no eletrodo há a geração da  $i_F$ . Dessa forma, na detecção amperométrica de múltiplos pulsos associada a um sistema de análise por injeção em fluxo ou batelada com a solução no interior da célula sob agitação (BIA), quando apenas a solução carregadora inerte estiver passando sobre o eletrodo de trabalho, a magnitude de  $i_F$  dependerá da concentração de impurezas eletroativas presentes na solução, que em geral são baixas (mantido outros parâmetros constantes). A magnitude da  $i_C$  depende da amplitude do pulso de potencial e do tempo de aplicação. A  $i_C$  será diretamente proporcional a amplitude do pulso e inversamente proporcional ao tempo de aplicação do pulso de potencial. Quando a zona da amostra contendo uma espécie eletroativa passar através da célula eletroquímica, a magnitude de  $i_F$  será governada pela concentração da espécie analítica que chega a superfície do eletrodo de trabalho.

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

A MPA acoplada a sistemas FIA ou BIA apresenta grande potencial para o desenvolvimento de novos métodos de análise, uma vez que apresenta várias características vantajosas, como custo reduzido, boa reprodutibilidade, seletividade e sensibilidade, tempo reduzido de análise e simplicidade de execução.

## 2. OBJETIVOS DO TRABALHO

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de métodos simples, rápidos e de baixo custo e sem etapas complexas de preparação de amostras para a determinação simultânea de PAR, PRO e CAF em formulações farmacêuticas empregando a voltametria de onda quadrada (SWV) ou a amperometria de múltiplos pulsos (MPA). Três métodos distintos foram desenvolvidos: **(I)** Utilizando a SWV associada a célula eletroquímica convencional (modo estacionário); **(II)** utilizando a voltametria de onda quadrada associada a um sistema de análise por injeção em batelada (BIA-SWV); **(III)** utilizando a amperometria de múltiplos pulsos associada a análise por injeção em batelada (BIA-MPA).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Instrumentação

##### 3.1.1. Detecção eletroquímica

As medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato  $\mu$ AUTOLAB Tipo III ou 128N (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands - Metrohm;) interfaceado e controlado por um computador através do software GPES 4.9.007.

##### 3.1.2. Eletrodos de trabalho, referência e auxiliar

Neste trabalho foi utilizado eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) com área geométrica de  $0,18 \text{ cm}^2$  como eletrodo de trabalho. O BDD foi adquirido da empresa Adamant Technologies SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça (atualmente chamada NeoCoat SA - La Chaux-de-Fonds, Suíça). Trata-se de uma placa a base de silício ( $0,7 \times 0,7 \text{ cm}$ ) com espessura de aproximadamente  $1,2 \text{ mm}$  coberta com fino filme de diamante ( $1,2 \mu\text{m}$ ) com nível de dopagem de boro de 7000 a 8000 ppm. Diariamente, antes do início da realização das medidas eletroquímicas, o eletrodo de BDD foi submetido a um processo de limpeza e/ou ativação eletroquímica. Estes procedimentos de limpeza podem ser realizados de duas formas:

- **Ativação anódica** – Aplicação de corrente de  $+0,01 \text{ A}$  em meio de solução de tampão Britton-Robinson  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 2,0$ );
- **Ativação catódica** – Aplicação de corrente de  $-0,01 \text{ A}$  em meio de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Estes procedimentos são similares aos encontrados na literatura (SALAZAR-BANDA et al., 2006; TERASHIMA et al., 2003) e tinham duração de aproximadamente 16 minutos quando apenas a ativação catódica era realizada e 30 minutos quando ambas as ativações eram realizadas. A ativação catódica foi realizada diariamente previamente ao uso do eletrodo. Já a ativação anódica foi realizada apenas quando era observada em voltametria cíclica ( $0,0$  a  $1,4 \text{ V}$ ;  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  uma corrente de fundo que superava  $10 \mu\text{A}$ .

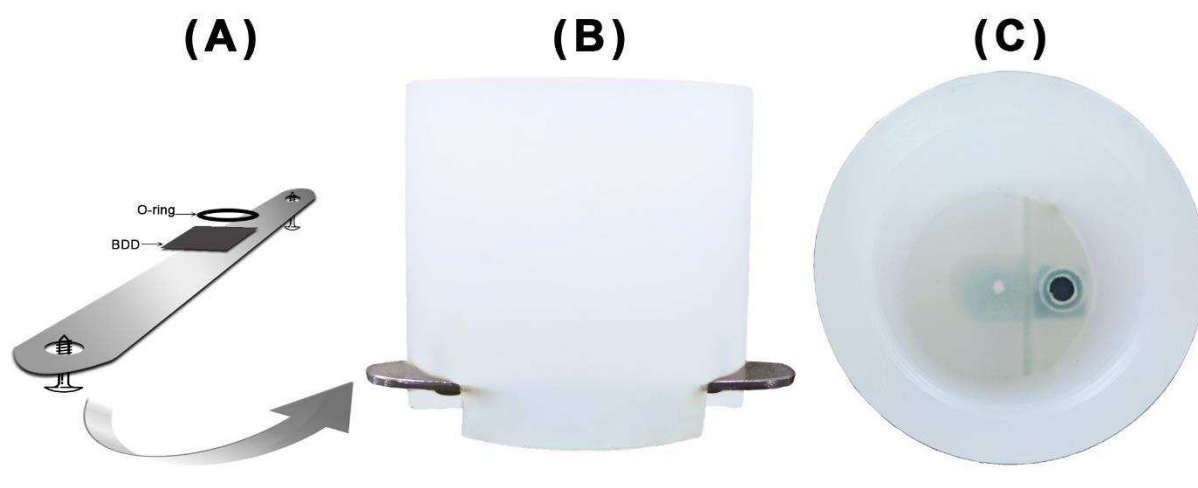
Em todos os experimentos utilizou-se um eletrodo de referência de  $\text{Ag}/\text{AgCl}(\text{KCl}_{\text{sat}})$ , preparado no próprio laboratório por meio da deposição de  $\text{AgCl}$  sobre um fio de  $\text{Ag}$  através da



aplicação do potencial de +0,3 V em meio a uma solução de HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> durante 1,0 hora (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996). Um fio de platina foi utilizado como eletrodo auxiliar.

### 3.1.3. Células eletroquímicas

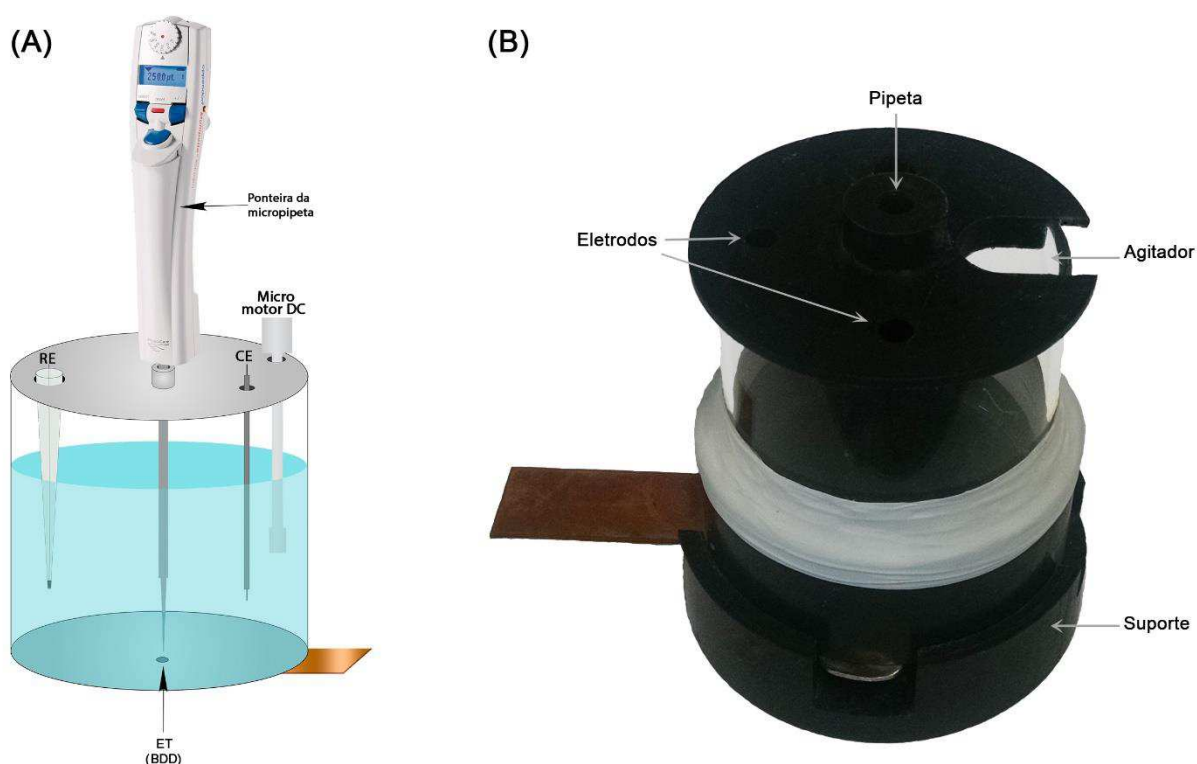
Uma célula eletroquímica de polipropileno com diâmetro externo de 5 cm, diâmetro interno de 3,5 cm, altura de 4,5 cm e com volume total de 25 mL foi utilizada nas medidas voltamétricas estacionárias (voltametria cíclica e SWV). Na parte inferior da célula, o eletrodo de trabalho de BDD (0,7 cm x 0,7 cm) foi posicionado com a utilização de um anel de borracha (O-ring, 0,18 cm<sup>2</sup>) e fixado com o auxílio de uma placa metálica (contato elétrico) e parafusos, como mostrado na Figura 9.



**Figura 9.** (A) Esquema de fixação e contato elétrico do eletrodo de BDD na célula eletroquímica convencional. (B) Vista frontal da célula eletroquímica (modo convencional ou estacionário); (C) Vista superior da célula com o eletrodo de BDD posicionado no fundo da mesma (área geométrica definida pelo O-ring).

Os estudos em BIA foram realizados utilizando-se uma célula eletroquímica cilíndrica de vidro construída no próprio laboratório (TORMIN et al., 2011). A célula eletroquímica apresenta diâmetro interno de 6,3 cm, altura de 7,8 cm e volume total de 200 mL. Duas tampas de polietileno foram fixadas nas duas extremidades do cilindro de vidro. A tampa de polietileno posicionada na parte inferior da célula continha apenas um orifício posicionado no centro com

diâmetro = 5 mm ( $\text{área} = 0,2 \text{ cm}^2$ ), onde um O-ring e o eletrodo de BDD foram posicionados de modo semelhante ao descrito na célula utilizada nas medidas voltamétricas estacionárias (convencional). A tampa da parte superior da célula continha quatro orifícios para posicionar os eletrodos de referência, auxiliar, um para o sistema de agitação da solução no interior da célula BIA (sendo este opcional) e ainda um no centro da tampa para posicionar a ponteira da micropipeta eletrônica (injeção de solução). A célula foi construída de forma que a ponteira da micropipeta ficasse a uma distância de 2 mm do eletrodo de BDD durante a injeção (QUINTINO; ANGNES, 2004b). Na Figura 10 é mostrada a imagem da célula BIA usada neste trabalho.



**Figura 10.** (A) Esquema de uma célula BIA e (B) Imagem da célula BIA usada nos estudos.

O sistema de agitação da solução é composto por um micro motor DC de 12 V (usado em secador de cabelo ou brinquedos elétricos), construído no próprio laboratório (PEREIRA et al., 2012), onde uma haste de teflon foi adaptada ao eixo deste micro motor. A velocidade de agitação foi controlada através de uma fonte universal de tensão variável de 3 a 12 V (700 a 4000 rpm), sendo que a velocidade de agitação aumentava com o aumento da voltagem selecionada. Nas injeções das soluções no sistema BIA foi utilizada uma micropipeta eletrônica (Eppendorf® Multipipette stream) que permite a injeção de volumes entre 10 a 1000  $\mu\text{L}$ , usando

um combitip (ponteira) de 1 mL com velocidades de injeção de 28 a 350  $\mu\text{L s}^{-1}$ . A Figura 11 apresenta as imagens do micromotor, da fonte universal de tensão variável e da micropipeta eletrônica utilizadas no trabalho.



**Figura 11.** Sistema de agitação para a célula BIA e micropipeta eletrônica usada no procedimento de injeção do sistema BIA.

#### 3.1.4. Análises comparativas por cromatografia líquida

Os resultados obtidos na análise de amostras farmacêuticas contendo PAR, PRO e CAF pelos métodos propostos foram comparados com os obtidos por HPLC. Nestas análises foi utilizado o equipamento Shimadzu LC-10 VP com detector UV-Vis (SPD – 10AV), coluna cromatográfica com fase estacionária  $C_{18}$  (Phenomenex, 250 mm x 4.60 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), bomba de duplo pistão LC-10AD-VP e injetor manual com alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$ . A fase móvel era composta por metanol e água na proporção 55:45 (v/v). O comprimento de onda fixado para a determinação dos três compostos foi de 260 nm e a vazão da fase móvel foi de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , adaptado de DINÇ; KÖKDİL; ONUR, 2001.

### 3.2. Soluções, reagentes e preparação das amostras

Todas as soluções utilizadas foram preparadas em água deionizada obtida de sistema de purificação (Millipore Direct-Q3) com resistividade superior ou igual a 18 MΩ cm. A Tabela 1 apresenta todos os reagentes utilizados neste trabalho com sua respectiva procedência e pureza.

**Tabela 1.** Reagentes usados neste trabalho e sua respectiva procedência

Reagente	Procedência	Pureza
Ácido acético	Synth	99,7%
Ácido bórico	Sigma-Aldrich	P.A
Ácido fosfórico	Synth	85%
Ácido sulfúrico	Vetec	98%
Cafeína (CAF)	Synth	P.A
Etanol	Vetec	99,5%
Hidróxido de sódio	Vetec	P.A
Metanol	Vetec	99,8%
Paracetamol (PAR)	Synth	P.A
Propifenazona (PRO)	Sigma-Aldrich	99%

As soluções estoque de PAR, PRO e CAF foram preparadas a partir da dissolução de quantidades adequadas de seus sais em etanol, para a obtenção de soluções com concentração final de 1510 mg L<sup>-1</sup>, 460 mg L<sup>-1</sup> e 970 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A preparação das soluções estoque em etanol foi necessária devido à baixa solubilidade da PRO em água. Posteriormente, todas essas soluções foram diluídas de forma apropriada em eletrólito de suporte composto por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Já a solução de tampão Britton-Robinson utilizada nos estudos por voltametria cíclica foi preparada pela mistura de ácidos acético, fosfórico e bórico, todos em concentração de 0,04 mol L<sup>-1</sup>. A concentração final deste eletrólito foi estimada em 0,12 mol L<sup>-1</sup>, considerando-se a soma das concentrações dos componentes do tampão. Os pHs das soluções tampão Britton-Robinson foram ajustados com NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>.

As amostras farmacêuticas contendo PRO, PAR e CAF como princípios ativos foram adquiridas em farmácias locais (Uberlândia - MG) na forma de comprimidos. Na análise dessas amostras, 4 comprimidos foram pesados e triturados até a obtenção de um pó fino e homogêneo.

Posteriormente, uma quantidade adequada do pó obtido foi dissolvida em etanol para preparo da solução de estoque. Em seguida alíquotas dessa solução foram diluídas no eletrólito de suporte para posterior análise.

### **3.3. Procedimentos empregados no cálculo de alguns parâmetros analíticos**

#### **3.3.1. Limite de detecção**

O limite de detecção (LD) é definido como a quantidade mínima de uma espécie que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições experimentais estabelecidas pelo método (SKOOG; WEST; HOLLER, 1997). O LD foi calculado pela equação 1:

$$LD = \frac{3 \times DPb}{b} \quad (1)$$

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

#### **3.3.2. Limite de quantificação**

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração da espécie analítica que pode ser quantificada com exatidão (concordância com o valor verdadeiro correspondente) e precisão (proximidade entre medidas sucessivas na mesma amostra) aceitáveis na amostra por meio das condições experimentais adotadas (BRITO et al., 2003). O LQ foi calculado pela equação 2:

$$LQ = \frac{10 \times DPb}{b} \quad (2)$$

#### **3.3.3. Repetibilidade**

É definida como o grau de concordância entre os resultados de medidas sucessivas de uma mesma amostra e devem ser executadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade (INMETRO, 2007), que são:

- Mesmo procedimento de medição;

- Mesmo analista;
- Mesmo equipamento;
- Mesmo laboratório;
- Repetições das medidas em curto intervalo de tempo.

A repetibilidade do método é verificada em uma faixa de concentração que está dentro do intervalo linear do método podendo ser expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas. O desvio padrão relativo é calculado pela equação 3:

$$DPR (\%) = \frac{DPx}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

$DPx$  é o desvio padrão da concentração encontrada.

$\bar{x}$  é a média das medidas de concentração encontrada.

#### **3.3.4. Especificidade e seletividade**

A especificidade e a seletividade estão relacionadas com a detecção. O método que fornece resposta para apenas uma espécie analítica é chamado específico. Um método que produz respostas para mais de um analito, mas que consegue diferenciar a resposta de um analito da de outros é denominado seletivo. Entretanto, esses dois termos são com muita frequência utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações (INMETRO, 2007). A seletividade mede o grau de interferência de outras espécies, impurezas, excipientes e produtos de degradação e outros compostos com propriedades similares que também possam estar presentes na amostra.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

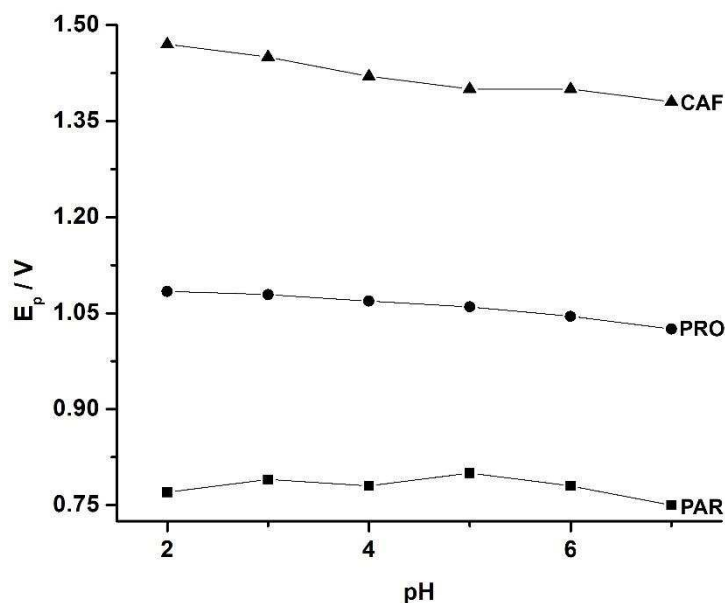
### **4.1. Considerações gerais**

Os resultados e discussões deste trabalho foram dividido em três partes. Na primeira parte serão apresentados e discutidos os resultados referentes a determinação simultânea de PAR, PRO e CAF por voltametria de onda quadrada (SWV) empregando uma célula convencional de análise (modo estacionário) e o método de calibração de adição de padrão. Na segunda parte serão apresentados os resultados do desenvolvimento do método de análise desses compostos por SWV associada ao sistema BIA. Na terceira parte, os estudos relacionados ao desenvolvimento do método para a determinação destes três princípios ativos em formulações farmacêuticas por BIA com detecção por amperometria de múltiplos pulsos são apresentados.

### **4.2. Parte I: Determinação simultânea de PAR, PRO e CAF em formulações farmacêuticas por voltametria de onda quadrada**

#### **4.2.1. Comportamento eletroquímico do PAR, PRO e CAF em eletrodo de BDD**

Inicialmente, os comportamentos eletroquímicos do PAR, PRO e CAF foram estudados em diferentes eletrólitos por meio da voltametria cíclica e usando BDD como eletrodo de trabalho. Nestes estudos foram utilizados o tampão BR 0,12 mol L<sup>-1</sup> (pH de 2 a 7) e uma solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A Figura 12 mostra o efeito do pH no potencial de oxidação ( $E_p$ ) de cada um dos compostos estudados.

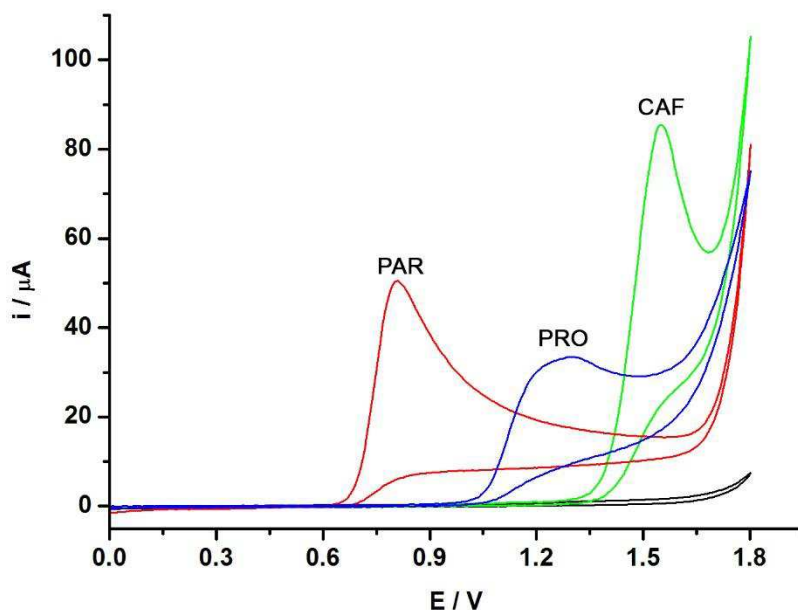


**Figura 12.** Separação entre os potenciais de oxidação de PAR (■), PRO (●) ou CAF (▲) em função do pH do meio. Eletrólito: tampão BR 0,12 mol L<sup>-1</sup> usando NaOH para acerto do pH (2 a 7); concentração: 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de cada espécie; técnica: voltametria cíclica; velocidade de varredura: 50 mV s<sup>-1</sup>; incremento de potencial: 5 mV.

Percebe-se que o potencial de oxidação dos três compostos varia pouco na faixa de pH estudada. Além disto, observa-se que há uma separação entre os respectivos potenciais de oxidação ( $\geq 0,25$  V) dos compostos (útil em determinações simultâneas). Um comportamento similar também foi observado em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Considerando o parâmetro seletividade, todas as soluções estudadas apresentaram desempenho similar (boa separação entre os respectivos picos de oxidação). No entanto, a solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> requer um procedimento mais simples e rápido de preparo, além de ser um meio onde o eletrodo de BDD apresenta excelente desempenho (inclusive usado em sua limpeza eletroquímica). Em função disto, a solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi selecionada para ser usada nos estudos seguintes.

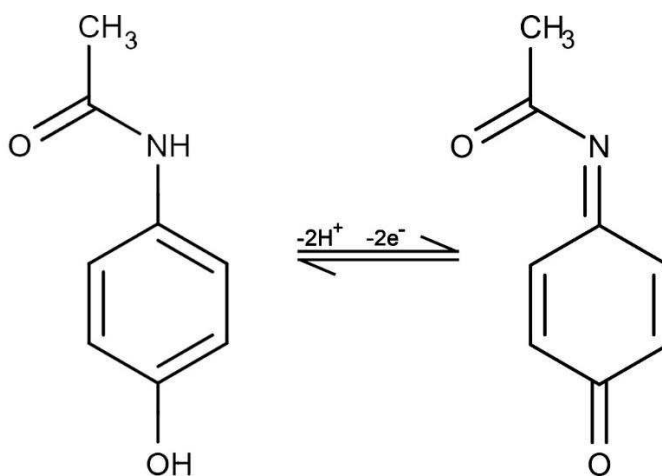
A Figura 13 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para os compostos estudados em meio de eletrólito de suporte composto por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> antes (—) e após a adição de 1 mmol L<sup>-1</sup> de PAR (—) ou PRO (—) ou CAF (—).





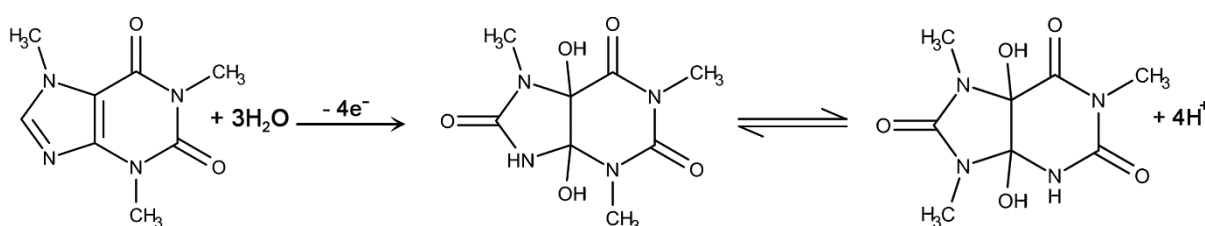
**Figura 13.** Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  antes (—) e após a adição de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de PAR (—) ou PRO (—) ou CAF (—). Velocidade de varredura:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ; incremento de potencial:  $5 \text{ mV}$ .

Pode-se observar que o PAR é oxidado a N-acetil-p-benzoquinonaimina em potenciais acima de  $+0,6 \text{ V}$  com a transferência de dois prótons e dois elétrons. Nestas condições, na varredura reversa, o produto da oxidação do PAR pode ser reduzido em potenciais abaixo de  $+0,1 \text{ V}$  (processo pouco sensível neste meio), sendo este então, um processo quase reversível (DOS SANTOS et al., 2008; WANGFUENGKANAGUL; CHAILAPAKUL, 2002). A Figura 14 apresenta o esquema simplificado do processo de oxidação do PAR.



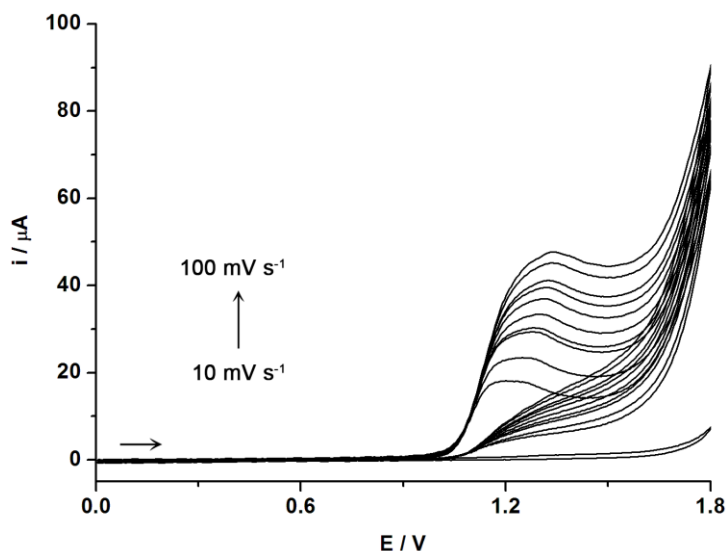
**Figura 14.** Mecanismo simplificado da oxidação do PAR.

O processo de oxidação da CAF começa em potências próximos a +1,3 V e seu mecanismo de oxidação já foi estudado anteriormente usando BDD como eletrodo de trabalho (LOURENÇÃO et al., 2009; SPĂTARU et al., 2002; ŠVORC et al., 2012a). Como descritos nestes trabalhos, a reação de oxidação da CAF acontece em duas etapas, sendo que na primeira etapa ocorre a formação da 8-oxi-cafeína envolvendo a transferência de 2 prótons e 2 elétrons. Na segunda etapa, a 8-oxi-cafeína é oxidada a 4,5-diidroxi-1,3,7-trimetiltetraidro-1H-purina-2,6,8-triona e 4,5-diidroxi-1,7,9-trimetiltetraidro-1H-purina-2,6,8-triona que apresenta estrutura análoga ao ácido úrico, etapa que também envolve 2 prótons e 2 elétrons. A Figura 15 mostra o mecanismo da reação global de oxidação eletroquímica da CAF.



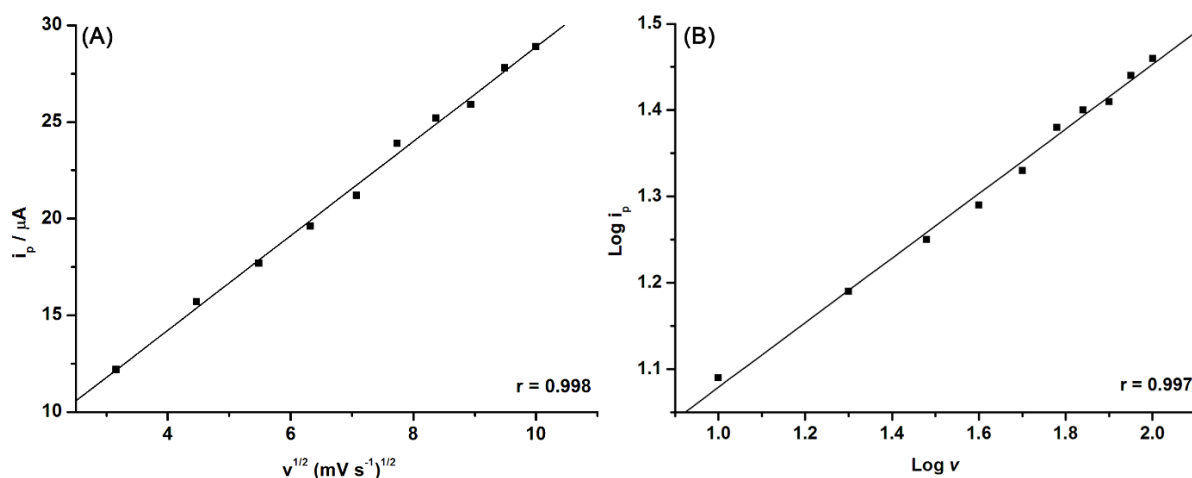
**Figura 15.** Mecanismo simplificado da oxidação da cafeína.

A oxidação da PRO se inicia próximo ao potencial de +1,0 V e, segundo nosso conhecimento, o mecanismo de oxidação eletroquímica desta molécula não foi estudado anteriormente. Com o objetivo de obter algumas informações sobre o processo eletroquímico existente entre a PRO e o eletrodo de BDD, alguns estudos foram realizados. A Figura 16 mostra a influência da velocidade de varredura sobre o comportamento eletroquímico da PRO em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e usando BDD como eletrodo de trabalho.



**Figura 16.** Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para a oxidação da PRO 1,0 mmol L<sup>-1</sup>. Eletrodo de trabalho: BDD; eletrólito de suporte: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>; incremento de potencial: 5 mV.

Este estudo foi realizado com o propósito de identificar se o processo de oxidação da PRO é controlado por difusão ou adsorção de suas moléculas na interface do eletrodo solução. Utilizando-se os dados da variação da velocidade de varredura na voltametria cíclica e a corrente detectada foram construídos dois gráficos: **(A)** relação entre corrente de pico ( $i_p$ ) e raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ); **(B)** relação entre  $\log i_p$  e  $\log v$ . Ambos os gráficos são apresentados na Figura 17.



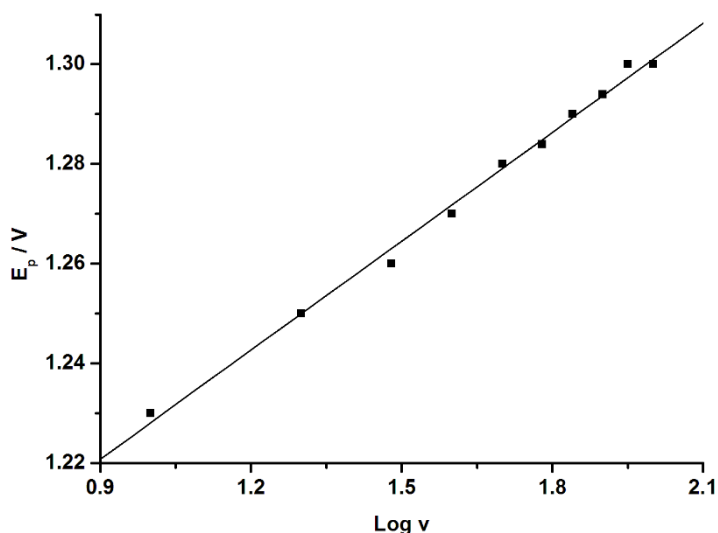
**Figura 17.** Relação entre corrente de pico e velocidade de varredura para oxidação da PRO 1 mmol L<sup>-1</sup> sobre eletrodo de BDD em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0, mol L<sup>-1</sup>. **(A)**  $i_p$  vs  $v^{1/2}$  **(B)**  $\log i_p$  vs  $\log v$ .

Estes resultados demonstram que existe uma relação linear entre  $i_p$  e  $v^{1/2}$  ( $r = 0,998$ ) no intervalo de velocidade de varredura estudado. Este comportamento indica que o processo de oxidação da PRO é controlado preferencialmente por difusão das espécies no eletrodo de BDD. Essa informação pode ser confirmada por meio do gráfico de  $\log i_p$  vs  $\log v$  que também apresenta relação linear ( $r = 0,997$ ) na oxidação da PRO com coeficiente angular igual a 0,37. Este valor confirma que a natureza do processo de oxidação é preferencialmente por difusão, pois de acordo com a literatura (DAVID K. GOSSER, 1994), valores próximos a 0,5 indicam processos controlados por difusão e valores próximo a 1,0 processos controlados preferencialmente por adsorção.

Para sistemas irreversíveis, a relação entre potencial de pico e a velocidade de varredura é dada pela equação 4 (PLETCHER et al., 2001):

$$E_p / \log v = 30 \text{ mV} / \alpha n \quad (4)$$

Onde,  $\alpha$  é o coeficiente de transferência de carga e  $n$  o número de elétrons transferidos na reação de oxidação. A Figura 18 apresenta o gráfico que mostra a relação entre potencial de pico e o logaritmo da velocidade de varredura para os voltamogramas mostrados na Figura 16.



**Figura 18.** Relação entre potencial de pico ( $E_p$ ) e  $\log v$  para oxidação da PRO.

Pode-se observar um comportamento linear com coeficiente de correlação igual a 0,997 e com a seguinte equação da reta:

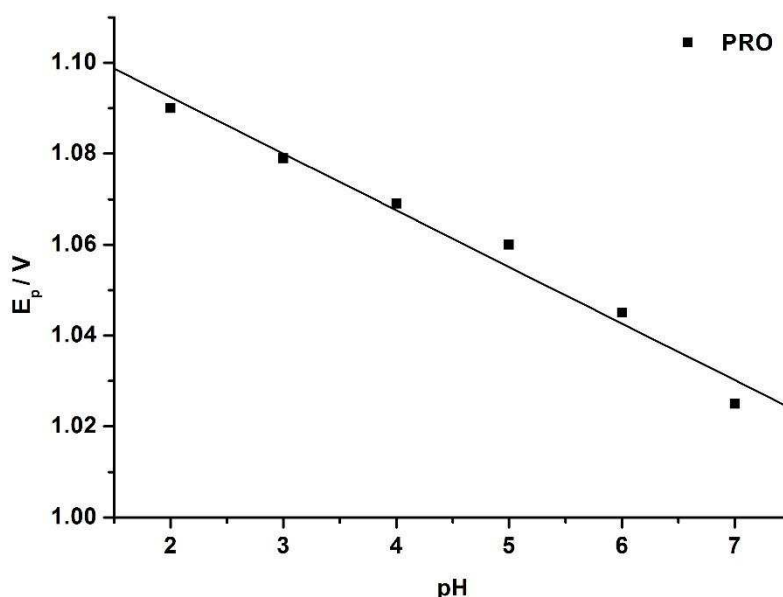
$$E_p = 1,1553 + 0,0728 (\log v) \quad (5)$$

O número de elétrons envolvidos no processo de oxidação da PRO pode ser calculado a partir da equação (4) usando o valor da inclinação obtida na equação (5) e considerando o coeficiente de transferência de carga igual a 0,5. O valor do coeficiente de transferência de carga de 0,5 é normalmente utilizado para moléculas orgânicas em solução aquosa ou quando não se conhece o valor experimental (BARD; FAULKNER, 1944). O valor de  $\alpha n$  foi calculado como sendo igual a 0,41 e o valor de  $n = 0,82$ . Como o resultado calculado é próximo de 1, supõe-se que na oxidação da PRO ocorre a transferência de um elétron.

Por meio da relação entre o potencial de pico de oxidação da PRO e do pH é possível a determinação no número de prótons envolvidos no processo de oxidação. A equação 6 mostra a dependência do potencial de oxidação com o pH (WEINBERG et al., 2007).

$$E_p = E^{0'} + \frac{0,059m}{n} pH \quad (6)$$

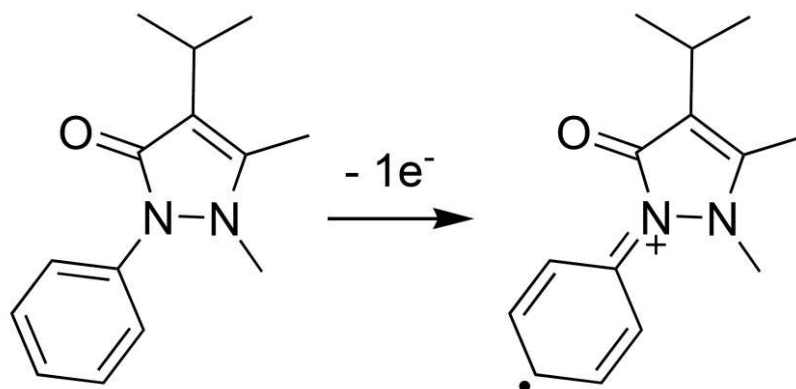
Onde,  $E^{0'}$  é o potencial formal e  $m$  e  $n$  são o número de prótons e elétrons transferidos na reação, respectivamente. A Figura 19 mostra o gráfico de  $E_p$  vs pH para a PRO.



**Figura 19.** Variação do  $E_p$  em função do pH para PRO. Outras condições, ver Figura 12.

Pode-se observar uma pequena variação do potencial de pico em relação ao pH. A reta obtida para a PRO apresenta coeficiente angular de  $-0,012 \text{ V pH}^{-1}$  ( $r = 0,988$ ). Substituindo este valor na equação 6, obtém-se o valor de 0,20 prótons. Como este valor está próximo a zero, isso indica que não há transferência de prótons no processo de oxidação da PRO.

Diante disto, foi proposto o mecanismo de oxidação da PRO mostrado na Figura 20, no qual ocorre apenas a transferência de um elétron. O mecanismo proposto leva em consideração os resultados obtidos pelos estudos eletroquímicos realizados no qual foi demonstrado o envolvimento de um elétron no processo, a não reversibilidade da reação e a não ou pouca dependência do pH do meio.



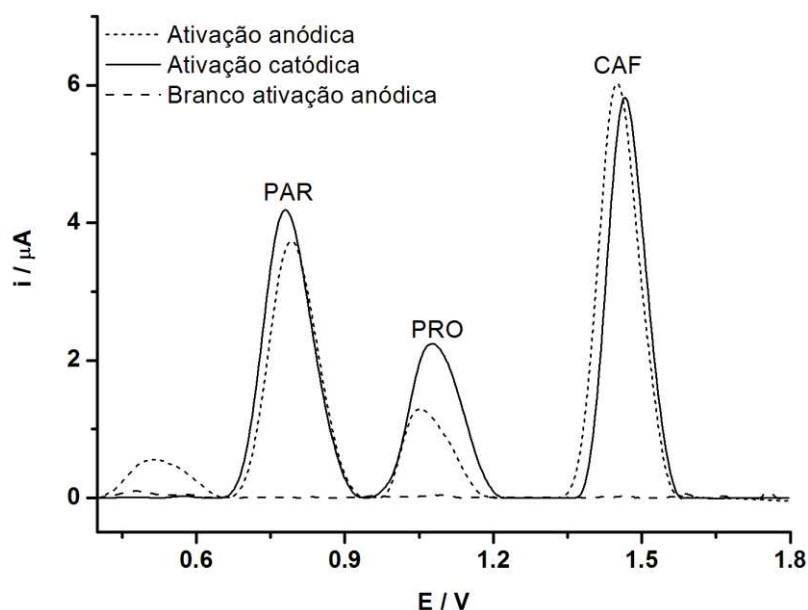
**Figura 20.** Mecanismo proposto para a oxidação da PRO.

No mecanismo apresentado na Figura 20, foi proposto que a PRO é oxidada dando origem a um radical. A oxidação ocorre em um nitrogênio terciário ligado a um anel aromático, sendo este tipo de oxidação similar ao observado na oxidação da molécula *N,N*-dimetilanilina (DMA) (IVASHENKO et al., 2013). Assim como a PRO, a DMA também possui um anel aromático ligado a um nitrogênio terciário. Dessa forma, em função dos estudos realizados, temos vários indicativos que o mecanismo proposto para a oxidação da PRO é o apresentado na Figura 20.

#### 4.2.2. Efeito da ativação do eletrodo de BDD

O eletrodo de BDD apresenta diferentes polaridades superficiais dependendo do método de ativação (“limpeza eletroquímica”) empregado. Sendo que a ativação anódica aumenta o número de terminações contendo oxigênio e grupos hidroxila e a ativação catódica as terminações contendo hidrogênio, o que pode alterar o comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD frente a alguns compostos (DE BARROS et al., 2005). Em função disto, a influência do tipo de ativação do eletrodo de BDD na determinação de PAR, PRO e CAF foi estudada. A Figura 21 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução

contendo  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de PAR, PRO e CAF após a realização de cada um dos procedimentos de ativação do eletrodo de BDD.



**Figura 21.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução contendo  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de PAR, PRO e CAF após a ativação anódica (---) e ativação catódica (—) do eletrodo de BDD. Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $f = 60 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 50 \text{ mV}$ ;  $\Delta E = 4 \text{ mV}$ . Com correção de linha de base.

A análise da Figura 21 mostra que com a realização da ativação anódica ocorre o surgimento de um pico próximo ao potencial de  $+0,5 \text{ V}$ , o qual não é observado na ativação catódica. Pode-se observar ainda que a PRO apresenta melhor sensibilidade quando o eletrodo recebe a ativação catódica. Para PAR e CAF, os resultados obtidos são similares em ambas as ativações. Com base nos resultados neste estudo, o pré-tratamento catódico foi utilizado nos estudos subsequentes.

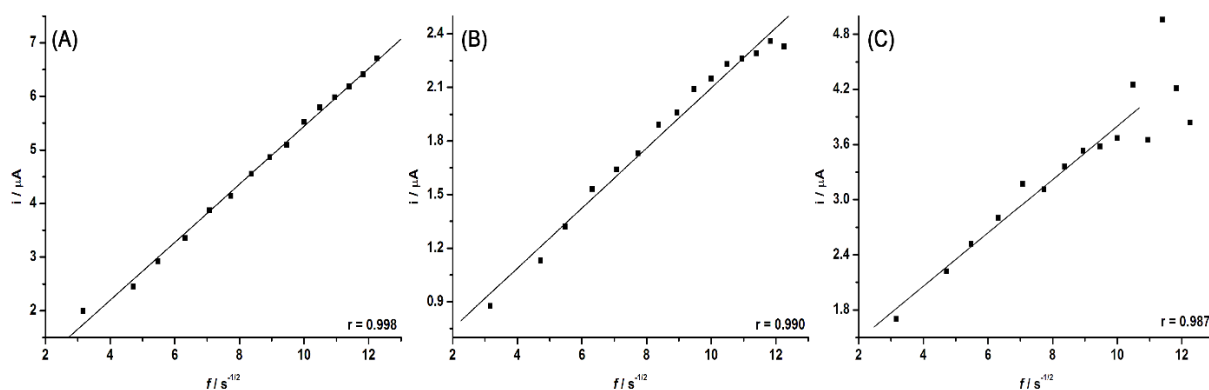
#### 4.2.3. Otimização dos parâmetros de voltametria de onda quadrada

No desenvolvimento de um método de análise empregando voltametria de onda quadrada se faz necessário a otimização de alguns parâmetros para a obtenção de melhor resposta em relação sensibilidade e perfil voltamétrico: frequência de aplicação dos pulsos de potenciais ( $f$ ), amplitude de pulso de potencial ( $a$ ), incremento de varredura de potencial ( $\Delta E$ ) e potencial de condicionamento.

#### 4.2.3.1. Frequência de aplicação de pulsos de potenciais

A frequência de aplicação dos pulsos de potenciais é um parâmetro muito importante na voltametria de onda quadrada, pois pode ser utilizada na obtenção de detalhes a respeito do mecanismo pelos quais as reações ocorrem, da reversibilidade de processos de oxidação ou redução, além de permitir o cálculo de parâmetros como  $\alpha n$  em sistemas irreversíveis (LOVRIC; KOMORSKY-LOVRIC, 1988).

No processo de oxidação do PAR, PRO e CAF, o aumento da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais provocaram o aumento da corrente de pico e deslocamento dos potenciais de pico desses compostos para valores mais positivos. Nestes estudos, a amplitude e o incremento de potencial foram fixados em 50 mV e 4 mV, respectivamente. A Figura 22 mostra a relação entre a corrente de pico e a raiz quadrada da frequência de aplicação dos pulsos ( $f^{1/2}$ ) de potenciais entre 10 s<sup>-1</sup> e 150 s<sup>-1</sup> na análise de uma solução contendo 4 mg L<sup>-1</sup> de PAR, PRO e CAF.

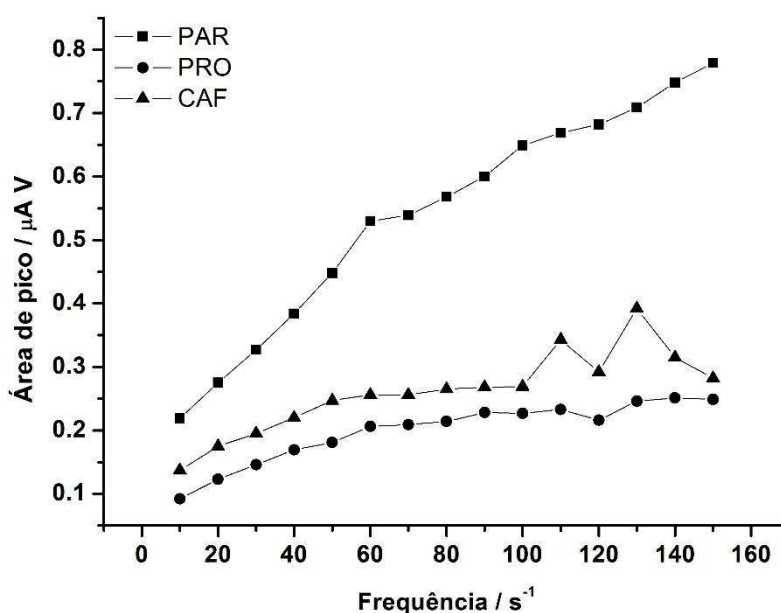


**Figura 22.** Relação entre corrente de pico e a raiz quadrada da frequência de aplicação dos pulsos ( $f^{1/2}$ ) de potenciais para **(A)** PAR 4 mg L<sup>-1</sup>, **(B)** PRO 4 mg L<sup>-1</sup>; **(C)** CAF 4 mg L<sup>-1</sup>;  $\alpha = 50$  mV;  $\Delta E = 4$  mV;

Na voltametria de onda quadrada, os processos de oxidação controlados preferencialmente pela difusão das espécies variam linearmente com a raiz quadrada da frequência. Como pode ser observado na Figura 22, este comportamento foi observado para as três espécies estudadas. No caso da CAF, uma melhor relação de linearidade foi obtida até  $f = 100$  s<sup>-1</sup>, o que indica que os processos de oxidação desses compostos em eletrodo de BDD são preferencialmente controlados pelo transporte de massa, o que está de acordo com o que foi reportado na literatura para PAR (ŠVORC et al., 2012b) e CAF (SPĂȚARU et al., 2002).



A Figura 23 mostra como a área de pico varia com a variação da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais. Como pode ser observado, ocorre um aumento linear das áreas dos picos de PAR, PRO e CAF até a frequência de  $50 \text{ s}^{-1}$ . Em frequências acima de  $50 \text{ s}^{-1}$ , as áreas dos picos do PAR continuam aumentando e as áreas dos picos da PRO e CAF se mantêm relativamente constantes. Em frequências acima de  $100 \text{ s}^{-1}$ , as áreas de pico da CAF não variam de forma constante como pode ser observado pelos valores de área de pico para  $110$  e  $130 \text{ s}^{-1}$  na Figura 23.

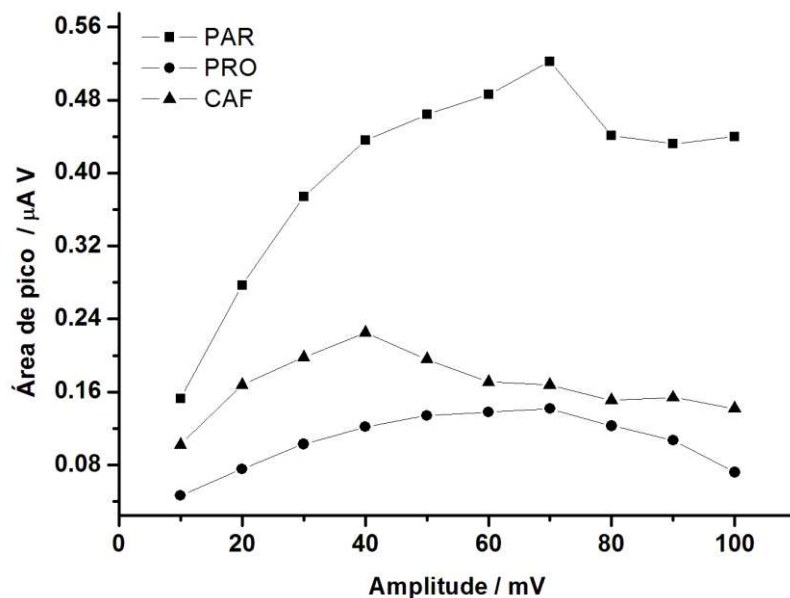


**Figura 23.** Variação da área de pico para uma solução contendo  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de PAR, PRO e CAF em função da frequência de aplicação do pulso de potencial. Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E = 4 \text{ mV}$ .

A frequência selecionada para os experimentos posteriores foi de  $60 \text{ s}^{-1}$ , pois apresentou boa sensibilidade para PRO e CAF e uma linha de base mais estável (maior relação sinal/ruído).

#### 4.2.3.2. Amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais

O segundo parâmetro estudado foi a influência da variação da amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais na detecção dos três princípios ativos alvos do presente estudo. A Figura 24 mostra a variação da área de pico para PAR, PRO e CAF em relação a variação deste parâmetro em que se manteve constante a frequência em  $60 \text{ s}^{-1}$  e o incremento de potencial em  $4 \text{ mV}$ .



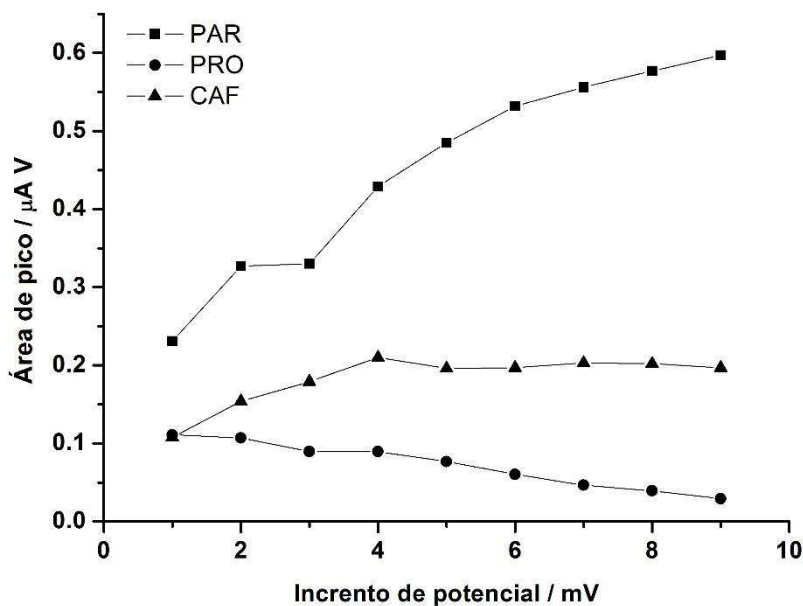
**Figura 24.** Relação entre área de pico e amplitude de pulso aplicada para uma solução contendo  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de PAR, PRO e CAF. Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $f = 60 \text{ s}^{-1}$  e  $\Delta E = 4 \text{ mV}$ .

A área de pico para os três compostos estudados apresenta aumento linear até amplitude de 40 mV. Em amplitudes acima de 40 mV ocorre uma diminuição na área de pico da CAF e um pequeno aumento na área de pico de oxidação da PRO. Para o PAR ocorre a diminuição da área de pico a partir da aplicação de 70 mV. A partir desses resultados, a amplitude de 40 mV foi selecionada para fins analíticos, pois apresentou melhor sensibilidade para a CAF (espécie presente em menor concentração em amostras farmacêuticas).

#### 4.2.3.3. Incremento de varredura de potencial

O incremento de potencial ( $\Delta E$ ) é a diferença de altura entre um degrau de potencial e o degrau seguinte em uma escada de potenciais aplicada ao eletrodo de trabalho. Juntamente com a frequência de aplicação dos pulsos de potenciais define a velocidade de varredura na SWV (NUWER; O'DEA; OSTERYOUNG, 1991).

Mantendo-se a frequência e amplitude constantes em  $60 \text{ s}^{-1}$  e 50 mV, respectivamente, o incremento de potencial foi estudado na faixa entre 1 a 9 mV. A área de pico obtida para cada um dos compostos estudados em função do valor de incremento de potencial aplicado é exibida na Figura 25.

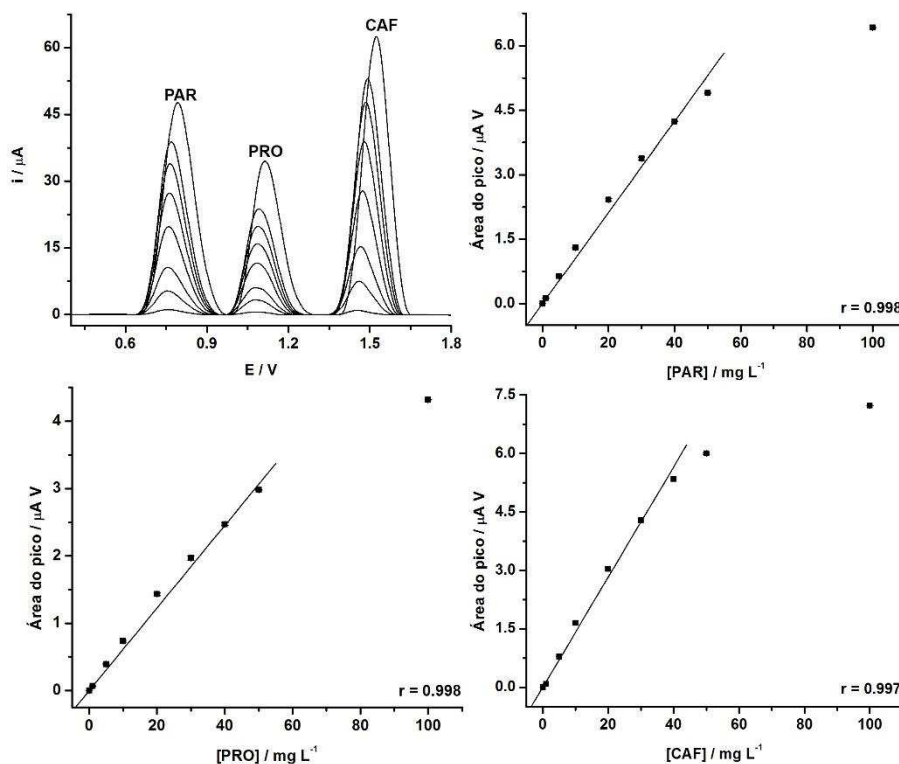


**Figura 25.** Relação entre área de pico e incremento de potencial para solução contendo 4 mg L<sup>-1</sup> de PAR, PRO e CAF. Eletrólito: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>;  $f = 60 \text{ s}^{-1}$ ;  $\Delta E = 50 \text{ mV}$ .

Três comportamentos diferentes podem ser observados em relação a área do pico com o aumento de incremento de potencial aplicado: (i) a área de pico do PAR aumenta com o aumento de incremento de potencial aplicado; (ii) a área de pico da CAF aumenta até um valor de 4 mV. Para valores maiores, a área se mantém relativamente constante; (iii) a área do pico da PRO apresenta comportamento diferente ocorrendo a diminuição da mesma à medida que o incremento de potencial aumenta. Em função dos resultados apresentados, o incremento de potencial de 4 mV foi selecionado para ser utilizado nos experimentos subsequentes.

#### 4.2.4. Definição das faixas lineares de resposta

A determinação da faixa linear de resposta para PAR, PRO e CAF foi realizada utilizando os parâmetros otimizados da SWV. A Figura 26 mostra os voltamogramas obtidos na análise de soluções contendo concentrações crescentes de PAR, PRO e CAF (1 – 100 mg L<sup>-1</sup>).

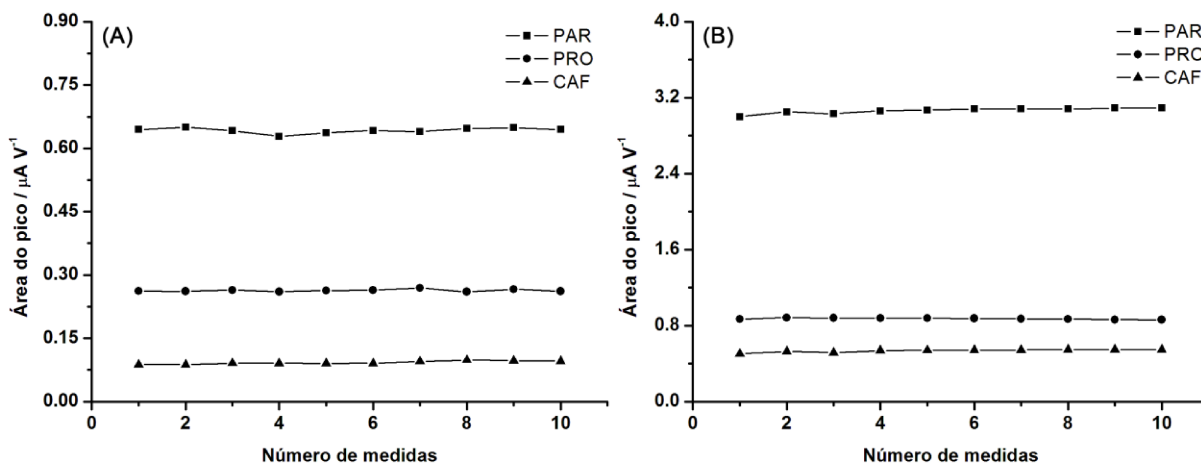


**Figura 26.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos para soluções contendo concentrações crescentes de PAR, PRO e CAF ( $1 - 100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $f = 60 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 40 \text{ mV}$  e  $\Delta E = 4 \text{ mV}$ .

Com base nos voltamogramas e nas curvas de calibração para PAR, PRO e CAF apresentadas na Figura 26, as seguintes faixas lineares de resposta foram obtidas: de 1 a  $50 \text{ mg L}^{-1}$  para PAR e PRO, de 1 a  $40 \text{ mg L}^{-1}$  para CAF.

#### 4.2.5. Repetibilidade

Após todos os parâmetros da SWV terem sido otimizados para a obtenção das melhores condições de trabalho para a determinação simultânea desses fármacos, o estudo de repetibilidade do método proposto foi realizado. Na Figura 27 são mostrados os resultados obtidos na análise sucessivas de duas soluções com concentrações diferentes **(A)**  $1,5 \text{ mg L}^{-1} + 4,5 \text{ mg L}^{-1} + 7,5 \text{ mg L}^{-1}$ ; **(B)**  $4,5 + 13,5 + 22,5$  de CAF, PRO e CAF, respectivamente.



**Figura 27.** Resultados obtidos por SWV na análise sucessivas de duas soluções com concentrações diferentes **(A)**  $1,5 \text{ mg L}^{-1} + 4,5 \text{ mg L}^{-1} + 7,5 \text{ mg L}^{-1}$  e **(B)**  $4,5 + 13,5 + 22,5$  de CAF, PRO e CAF, respectivamente ( $n = 10$ ).

A Figura 27 apresenta resultados que mostram que há variações pequenas na área de pico do PAR, PRO e CAF para as duas concentrações estudadas. É possível ainda perceber que não há a contaminação significativa do eletrodo de trabalho, pois decaimentos da área dos picos não são observados para nenhum dos compostos estudados. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) calculados para o PAR, PRO e CAF em **(A)** foram 1,0 %, 1,0 % e 4,1 % e em **(B)** 1,0 %, 0,9 % e 2,9 %, respectivamente.

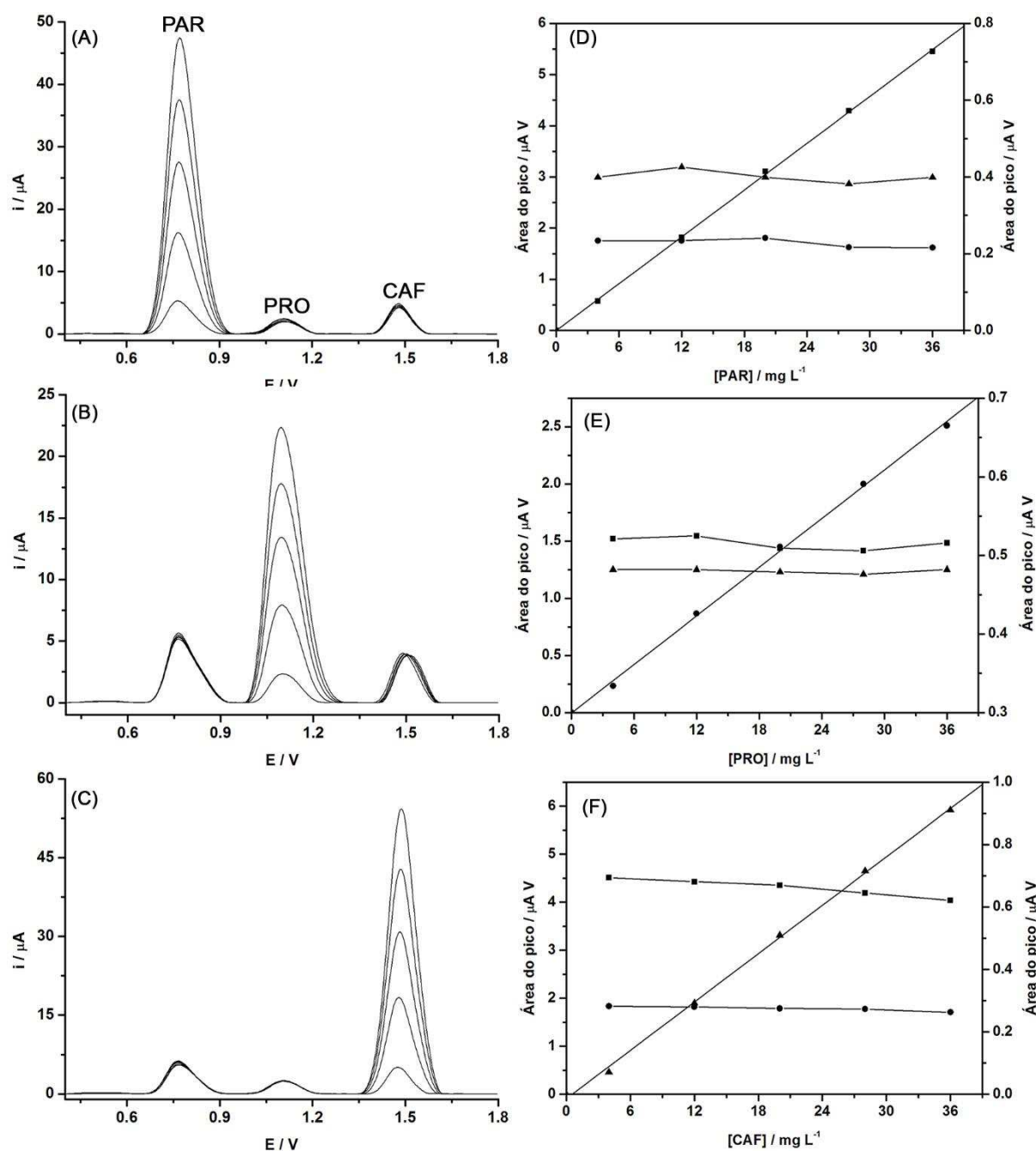
#### 4.2.6. Interferência entre PAR, PRO e CAF

Um estudo para avaliar a possível interferência recíproca dos princípios ativos na análise proposta foi investigada. Para esse estudo, a concentração de apenas um dos compostos foi sucessivamente aumentada, enquanto que as concentrações dos outros dois compostos foram mantidas constantes durante todo o experimento.

Durante a realização desse experimento foi observada a necessidade da utilização de um potencial de condicionamento ou limpeza eletroquímica antes do início de cada varredura por SWV, pois haviam desvios consideráveis nos valores de corrente de pico para os compostos em que a concentração era mantida constante durante as medidas. Os seguintes potenciais de condicionamento foram estudados: -0,2, -1,5 e -1,8 V. Inicialmente, o potencial de -0,2 V (20 s) foi testado, no entanto, a aplicação deste potencial de condicionamento não apresentou efeito

significativo para a manutenção do sinal analítico dos compostos durante a análise. Como a limpeza/ativação eletroquímica do eletrodo de BDD ocorre em potenciais mais negativos (entre -2 V e -3 V), potenciais mais negativos foram estudados para a obtenção de um melhor condicionamento/limpeza do eletrodo de trabalho e consequente melhora na repetibilidade. A aplicação de -1,8 V por 20 s diminuiu consideravelmente as variações dos valores de corrente de oxidação das espécies estudadas, no entanto, também provocou a redução excessiva do  $H^+$  presente no eletrólito de suporte (geração de  $H_2$ ). O potencial de -1,5 V (20 s) foi o que apresentou resultados mais reprodutíveis e foi adotado como potencial de condicionamento nos estudos subsequentes.

A Figura 28 mostra o experimento realizado para avaliar a interferência recíproca entre os compostos empregando o potencial de condicionamento selecionado. Neste estudo, as concentrações de dois princípios ativos foram mantidas constantes em  $4\text{ mg L}^{-1}$  e a concentração do terceiro composto foi variado ( $4 - 36\text{ mg L}^{-1}$ ). O experimento foi realizado para cada um dos princípios ativos.



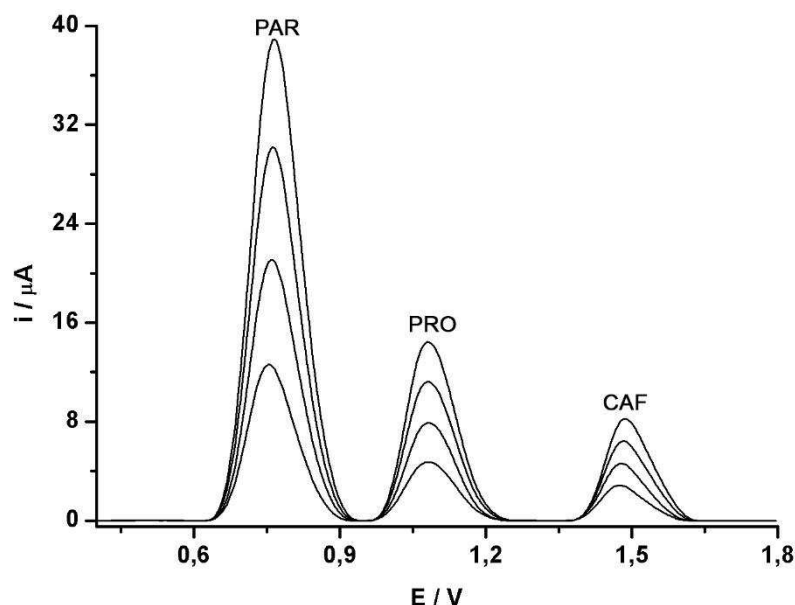
**Figura 28.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos para soluções contendo concentrações (A) crescentes de PAR (4 – 36 mg L<sup>-1</sup>) e constantes de PRO e CAF (4 mg L<sup>-1</sup>); (B) crescentes de PRO (4 – 36 mg L<sup>-1</sup>) e constantes de PAR e CAF (4 mg L<sup>-1</sup>); (C) crescentes de CAF (4 – 36 mg L<sup>-1</sup>) e constantes de PAR e PRO (4 mg L<sup>-1</sup>). Variação das áreas dos picos do (D;■) PAR, (E;●) PRO e (F;▲) CAF em relação as suas respectivas concentrações. Demais condições experimentais como na Figura 26.

Na Figura 28 pode ser observado que as áreas dos picos de oxidação do PAR (A e D), PRO (B e E) e CAF (C e F) aumentam linearmente com o aumento da concentração ( $r = 0,999$  para os três analitos). Por outro lado, as áreas dos picos de oxidação dos compostos que as concentrações foram mantidas fixas durante o experimento se mantiveram relativamente constantes (DPR = 4,4 %; 4,0 e 3,9 % para PAR, PRO e CAF, respectivamente). Isso mostra que o aumento da concentração de um dos princípios ativos não tem influência significativa na área de pico e/ou potencial de pico dos demais compostos na faixa de concentração estudada, o que demonstra que os processos de oxidação dos compostos são independentes.

#### **4.2.7. Análises de formulações farmacêuticas contendo PAR, PRO e CAF por SWV**

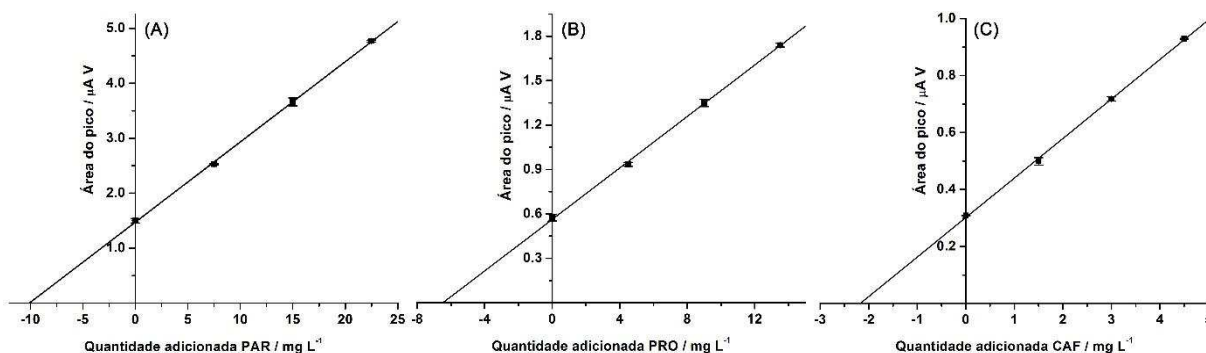
As análises de formulações farmacêuticas foram realizadas utilizando os parâmetros otimizados anteriormente. As curvas de adição de padrão para PAR, PRO e CAF foram obtidas em faixas de concentrações diferentes considerando a proporção existente entre estes princípios ativos em formulações farmacêuticas comerciais (1:3:5 para CAF:PRO:PAR, respectivamente). A Figura 29 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos na análise de uma amostra adequadamente diluída em  $H_2SO_4$  usando o método de adição de padrão (solução amostra + adição de três concentrações crescentes de PAR, PRO e CAF).





**Figura 29.** Voltamogramas de onda quadrada obtidas para uma solução amostra e adições de concentrações crescentes de PAR (7,5; 15,0 e 22,5 mg L<sup>-1</sup>), PRO (4,5; 9,0 e 13,5 mg L<sup>-1</sup>) e CAF (1,5; 3,0 e 4,5 mg L<sup>-1</sup>). Demais condições experimentais como na Figura 26.

A Figura 30 apresenta as curvas de adição de padrão obtidas para PAR, PRO e CAF com dados provenientes da Figura 29 (n = 3).



**Figura 30.** Curvas de adição de padrão obtidas para (A) PAR, (B) PRO e (C) CAF a partir de dados obtidos dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 29.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos na análise de amostras farmacêuticas contendo PAR, PRO e CAF com seus respectivos desvios padrões (n = 3).

**Tabela 2.** Resultado para a análise de PAR, PRO e CAF em amostras farmacêuticas utilizando o método proposto.

	Valor da bula (mg/comprimido)			Valores encontrados (mg/comprimido)		
	PAR	PRO	CAF	PAR	PRO	CAF
<b>Amostra 1</b>	250	150	50	249 ± 4	156 ± 4	54 ± 3
<b>Amostra 2</b>	250	150	50	255 ± 4	160 ± 2	55 ± 2

A Tabela 3 reúne as características analíticas do método proposto.

**Tabela 3.** Características do método proposto para determinação simultânea de PAR, PRO e CAF.

Características	PAR	PRO	CAF
<b>Faixa linear (mg L<sup>-1</sup>)</b>	1 - 50	1 - 50	1 - 40
<b>DPR intra-dia (n = 10)</b>	1,0%	1,0%	4,1%
<b>DPR inter-dia (n = 6)</b>	5,2 %	5,4%	7,6%
<b>Limite de detecção (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,005	0,009	0,006
<b>Limite de quantificação (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,02	0,03	0,02
<b>Frequência analítica* (análises h<sup>-1</sup>)</b>	20	20	20

\*No cálculo da frequência analítica, os seguintes tempos foram considerados: 20 s de condicionamento, 10 s de equilíbrio, 5 s da realização da SWV e 10 s para manuseio das soluções (45 x 4 = 180 s).

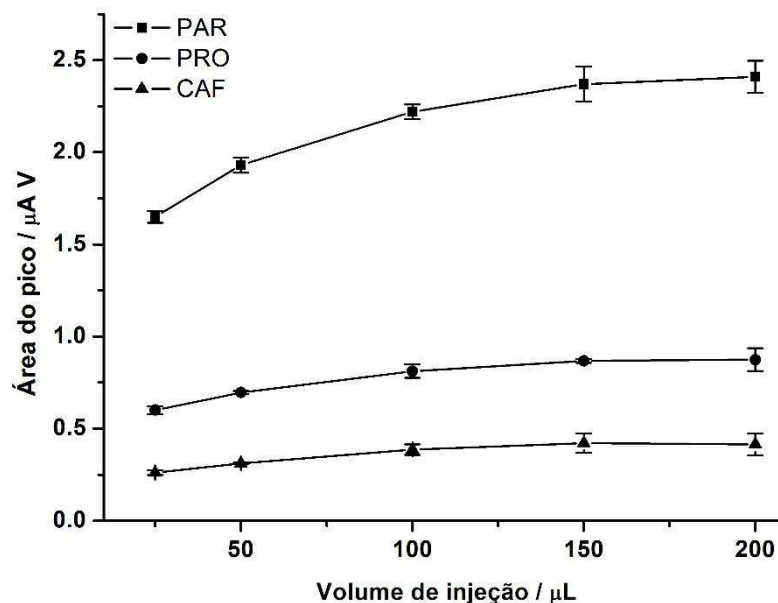
### **4.3. Parte II: Determinação simultânea de PAR, PRO e CAF por análise por injeção em batelada com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV)**

O desenvolvimento do método para a análise simultânea de PAR, PRO e CAF empregando BIA-SWV foi realizado utilizando os parâmetros da SWV previamente otimizadas:  $f = 60 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$  e  $\Delta E = 4 \text{ mV}$ . Neste método também foi aplicado o potencial de limpeza/condicionamento eletroquímico de  $-1,5 \text{ V}$  durante  $20 \text{ s}$ .

A injeção das alíquotas das soluções padrão ou amostra foram realizadas no sistema BIA quando faltavam exatamente 2 segundos para término da etapa de condicionamento. A alíquota injetada permanecia próximo da superfície do eletrodo de trabalho por um período longo o suficiente para que a varredura empregando SWV fosse realizada. Após a análise, a solução no interior da célula era agitada e o volume de solução padrão ou amostra previamente injetada era diluída no eletrólito do interior da célula BIA. Em seguida, uma nova injeção era possível. Este procedimento já foi usado anteriormente (OLIVEIRA et al., 2016).

#### **4.3.1. Volume de injeção**

O volume de injeção no sistema BIA foi estudado, sendo que a injeção foi realizada faltando 2 s para finalização do tempo de equilíbrio aplicado ao eletrodo de BDD. A Figura 31 mostra a relação existente entre o volume injetado (50 a 200  $\mu\text{L}$ ) e a área de pico do PAR, PRO e CAF.

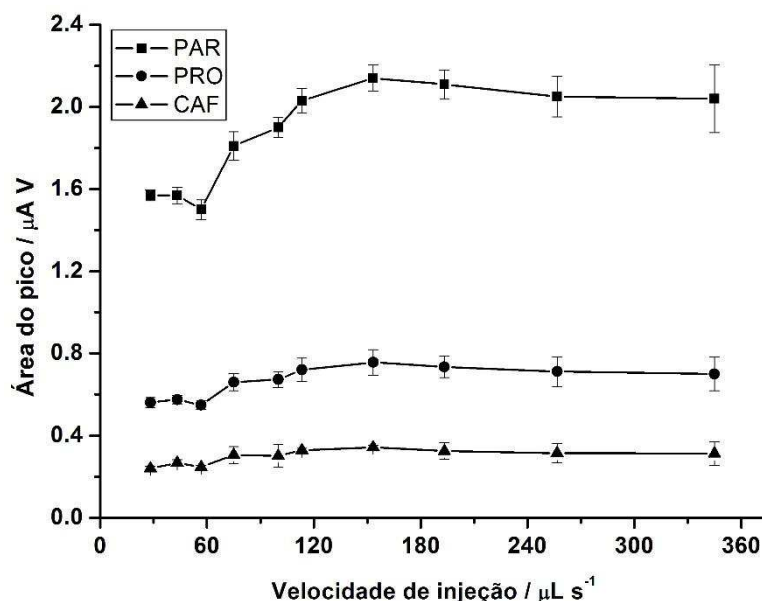


**Figura 31.** Variação da área de pico para PAR ( $37,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), PRO ( $22,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e CAF ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) em função do volume injetado. Velocidade de injeção:  $75 \mu\text{L s}^{-1}$ . Demais condições idem Figura 26.

Analisando a Figura 31 pode-se perceber que o aumento do volume injetado causa um aumento na área do pico de cada um dos compostos estudados. Para o PAR, o aumento é mais significativo do que para a PRO e CAF. A partir do volume de injeção de  $100 \mu\text{L}$ , a área dos picos de PRO e CAF se permaneceram praticamente constantes. Adicionalmente, desvios maiores foram observados em volumes maiores de  $100 \mu\text{L}$ . Por isto, o volume de  $100 \mu\text{L}$  foi utilizado nos estudos subsequentes.

#### 4.3.2. Velocidade de injeção

Outro parâmetro investigado foi a influência da velocidade de injeção na área dos picos de oxidação dos princípios ativos estudados. Na Figura 32 são mostradas as áreas dos picos para PAR, PRO e CAF em função da velocidade de injeção.

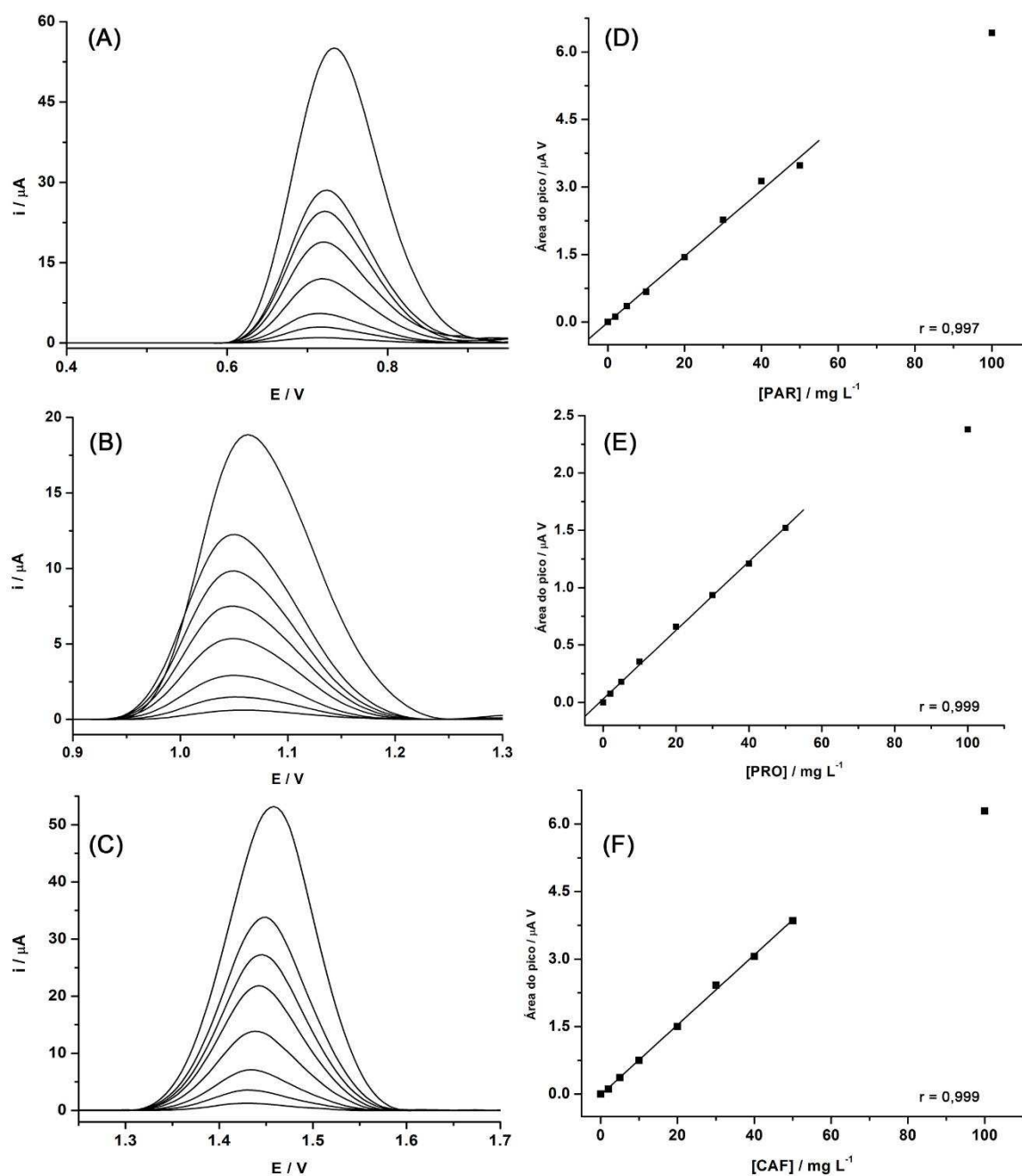


**Figura 32.** Variação da área dos picos para PAR ( $37,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), PRO ( $22,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e CAF ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) em função da velocidade de injeção. Volume injetado:  $100 \mu\text{L}$ . Demais condições idem Figura 26.

A Figura 32 mostra que com o aumento da velocidade de injeção entre  $28$  e  $120 \mu\text{L s}^{-1}$  ocorre um aumento nas áreas dos picos para os três compostos estudados. Em velocidades maiores que  $120 \mu\text{L s}^{-1}$ , a corrente detectada é relativamente constante. Pode-se observar também que as medidas se tornam menos reprodutíveis em velocidades de injeção mais altas, o que fez com que a velocidade de injeção mais lenta ( $28 \mu\text{L s}^{-1}$ ) fosse selecionada para a continuidade deste trabalho, pois nesta velocidade, o método se mostrou mais reprodutível para as espécies analisadas.

#### 4.3.3. Linearidade

Após a otimização do volume e velocidade de injeção a serem utilizados no sistema BIA-SWV, estudos foram realizadas para definir as faixas de concentração onde existe uma relação linear entre concentração e as áreas dos picos dos compostos estudados (PAR, PRO e CAF). A Figura 33 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para injeções de soluções com concentrações crescentes de PAR, PRO e CAF.

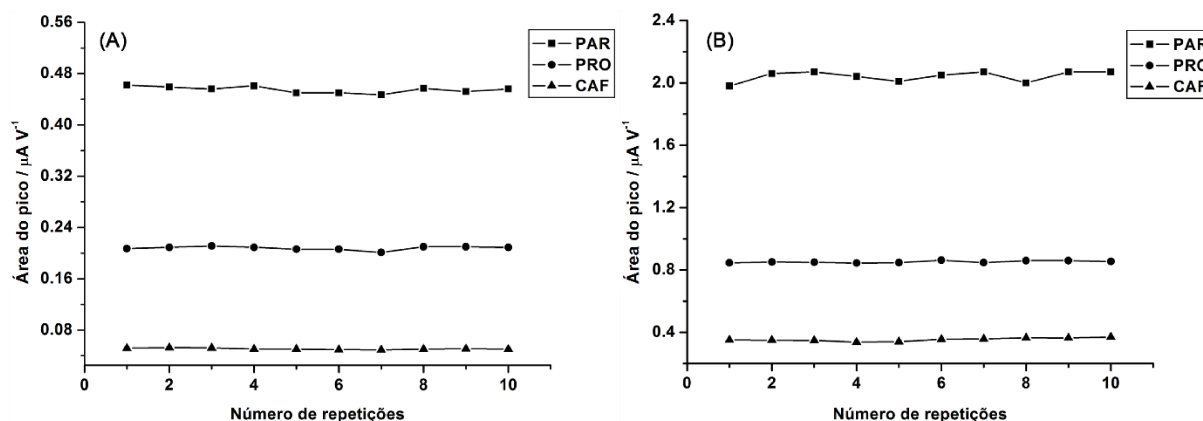


**Figura 33.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos para soluções contendo concentrações crescentes ( $2 - 100 \text{ mg L}^{-1}$ ) de **(A)** PAR, **(B)** PRO e **(C)** CAF em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Volume injetado:  $100 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $28 \mu \text{ s}^{-1}$ ;  $f = 60 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 40 \text{ mV}$  e  $\Delta E = 4 \text{ mV}$ .

A partir da Figura 33 pode ser observado que os três compostos analisados apresentam faixa linear de  $2$  a  $50 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### 4.3.4. Repetibilidade

Após a otimização de parâmetros como volume e velocidade de injeção, estudos foram realizados para avaliar a repetibilidade do método proposto (BIA-SWV). Na Figura 34 são mostrados os resultados obtidos na análise sucessiva ( $n = 10$ ) de duas soluções contendo concentrações diferentes dos três compostos: **(A)**  $1,5 \text{ mg L}^{-1} + 4,5 \text{ mg L}^{-1} + 7,5 \text{ mg L}^{-1}$ ; **(B)**  $7,5 + 22,5 + 37,5$  de CAF, PRO e PAR, respectivamente.



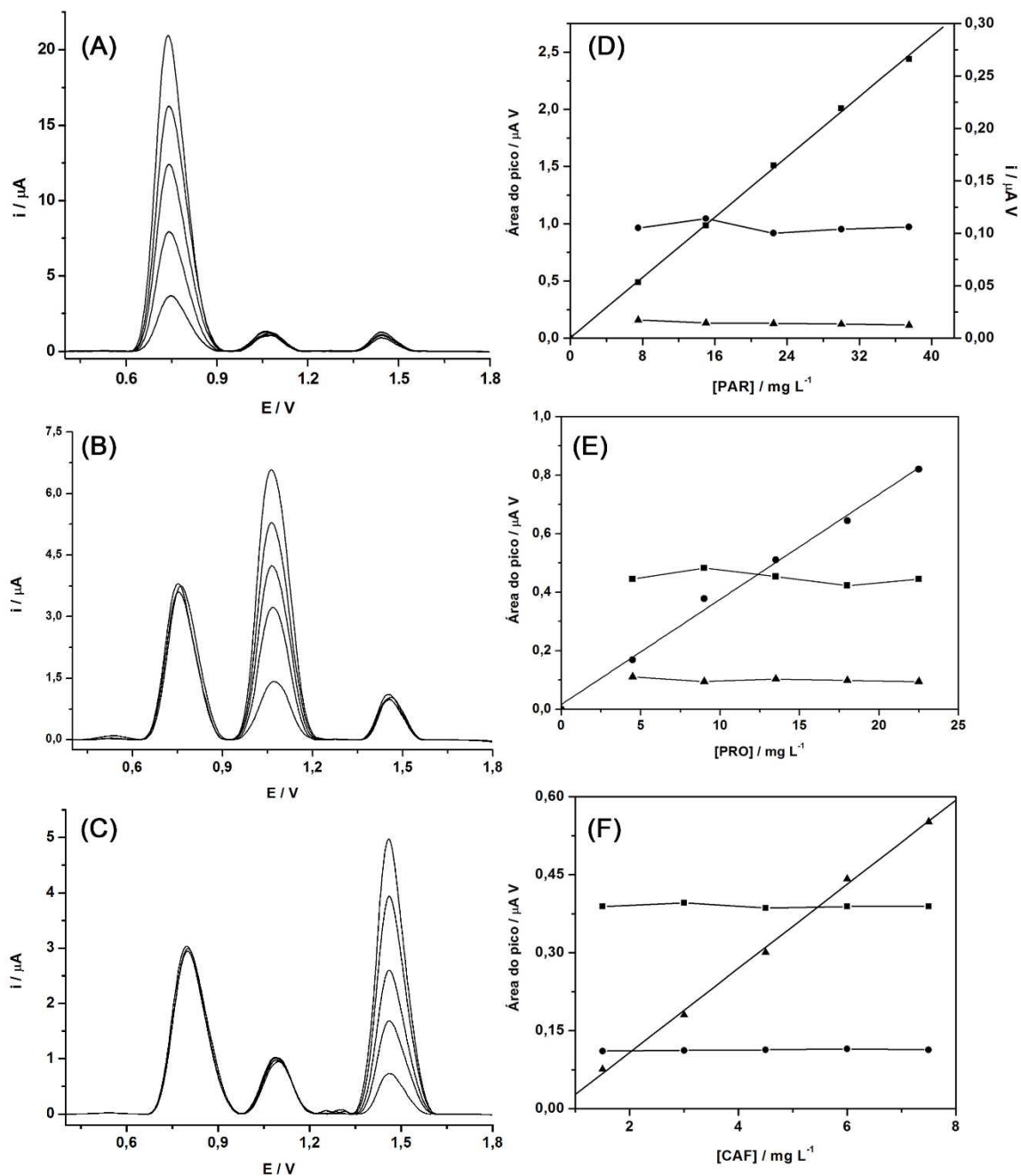
**Figura 34.** Resultados obtidos por BIA-SWV para injeções sucessivas ( $n = 10$ ) de duas soluções diferentes: (A)  $1,5 \text{ mg L}^{-1} + 4,5 \text{ mg L}^{-1} + 7,5 \text{ mg L}^{-1}$ ; (B)  $7,5 + 22,5 + 37,5$  de CAF, PRO e PAR, respectivamente. Velocidade de injeção:  $28 \mu \text{ s}^{-1}$ ; volume de injeção:  $100 \mu \text{ L}$ .

Como pode ser observado na Figura 34, pequenas flutuações podem ser observadas na área dos picos ao longo das medidas para ambas as soluções contendo PAR, PRO e CAF. Os DPR foram calculados em 1,3%, 1,5% e 2,2% em (A) e 1,9%, 1,3% e 3,1% em (B) para PAR, PRO e CAF, respectivamente. Estes resultados demonstram que o método proposto apresenta respostas estáveis e que problemas com efeito de memória estão ausentes (sem contaminação significativa da superfície do eletrodo de BDD).

#### 4.3.5. Interferência entre PAR, PRO e CAF

Para a análise de PAR, PRO e CAF utilizando o sistema BIA-SWV, a possível interferência recíproca entre estes compostos também foi estudada. Neste caso também foram feitas injeções de soluções contendo concentrações crescentes de apenas um dos compostos, enquanto a concentração dos demais foi mantida constante. A Figura 35 apresenta os voltamogramas obtidos para as soluções contendo inicialmente  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  de PAR,  $4,5 \text{ mg L}^{-1}$

de PRO e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de CAF e adições crescentes de PAR (7,5 - 37,5 mg L<sup>-1</sup>) ou PRO (4,5-22,5 mg L<sup>-1</sup>) ou CAF (1,5-7,5 mg L<sup>-1</sup>) seguindo a proporção encontrada na amostra farmacêutica.



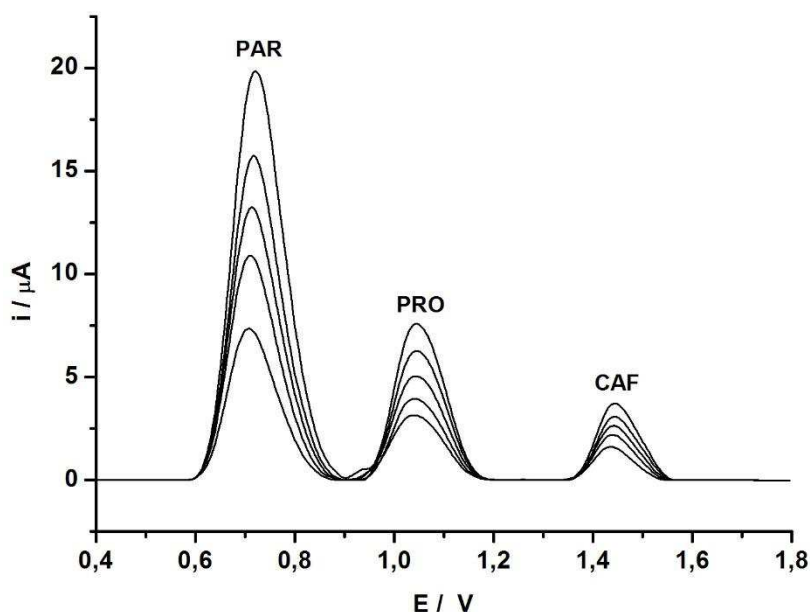
**Figura 35.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos por BIA-SWV para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de **(A)** PAR (7,5 - 37,5 mg L<sup>-1</sup>), PRO (4,5 mg L<sup>-1</sup>) e CAF (1,5 mg L<sup>-1</sup>); **(B)** PAR (7,5 mg L<sup>-1</sup>), PRO (4,5-22,5 mg L<sup>-1</sup>) e CAF (1,5 mg L<sup>-1</sup>); e **(C)** PAR (7,5 mg L<sup>-1</sup>), PRO (4,5 mg L<sup>-1</sup>) e CAF (1,5-7,5 mg L<sup>-1</sup>). Variação das áreas de pico do **(D)** PAR, **(E)** PRO e **(F)** CAF em relação a sua respectiva concentração. Demais condições experimentais ver Figura 33.



Como pode-se verificar na Figura 35, as áreas dos picos do PAR, PRO e CAF se mantêm relativamente constantes quando suas concentrações são mantidas fixas durante o estudo (DPR = 4,6 %; 4,4 e 4,2 % para PAR, PRO e CAF, respectivamente). Isso indica que na análise por BIA-SWV também não há interferência significativa destes compostos entre si. Outra observação que pode ser feita é que a área do pico aumenta de forma proporcional a concentração para PAR ( $r = 0,999$ ), PRO ( $r = 0,997$ ) e CAF ( $r = 0,999$ ) em toda a faixa de concentração avaliada.

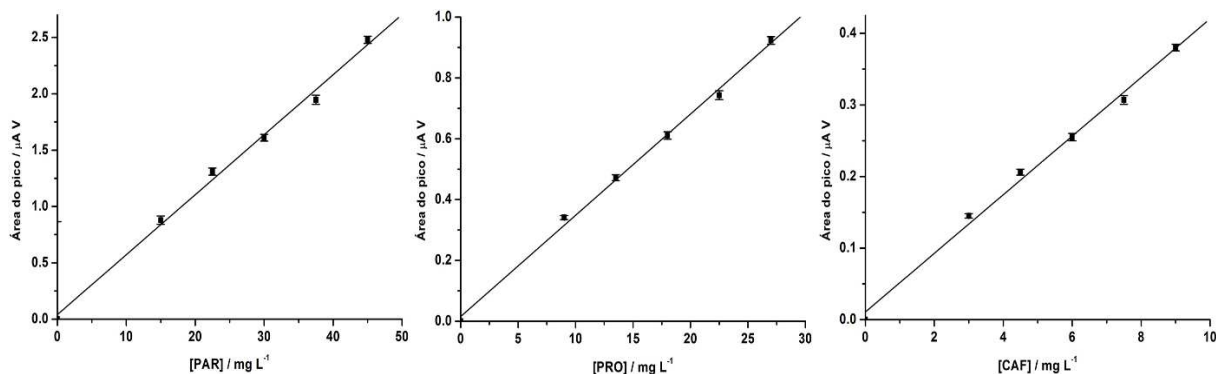
#### 4.3.6. Análise de formulações farmacêuticas contendo PAR, PRO e CAF por BIA-SWV

Para a análise de formulações farmacêuticas foram obtidas curvas de calibração com injeções de soluções contendo concentrações crescentes de PAR, PRO e CAF. A proporção em massa existente entre os compostos em estudo em amostras farmacêuticas foi mantida nas curvas de calibrações. A Figura 36 apresenta os voltamogramas obtidos para a injeção dessas soluções em ordem crescente de concentração.



**Figura 36.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos por BIA-SWV para soluções contendo concentrações crescentes de PAR (15 - 45 mg L<sup>-1</sup>), PRO (9 - 27 mg L<sup>-1</sup>) e CAF (3 - 9 mg L<sup>-1</sup>). Demais condições ver Figura 33.

Utilizando a média da área dos picos obtidos pelas injeções em triplicata para cada solução (Figura 36), as curvas de calibração para PAR, PRO e CAF foram construídas e são mostradas na Figura 37.



**Figura 37.** Curvas de calibração obtidas para PAR ( $r = 0,997$ ), PRO ( $r = 0,998$ ) e CAF ( $r = 0,997$ ). Os dados foram obtidos a partir dos voltamogramas da Figura 33.

As curvas de calibração apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração estudadas, com as seguintes equações de reta:

$$y = 0,0396 + 0,0532[\text{PAR}] \quad (r = 0,997)$$

$$y = 0,0157 + 0,0333[\text{PRO}] \quad (r = 0,998)$$

$$y = 0,0108 + 0,0409[\text{CAF}] \quad (r = 0,997)$$

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos na análise de duas amostras farmacêuticas contendo PAR, PRO e CAF utilizando o sistema BIA-SWV.

**Tabela 4.** Resultados para a análise de amostra farmacêutica por BIA-SWV.

	Valor da bula (mg/ comprimido)			BIA-SWV (mg/comprimido)		
	PAR	PRO	CAF	PAR	PRO	CAF
<b>Amostra 1</b>	250	150	50	$252 \pm 4$	$155 \pm 4$	$49 \pm 3$
<b>Amostra 2</b>	250	150	50	$247 \pm 4$	$152 \pm 3$	$54 \pm 4$

Na Tabela 5 são mostradas as características analíticas do método proposto (BIA-SWV).

**Tabela 5.** Características analíticas do método proposto (BIA-SWV).

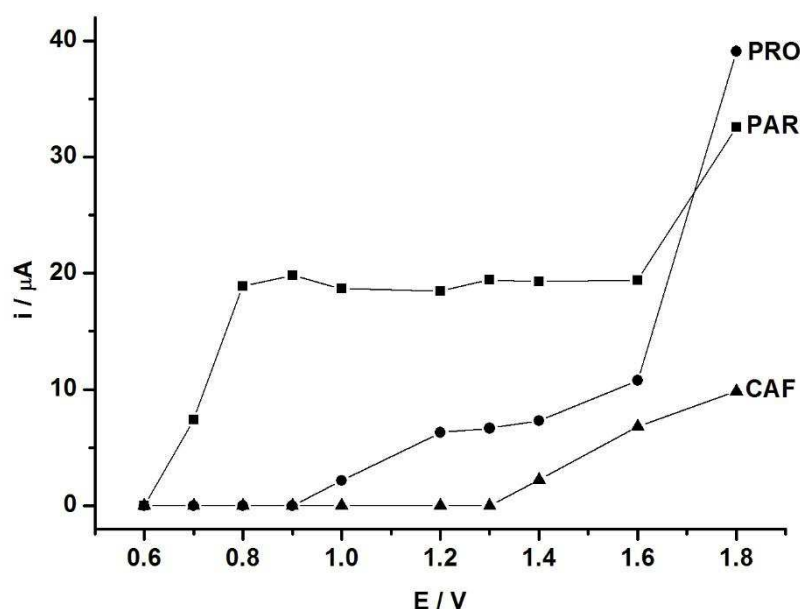
Características	Sistema BIA-SWV		
	PAR	PRO	CAF
Coeficiente de correlação (r)	0,997	0,998	0,997
Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	2 – 50	2 – 50	2 – 50
LD (mg L <sup>-1</sup> )	0,3	0,2	0,3
LQ (mg L <sup>-1</sup> )	1,0	0,7	1,0
DPR intra-dia (n = 10)	1,9%	1,5%	3,1%
DPR inter-dias (n = 3)	2,2%	2,6%	3,0%
Frequência analítica* (análises h <sup>-1</sup> )	90	90	90

\*No cálculo da frequência analítica, os seguintes tempos foram considerados: 20 s de condicionamento, 10 s de equilíbrio, 5 s da realização da SWV e 10 s para manuseio das soluções (45 x 1 = 45).

#### 4.4. Parte III: Determinação simultânea de PAR, PRO e CAF por BIA-MPA

##### 4.4.1. Comportamento eletroquímico

O comportamento eletroquímico do PAR, PRO e CAF foi estudado utilizando o sistema BIA-MPA. Neste estudo 10 pulsos de potenciais foram aplicados ao eletrodo de BDD (+0,60, +0,70, +0,80, +0,90, +1,00, +1,20, +1,30, +1,40, +1,60, +1,80 V; tempo de aplicação de cada potencial: 70 ms). A corrente foi monitorada continuamente em todos os potenciais aplicados durante a injeção de 10 mg L<sup>-1</sup> de CAF ou 30 mg L<sup>-1</sup> de PRO ou 50 mg L<sup>-1</sup> de PAR. A partir dos valores médios de corrente ( $n = 3$ ) obtidos em cada potencial aplicado, os voltamogramas hidrodinâmicos mostrados na Figura 38 foram construídos. Nesses e nos próximos estudos, a relação de concentração entre os princípios ativos estudados foi similar a relação existente em amostras farmacêuticas.



**Figura 38.** Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos pela injeção de soluções contendo 10 mg L<sup>-1</sup> de CAF (▲) ou 30 mg L<sup>-1</sup> de PRO (●) ou 50 mg L<sup>-1</sup> de PAR (■) no sistema BIA-MPA. Eletrólito de suporte: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>; volume injetado: 150 μL; velocidade de injeção: 75 μL s<sup>-1</sup>.

A partir dos voltamogramas hidrodinâmicos apresentados na Figura. 38, pode-se observar que entre os potenciais de +0,60 V e +0,90 V ocorre a oxidação do PAR sem a interferência da PRO e CAF. Entre +0,9 V e +1,3 V ocorrem a oxidação do PAR e da PRO. Em potenciais acima de +1,3 V, os três compostos são oxidados.

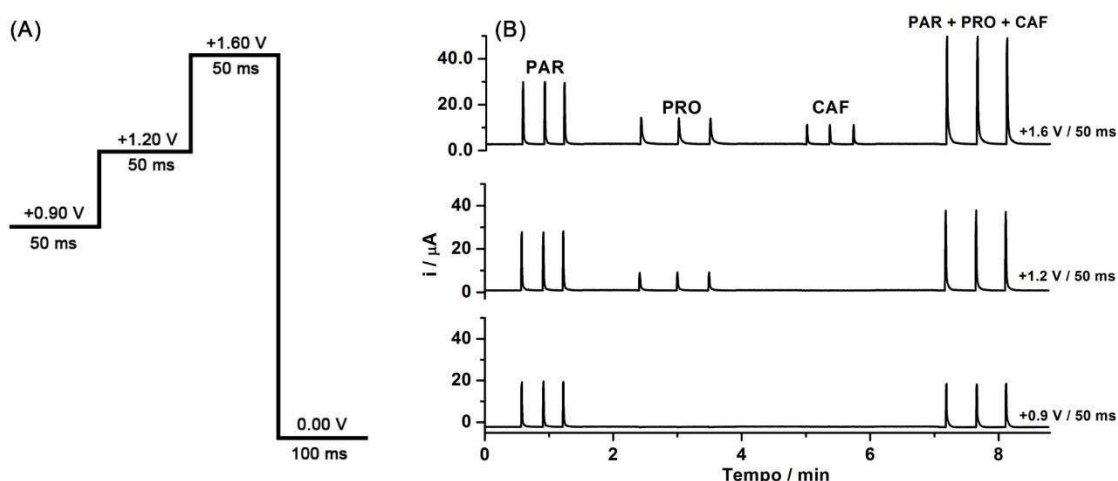
#### 4.4.2. Seleção dos pulsos de potenciais para a determinação simultânea de PAR, PRO e CAF por BIA-MPA

Com base nos resultados mostrados no item 4.4.1, quatro pulsos de potenciais foram selecionados para a determinação simultânea de PAR, PRO e CAF no sistema BIA-MPA, sendo eles:

- +0,90 V / 50 ms: oxidação do PAR sem a interferência da PRO e CAF;
- +1,20 V / 50 ms: oxidação do PAR e PRO sem a interferência da CAF;
- +1,6 V / 50 ms: oxidação das três espécies (PAR, PRO e CAF);
- 0,00 V / 100 ms: limpeza/condicionamento eletroquímico da superfície do eletrodo de BDD.

A aplicação do potencial de 0,00 V/50 ms foi necessária para evitar ou diminuir a contaminação/passivação da superfície do eletrodo de trabalho durante o experimento.

A Figura 39 (A) apresenta a escada de potencial aplicado ao eletrodo de BDD posicionado no sistema BIA-MPA. Na Figura 39 (B) são apresentados os amperogramas obtidos para injeções em triplicata de soluções contendo somente PAR ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ), somente PRO ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), somente CAF ( $6 \text{ mg L}^{-1}$ ) e uma solução contendo simultaneamente PAR + PRO + CAF ( $30 + 10 + 6 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente).



**Figura 39.** (A) Escada de potenciais aplicado ao eletrodo de BDD. (B) Amperogramas obtidos após injeções de soluções contendo somente PAR ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ), PRO ( $18 \text{ mg L}^{-1}$ ), CAF ( $6 \text{ mg L}^{-1}$ ) e PAR + PRO + CAF ( $30 + 18 + 6 \text{ mg L}^{-1}$ ). Velocidade de agitação: 1400 rpm; volume de injeção:  $150 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $100 \mu\text{L s}^{-1}$ .

Pode-se perceber analisando a Figura 39 que o PAR é oxidado no potencial de +0,90 V sem a interferência da PRO e CAF, pois respostas similares foram obtidas neste potencial na presença ou na ausência dos demais compostos. Assim, pode-se concluir que neste potencial, o PAR pode ser seletivamente determinado. Em +1,20 V, PAR e PRO foram detectados sem a interferência da CAF. Neste potencial a corrente proveniente apenas da oxidação da PRO pode ser obtida se a corrente de oxidação do PAR for previamente subtraída. No pulso de potencial de +1,60 V, os três compostos foram oxidados, neste caso, a corrente de oxidação da CAF pode ser obtida se a corrente de oxidação do PAR e PRO forem previamente subtraídos.

Os resultados apresentados na Figura 39 mostram que a magnitude da corrente de oxidação do PAR em +0,90 V (21,6  $\mu$ A), +1,20 V (27,0  $\mu$ A) e em +1,60 V (27,3  $\mu$ A) e de PRO em +1,20 V (8,39  $\mu$ A) e em +1,60 V (11,4  $\mu$ A) não são iguais, o que impede, por exemplo, que uma subtração direta da corrente detectada nos dois pulsos de potências ( $i_{+1,20\text{ V}} - i_{+0,90\text{ V}}$ ) forneça a corrente relacionada apenas a oxidação da PRO em +1,20 V. Fenômeno similar deve ser contornado para ter acesso a corrente de oxidação da CAF. Conforme descrito na literatura (FREITAS et al., 2016; GIMENES et al., 2012; PEREIRA et al., 2014), esse problema pode ser solucionado através da utilização de três fatores de correção ( $FC_1$ ,  $FC_2$  e  $FC_3$ ). Estes FCs permitem o acesso a diferença exata entre a corrente detectada para o PAR em +0,90 V e +1,20 V ( $FC_1$ ) e em +0,90 V e +1,60 V ( $FC_2$ ) e também para a PRO em +1,60 V e +1,20 V ( $FC_3$ ). Os FCs foram obtidos pela injeção de uma solução contendo apenas PAR ( $FC_1$  e  $FC_2$ ) ou apenas PRO ( $FC_3$ ) no sistema BIA-MPA e por meio das seguintes equações:

$$FC_1 = i_{\text{PAR em (+1,2 V)}} / i_{\text{PAR em (+0,9 V)}}$$

$$FC_2 = i_{\text{PAR em (+1,6 V)}} / i_{\text{PAR em (+0,9 V)}}$$

$$FC_3 = i_{\text{PRO em (+1,6 V)}} / i_{\text{PRO em (+1,2 V)}}$$

Dessa forma, após a injeção de uma solução contendo os três compostos (PAR + PRO + CAF), a corrente de oxidação proveniente apenas da PRO em +1,20 V e da CAF em +1,60 V pode ser calculada com a utilização das seguintes equações:

$$i_{\text{PRO}} = i_{+1,20\text{V}} - (FC_1 \times i_{+0,90\text{V}})$$

$$i_{\text{CAF}} = i_{+1,60\text{V}} - (FC_2 \times i_{+0,90\text{V}}) - (FC_3 \times i_{\text{PRO}})$$

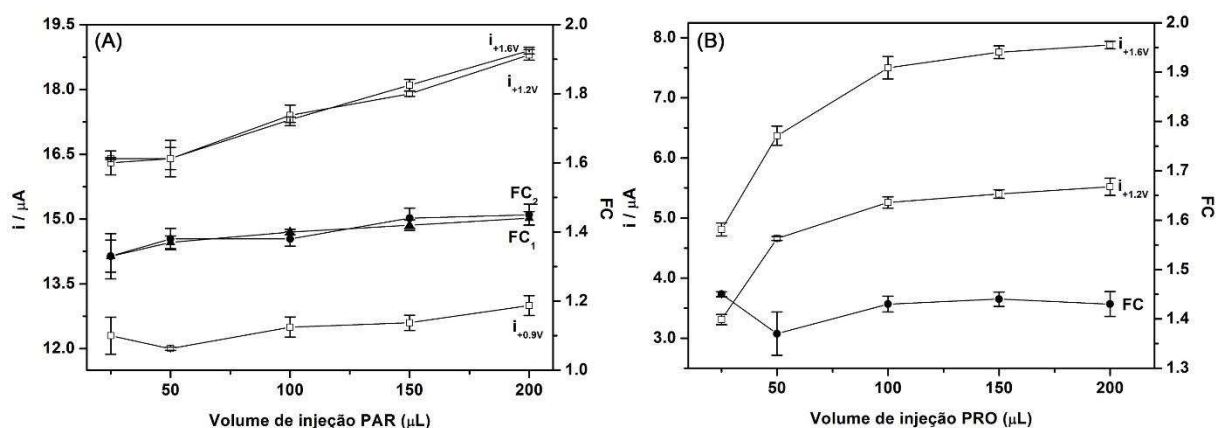
Os FCs utilizados foram obtidos em todos os dias antes das análises, juntamente com as curvas de calibração, já que pequenas variações podem ocorrer em dias diferentes.

#### 4.4.3. Otimização dos parâmetros experimentais do sistema BIA-MPA

Com a definição dos pulsos de potenciais a serem utilizados para a determinação simultânea de PAR, PRO e CAF, os parâmetros relacionados com o sistema BIA (volume de injeção, velocidade de injeção e velocidade de agitação da solução no interior da célula) foram estudados com o intuito de obter o melhor desempenho com o sistema. Para cada um desses parâmetros, as intensidades de corrente de oxidação detectada nos pulsos de potenciais selecionados foram analisadas após a injeção de duas soluções: **(1)** PAR 30 mg L<sup>-1</sup>; **(2)** PRO 18 mg L<sup>-1</sup>. As injeções dessas soluções permitem o cálculo dos FCs e ainda a determinação da influência desses parâmetros nos valores obtidos.

##### 4.4.3.1 Volume de injeção

O acesso à corrente de oxidação da PRO e CAF somente é possível mediante o uso de FCs, como descrito anteriormente. Como a análise desses compostos só pode ser realizada com precisão se os valores dos FCs forem relativamente constantes nas condições empregadas, na Figura 40 são mostrados os gráficos que relacionam os valores calculados para os FCs em função da variação no volume injetado de uma solução contendo PAR (A) e PRO (B).



**Figura 40.** Variação da corrente de oxidação e respectivos FCs em função do volume injetado no sistema BIA-MPA. **(A)** PAR 30 mg L<sup>-1</sup> detectado em +0,90 V, +1,20 V e +1,60 V; **(B)** PRO 18 mg L<sup>-1</sup> detectado em +1,20 V e +1,60 V. Velocidade de injeção: 75  $\mu L s^{-1}$ .

Na Figura 40 (A) pode-se perceber que com o aumento do volume injetado da solução de PAR ocorre um pequeno aumento da corrente de oxidação no pulso de potencial de +0,90 V. No potencial de +1,20 V e +1,60 V, o aumento da corrente de oxidação é mais significativo

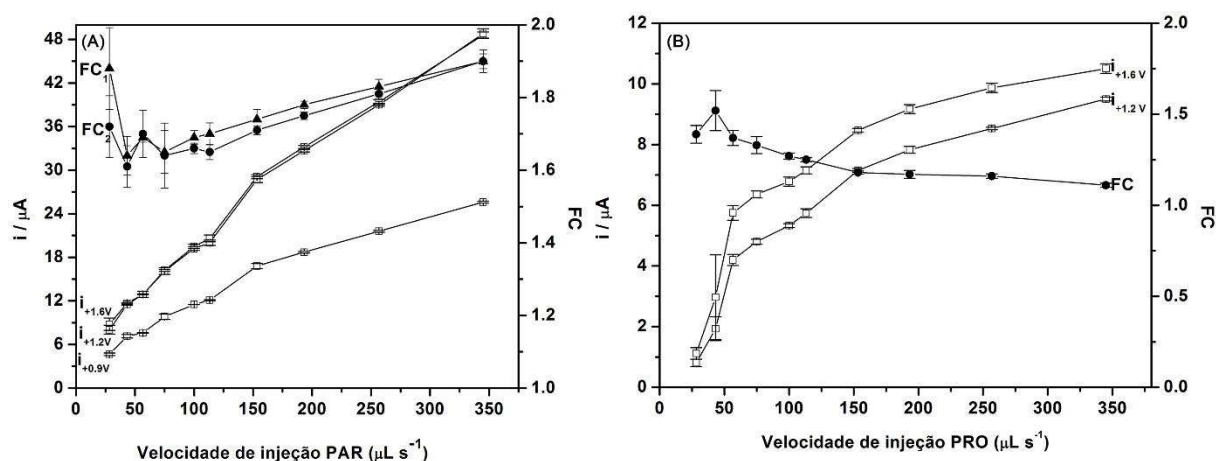
e praticamente da mesma magnitude para ambos os potenciais. Já o FC<sub>1</sub> e FC<sub>2</sub> apresentam pouca variação e são mais constantes em injeções de volumes acima de 100 µL (FC<sub>1</sub> = 1,42 ± 0,02 e FC<sub>2</sub> = 1,42 ± 0,03).

Para a PRO (Figura 40 B), o aumento no volume injetado também leva ao aumento da corrente de oxidação da PRO. No entanto, esse aumento é pouco significativo em volumes acima de 100 µL. O FC<sub>3</sub> apresenta valor relativamente constante em volumes de injeção entre 100 e 200 µL (FC<sub>3</sub> = 1,43 ± 0,01).

Dessa forma, para a continuidade do trabalho, o volume de 150 µL foi selecionado, pois apresentou FCs mais estáveis para PAR e PRO.

#### 4.4.3.2 Velocidade de injeção

Assim como o volume de injeção, a velocidade de injeção foi otimizada visando obter maior estabilidade na obtenção dos FCs, além de boa sensibilidade na corrente de oxidação do PAR e PRO. A Figura 41 apresenta os gráficos que relacionam os FCs com a velocidade de injeção de uma solução contendo PAR (A) e PRO (B).



**Figura 41.** Variação da corrente de oxidação e respectivos FCs em função da velocidade de injeção no sistema BIA-MPA. (A) PAR 30 mg L<sup>-1</sup> detectado em +0,90 V, +1,20 V e +1,60 V; (B) PRO 18 mg L<sup>-1</sup> detectado em +1,20 V e +1,60 V. Volume injetado: 100 µL.

Os gráficos apresentados na Figura 41 mostram que a intensidade da corrente de oxidação do PAR e PRO aumentam à medida que a velocidade de injeção aumenta. Isso ocorre

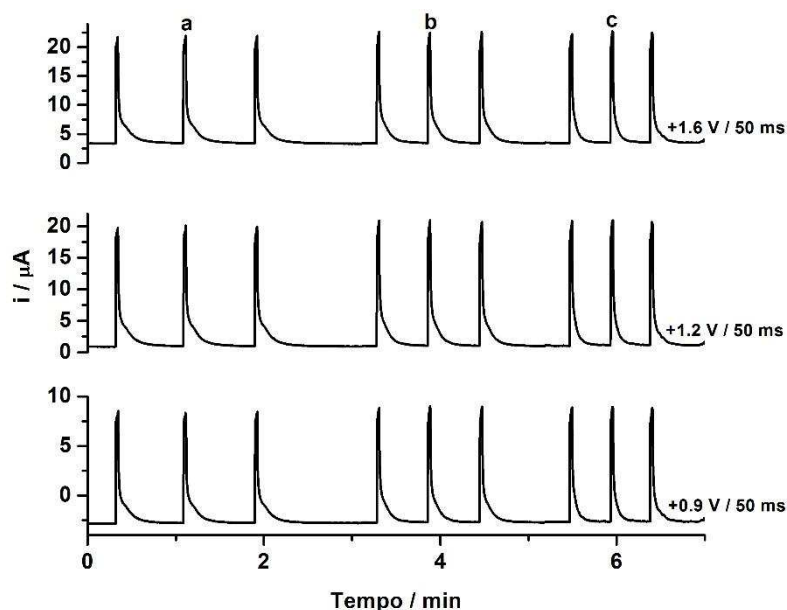


devido ao aumento do transporte de massa até a superfície do eletrodo de trabalho que ocorre com o aumento da velocidade de injeção.

Apesar da corrente detectada aumentar com o aumento da velocidade de injeção, o valor de  $100 \mu\text{L s}^{-1}$  foi selecionado para o prosseguimento do trabalho. Isto se deve ao fato de que o parâmetro “aquisição de corrente” em cada amperograma também deve ser considerado. Na escada de aplicação de potenciais usados no método proposto ( $+0,90 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ ;  $+1,20 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ ;  $+1,60 \text{ V} / 50 \text{ ms}$  e  $0,00 \text{ V} / 100 \text{ ms}$ ), a aquisição de corrente em cada amperograma ocorre a cada 250 ms. Caso a velocidade de injeção seja mais alta, a aquisição dos valores de corrente pode ser prejudicada (número de vezes de aquisição de corrente insuficiente), e isso pode comprometer a repetibilidade do método. Em razão disso, o número de vezes que a corrente é adquirida foi levada em consideração de forma que as aquisições de corrente fossem ao menos de 3 vezes no ápice de cada pico transiente em cada amperograma.

#### **4.4.3.3 Velocidade de agitação da solução no interior da célula BIA**

A influência da agitação no sistema BIA-MPA foi estudada utilizando um micromotor DC que permite a seleção de diferentes velocidades de agitação por meio da variação da voltagem com uma fonte de alimentação de variável. Os testes foram realizados com e sem agitação mediante a injeção em triplicata de uma solução contendo  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de PAR no sistema BIA. A Figura 42 apresenta os resultados obtidos neste estudo.

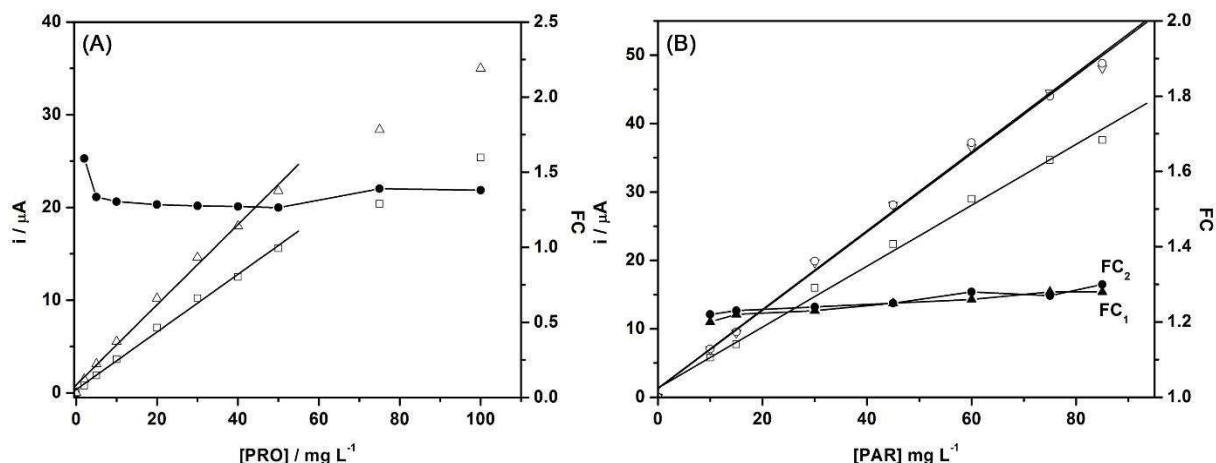


**Figura 42.** Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA sem (a) e com agitação de 1000 rpm (b) e 1400 rpm (c). Concentração da PAR:  $30 \text{ mg L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $150 \text{ }\mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $100 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ .

Os resultados obtidos mostram que seria possível a continuidade do trabalho sem o uso da agitação. Porém, com o uso de agitação da solução no interior da célula, os picos transientes retornam mais rapidamente para a linha base, o que causa aumento da frequência analítica do método. Além disto, os três compostos e seus respectivos produtos de oxidação são removidos mais rapidamente da superfície do eletrodo de trabalho, reduzindo assim, a possibilidade de contaminação do eletrodo de trabalho. A partir desses resultados a velocidade de agitação de 1400 rpm foi selecionada para a continuidade do trabalho.

#### 4.4.4. Influência da concentração de PAR e PRO no FC

Para o desenvolvimento de um método analítico é necessário identificar a faixa de concentração onde existe uma relação linear entre corrente detectada e a concentração do analito. Porém, neste trabalho, além da faixa linear de resposta, também deve ser identificada a faixa de concentração onde os FCs apresentam valores relativamente constantes. A Figura 43 mostra a relação existente entre concentração e corrente de oxidação para injeção de soluções contendo concentrações crescentes de PRO (A) e PAR (B). Os FCs calculados nas faixas de concentrações estudadas também são apresentados.

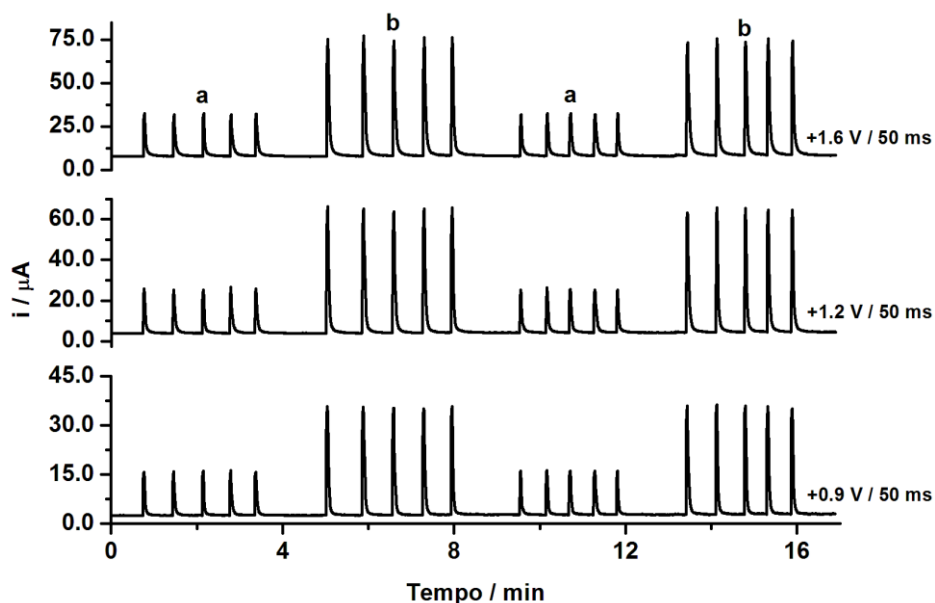


**Figura 43.** Relação existente entre concentração e corrente de oxidação para injeção de soluções contendo concentrações crescentes de **(A)** PRO ( $2 \text{ mg L}^{-1} - 100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e **(B)** PAR ( $10 \text{ mg L}^{-1} - 85 \text{ mg L}^{-1}$ ). Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; velocidade de agitação: 1400 rpm; volume de injeção:  $150 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $100 \mu\text{L s}^{-1}$ .

A Figura 43 (A) mostra que a PRO apresenta faixa linear de resposta (corrente x concentração) entre 2 e  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . No entanto, o valor do FC somente é constante ( $1,29 \pm 0,03$ ) em concentrações acima de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . A Figura 43 (B) mostra que o PAR apresenta faixa linear de resposta (corrente x concentração) entre 10 e  $85 \text{ mg L}^{-1}$ , respeitando a proporção encontrada na formulação farmacêutica. Além disto, ambos os FCs também apresentam valores relativamente constantes nesta faixa de concentração ( $FC_1 = 1,25 \pm 0,03$ ;  $FC_2 = 1,26 \pm 0,02$ ).

#### 4.4.5. Estudo da repetibilidade do método

Empregando os parâmetros otimizados do sistema BIA-MPA, estudos foram realizados para verificar a estabilidade do método proposto. A Figura 44 são apresentados os amperogramas obtidos com injeções sucessivas ( $n = 10$ ) de duas soluções contendo concentrações diferentes: **(a)**  $4 + 12 + 20 \text{ mg L}^{-1}$  ou **(b)**  $12 + 36 + 60 \text{ mg L}^{-1}$  de CAF + PRO + PAR, respectivamente.



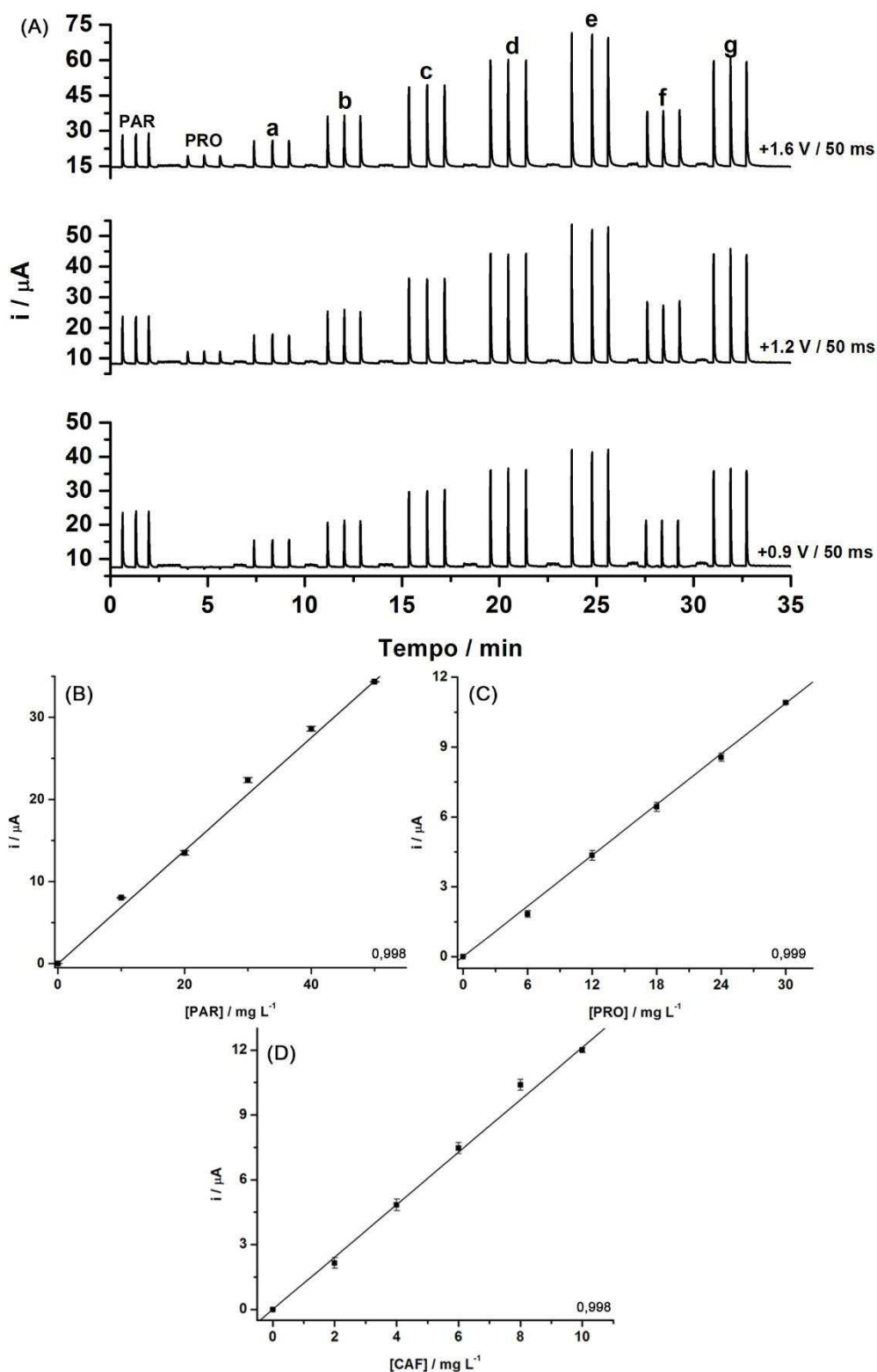
**Figura 44.** Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo **(a)** PAR + PRO + CAF ( $20 \text{ mgL}^{-1} + 12 \text{ mgL}^{-1} + 4 \text{ mgL}^{-1}$ ), **(b)** PAR + PRO + CAF ( $60 \text{ mgL}^{-1} + 36 \text{ mgL}^{-1} + 12 \text{ mgL}^{-1}$ ). Outras condições ver Figura 43.

O DPR obtido para o PAR em +0,9 V foi de 1,2% **(a)** e 1,1% **(b)**; para PRO em +1,2 V foi de 3,0% **(a)** e 2,6% **(b)** e para CAF em +1,6 V foi de 3,1% **(a)** e 3,9 % **(b)**. Esses resultados mostram que o método proposto é estável e não apresenta efeito de memória entre injeções sucessivas de soluções com diferentes concentrações. Estes resultados foram obtidos mediante a aplicação constante pulso de potencial de 0,00 V /100 ms. Provavelmente, este pulso de potencial foi responsável pela diminuição da contaminação do eletrodo de BDD.

#### 4.4.6. Aplicação do sistema BIA-MPA para a determinação simultânea de PAR, PRO e CAF em amostras farmacêuticas

O método proposto foi empregado na análise de amostras farmacêuticas contendo os três princípios ativos. As curvas de calibração foram construídas levando-se em consideração a proporção dos compostos encontrada no medicamento e a faixa de concentração onde os FCs apresentam valores relativamente constantes. Na Figura 45 são apresentados os amperogramas obtidos com a injeção no sistema BIA-MPA de soluções contendo: somente PAR  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (cálculo do  $\text{FC}_1$  e  $\text{FC}_2$ ), somente PRO  $12 \text{ mg L}^{-1}$  (cálculo do  $\text{FC}_3$ ), cinco soluções padrão contendo concentrações crescentes de CAF (a – e:  $2 - 10 \text{ mg L}^{-1}$ ), PRO (a – e:  $6 - 30 \text{ mg L}^{-1}$ ) e

PAR (a – e:  $10 - 50 \text{ mg L}^{-1}$ ) e duas amostras (f – g) que foram preparadas adequadamente pela diluição em eletrólito de suporte antes da injeção no sistema BIA-MPA. As respectivas curvas de calibração também são apresentadas (B, C e D).



**Figura 45.** (A) Amperogramas obtidos com o sistema BIA-MPA para injeções de soluções contendo somente PAR 20 mg L<sup>-1</sup>, somente PRO 12 mg L<sup>-1</sup>, cinco soluções padrão contendo concentrações crescentes de CAF (a – e: 2 – 10 mg L<sup>-1</sup>), PRO (a – e: 6 – 30 mg L<sup>-1</sup>) e PAR (a – e: 10 – 50 mg L<sup>-1</sup>) e duas amostras farmacêuticas (f – g). Curvas de calibração: (B) PAR; (C) PRO e (D) CAF. Outras condições ver Figura 43.

As curvas de calibração para PAR, PRO e CAF apresentaram boa linearidade nas faixas de concentrações selecionadas. As equações de reta são listadas abaixo:

$$y = 0,0051 + 0,6920[\text{PAR}] \quad (r = 0,998)$$

$$y = -0,0013 + 0,3665[\text{PRO}] \quad (r = 0,999)$$

$$y = -0,0098 + 1,2482[\text{CAF}] \quad (r = 0,998)$$

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos na análise de duas amostras farmacêuticas contendo PAR, PRO e CAF utilizando o sistema BIA-MPA proposto.

**Tabela 6.** Resultados obtidos para análise de amostras farmacêuticas por BIA-MPA.

	Valor da bula (mg/comprimido)			BIA-MPA (mg/comprimido)		
	PAR	PRO	CAF	PAR	PRO	CAF
<b>Amostra 1</b>	250	150	50	251 ± 3	154 ± 3	52 ± 4
<b>Amostra 2</b>	250	150	50	249 ± 3	149 ± 4	49 ± 4

#### 4.5. Comparação entre os métodos propostos neste trabalho com métodos encontrados na literatura

A Tabela 7 reúne as características analíticas dos métodos desenvolvidos para a determinação de PAR, PRO e CAF, empregando SWV-convencional, BIA-SWV e BIA-MPA e métodos disponíveis na literatura.

**Tabela 7.** Comparação entre as características analíticas dos métodos propostos e métodos da literatura que possibilitam a determinação simultânea de PAR, PRO e CAF.

<b>Método</b>	<b>Composto</b>	<b>Faixa linear (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>r</b>	<b>LD (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LQ (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>F.A (h<sup>-1</sup>)</b>
<b>SWV-Conv.</b>	PAR	1 – 50	0,999	0,005	0,02	1,0	20
	PRO	1 – 50	0,999	0,009	0,03	1,0	20
	CAF	1 – 40	0,999	0,006	0,02	4,1	20
<b>BIA-SWV</b>	PAR	2 – 50	0,997	0,3	1,0	1,9	80
	PRO	2 – 50	0,998	0,2	0,7	1,5	80
	CAF	2 – 50	0,997	0,3	1,0	3,1	80
<b>BIA-MPA</b>	PAR	10 - 85	0,998	0,2	0,7	1,2	75
	PRO	5 – 50	0,999	0,3	1,0	3,0	75
	CAF	2 – 16	0,998	0,1	0,4	3,9	75
<b>HPLC-UV<sup>1</sup></b>	PAR	1 – 10	-	0,015	-	3,8	7
	PRO	1 – 10	-	0,005	-	4,2	7
	CAF	1 – 10	-	0,010	-	4,2	7
<b>HPLC-UV<sup>2</sup></b>	PAR	3 – 90	0,999	0,3	0,8	3,0	5
	PRO	1,5 – 45	0,999	0,3	1,0	3,0	5
	CAF	0,5 – 15	0,999	0,04	0,13	3,0	5
<b>HPLC-UV<sup>3</sup></b>	PAR	6,2 – 420	0,995	2,2	4,6	1,26	5
	PRO	1,2 – 240	0,993	0,09	0,12	1,67	5
	CAF	0,8 – 80	0,994	0,42	0,62	1,67	5
<b>HPLC-UV<sup>4</sup></b>	PAR	42,8 – 127,6	0,999	0,042	0,125	0,07	3
	PRO	24,8 – 75	0,999	0,194	0,776	0,05	3
	CAF	9,4 – 25	0,999	0,074	0,295	0,03	3
<b>SP-UV/Vis<sup>5</sup></b>	PAR	5 – 25	0,999	-	-	-	-
	PRO	5 – 25	0,999	-	-	-	-
	CAF	1 – 5	0,999	-	-	-	-
<b>SP-UV/FIA<sup>6</sup></b>	PAR	25 – 350	0,999	7,5	25	3,5	11
	PRO	15 – 150	0,999	1,9	6,2	3,8	11
	CAF	5 – 75	0,999	0,65	2,2	3,7	11
<b>MEKC<sup>7</sup></b>	PAR	2 – 200	0,999	0,6	2	1,48	7
	PRO	3 – 200	0,999	0,8	3	1,73	7
	CAF	2 – 200	0,999	0,6	2	1,67	7

F.A = frequência analítica; SP-UV/FIA = espectrofotometria UV com sistema FIA; MEKC = cromatografia capilar eletrocínica micelar; **1**-(AVRAMOVA, 1989); **2**-(DELVADIYA et al., 2014); **3**-(ISSA; HASSOUNA; ZAYED, 2012); **4**-(SOPONAR et al., 2013); **5**-(ÖZGÜR; ALPDOĞAN; AŞÇI, 2002); **6**-(VIDAL; BARRALES; DÍAZ, 2003); **7**-(EMRE; ÖZALTIN, 2007); **8**-(HAŁKA-GRYSIŃSKA et al., 2012).



Alguns trabalhos publicados anteriormente apresentam LDs mais baixos, porém, para a determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas (proposta deste trabalho), baixos LDs geralmente não são necessários. Uma vantagem dos métodos aqui propostos está na frequência analítica (são mais rápidos) e no preparo de amostras, pois esta etapa se restringe solubilização e diluição (sem necessidade de filtração).

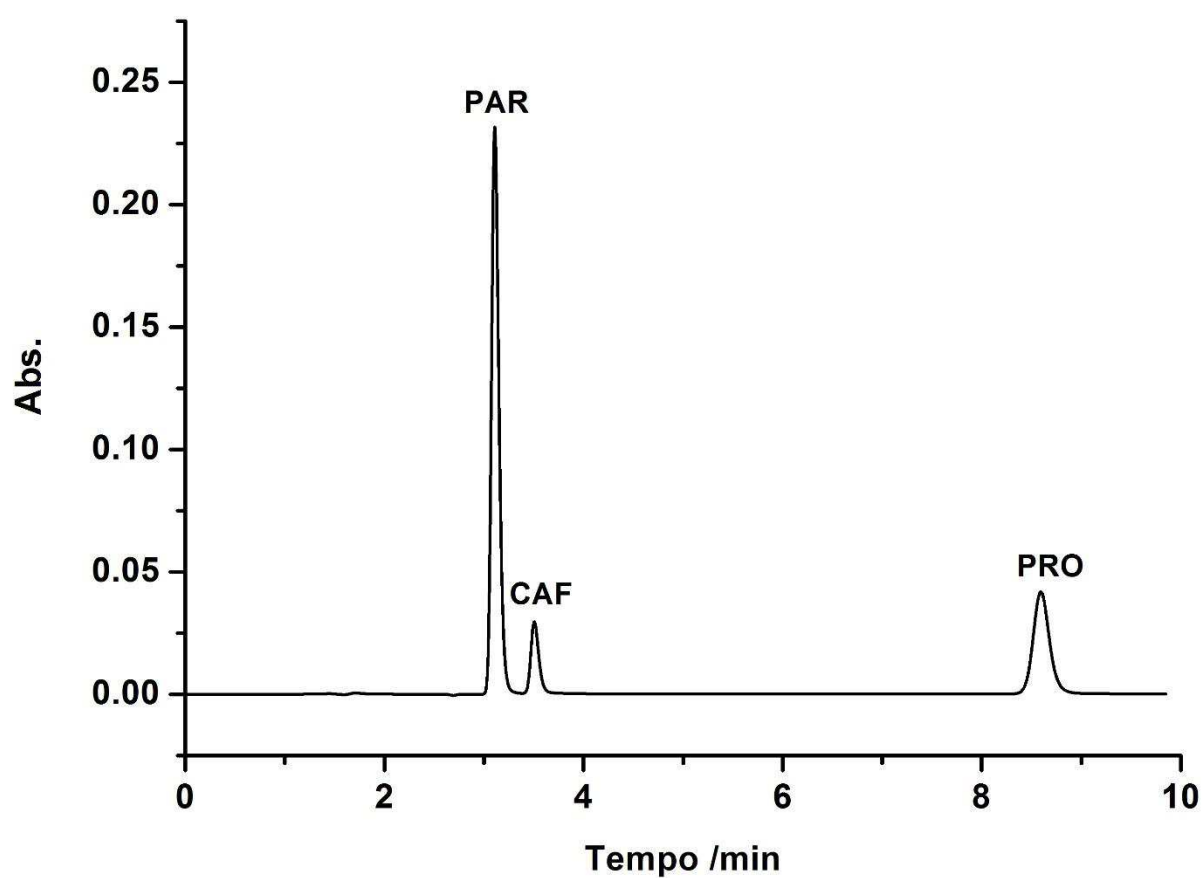
Os resultados obtidos na análise das amostras farmacêuticas por SWV utilizando o sistema convencional (estacionário), BIA-SWV e BIA-MPA também foram comparados com os obtidos por HPLC. A Tabela 8 apresenta os valores obtidos para cada um dos métodos.

**Tabela 8.** Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos desenvolvidos e por HPLC.

	<b>PAR</b>	<b>PRO</b>	<b>CAF</b>
	<b>(mg/comprimido)</b>	<b>(mg/comprimido)</b>	<b>(mg/comprimido)</b>
<b>Bula</b>	250	150	50
<b>SWV convencional</b>	249 ± 4	156 ± 4	54 ± 3
	255 ± 4	160 ± 2	55 ± 2
<b>BIA-SWV</b>	252 ± 4	155 ± 4	49 ± 3
	247 ± 4	152 ± 3	54 ± 4
<b>BIA-MPA</b>	251 ± 3	154 ± 3	52 ± 4
	249 ± 3	149 ± 4	49 ± 4
<b>HPLC</b>	258 ± 5	152 ± 5	53 ± 1
	257 ± 5	159 ± 5	52 ± 1

O teste t de Student para amostras pareadas foi usado para comparar os valores obtidos por HPLC com os encontrados nos métodos propostos. A partir dos resultados apresentados na Tabela 8 pode-se afirmar que os resultados obtidos pelos métodos propostos são similares aos obtidos por HPLC a um nível de confiança de 95%, onde os valores de t calculados foram menores que o valor crítico teórico (2,78, n = 3). Para exemplificar, na Figura 46, um

cromatograma característico de uma amostra contendo PAR, PRO e CAF obtido por HPLC é apresentado.



**Figura 46.** Cromatograma obtido para a injeção de uma solução padrão contendo PAR + PRO +CAF (20 + 12 + 4 mg L<sup>-1</sup>). Fase móvel: metanol/água (55:45 v/v); coluna: C<sub>18</sub>; comprimento de onda: 260 nm; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

## 5. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram demonstradas três possibilidades para a análise de PAR, PRO e CAF em formulações farmacêuticas por duas técnicas eletroanalíticas distintas com sucesso. Utilizando a SWV foram desenvolvidas duas alternativas para essas análises, sendo uma utilizando uma célula convencional e o método de adição de padrão. Esse método apresentou menores LDs porém apresenta a desvantagem de ter baixa frequência analítica em comparação com os demais métodos desenvolvidos.

A detecção por voltametria de onda quadrada associada ao sistema BIA (BIA-SWV) foi outra proposta apresentada que apresentou bons resultados em relação a sensibilidade, seletividade e repetibilidade ( $DPR < 3,1\%$ ), apresentado alta frequência analítica (80 injeções  $h^{-1}$ ).

A amperometria de múltiplos pulsos associada ao sistema BIA (BIA-MPA) foi outra técnica eletroanalítica empregada para a análise desses princípios ativos que também apresentou boa sensibilidade, seletividade e estabilidade adequada para a detecção simultânea desses fármacos nas amostras farmacêuticas em eletrodo de BDD sem qualquer modificação química.

Devido as características do sistema BIA os métodos desenvolvidos empregando esse sistema demonstram ter potencialidade para aplicações em análises de rotina, pois possibilitam análises mais rápidas com baixo custo de aquisição e manutenção. Outras características também são o uso de pequenos volumes de amostras e reagentes, o preparo de amostras simplificado (dissolução e/ou diluição) e a potencialidade para serem utilizados em laboratórios com infraestrutura limitada e análises *in situ*.

## 6. REFERÊNCIAS

- AVRAMOVA, J. Simultaneous determination of propyphenazone, paracetamol and caffeine in blood by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, n. 10, p. 1221–1224, 1989.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1944.
- BOSCH, M. E. et al. Determination of paracetamol: Historical evolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 3, p. 291–321, 2006.
- BOSCH, N. VAN; DE VOS, D. Gas Chromatographic Determination of Propyphenazone in Plasma. **Analytical Chemistry**, v. 46, p. 46–47, 1979.
- BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica-Princípios, Métodos e Aplicações**. 1. ed. Coimbra: Almedina, 1996.
- BRETT, A. M. O.; MATYSIK, F.; VIEIRA, M. T. Thin-Film Gold Electrodes Produced by Magnetron Sputtering. Voltammetric Characteristics and Application in Batch Injection Analysis with Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 9, n. 3, p. 209–2012, 1997.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric batch injection analysis: Theoretical aspects of current transients and comparison with wall-jet electrodes in continuous flow. **Electroanalysis**, v. 7, n. 3, p. 225–229, 1995.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERLU, L. C. Amperometric and voltammetric detection in batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 19, p. 3145–3150, 1994.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; TUGULEA, L. Anodic stripping voltammetry of trace metals by batch injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 322, n. 3, p. 151–157, 1996a.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; TUGULEA, L. Batch injection analysis with adsorptive stripping voltammetry for the determination of traces of nickel and cobalt. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 639–642, 1996b.
- BRETT, C. M. A.; FUNGARO, D. A. Poly(ester sulphonic acid) coated mercury thin film electrodes: Characterization and application in batch injection analysis stripping voltammetry of heavy metal ions. **Talanta**, v. 50, n. 6, p. 1223–1231, 2000.
- BRETT, C. M. A.; MORGADO, J. M. Development of batch injection analysis for

electrochemical measurements of trace metal ions in ecotoxicological test media. **Journal of Applied Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 477–481, 2000.

BRITO, N. M. et al. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

BURATTI, S.; BRUNETTI, B.; MANNINO, S. Amperometric detection of carbohydrates and thiols by using a glassy carbon electrode coated with Co oxide/multi-wall carbon nanotubes catalytic system. **Talanta**, v. 76, n. 2, p. 454–457, 2008.

BURDAN, F. Developmental effects of propyphenazone in analgesic and antipyretic combination with caffeine or paracetamol. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, n. 5, p. 235–244, 2004.

CATARINO, R. I. L. et al. Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 4, p. 571–580, 2003.

CELII, F. G.; BUTLER, J. E. Diamond Chemical Vapor Deposition. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 643, 1991.

CHAILAPAKUL, O. et al. Recent electrochemical and optical sensors in flow-based analysis. **Sensors**, v. 6, n. 10, p. 1383–1410, 2006.

CHANG, Z. et al. Preparation of ferrocene immobilized metal–organic-framework modified electrode for the determination of acetaminophen. **Analytical Methods**, p. 4037–4041, 2012.

CHAVES, S. C. et al. Simultaneous Determination of Caffeine, Ibuprofen, and Paracetamol by Flow-injection Analysis with Multiple-pulse Amperometric Detection on Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 27, n. 12, p. 2785–2791, 2015.

DA SILVA, R. A. B. et al. Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode. **Analytical Methods**, v. 3, n. 12, p. 2804–2808, 2011.

DAVID K. GOSSER. **Cyclic Voltammetry; Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**. 1. ed. New York: VCH Publishers, Inc, 1994.

DE BARROS, R. D. C. M. et al. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 317–325, 2005.

DE CARVALHO, R. M. et al. Effects of EDTA on signal stability during electrochemical detection of acetaminophen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 5, p. 871–878, 2004.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99–105, 2007.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

DECLEMENTS, R. Freestanding Diamond Thin Films Grown on Glassy Carbon Substrates. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 143, n. 7, p. 150–153, 1996.

DELVADIYA, K. et al. High-performance Liquid Chromatographic Determination of Paracetamol, Propyphenazone, and Caffeine in Pharmaceutical Formulations. **Indian Journal Of Pharmaceutical Education And Research**, v. 47, n. 4, p. 65–72, 2014.

DINÇ, E.; KÖKDİL, G.; ONUR, F. Derivative ratio spectra-zero crossing spectrophotometry and LC method applied to the quantitative determination of paracetamol, propyphenazone and caffeine in ternary mixtures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 5–6, p. 769–778, 2001.

DOS SANTOS, W. T. P. et al. Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection. **Electroanalysis**, v. 20, n. 17, p. 1878–1883, 2008.

DOS SANTOS, W. T. P. et al. Simple flow injection amperometric system for simultaneous determination of dipyrone and paracetamol in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 7, p. 1249–1255, 2009.

DUMANOVIC, D.; MARKOVIC, D.; MUK, A. Spectrophotometric characterization analgesics and antipyretics. **Talanta**, v. 36, n. 9, p. 931–935, 1989.

EMRE, D.; ÖZALTIN, N. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 847, n. 2, p. 126–132, 2007.

FERNANDES, J. C. B. et al. Determination of acetylsalicylic acid in tablets with salicylate ion selective electrode in a batch injection analysis system. **Journal of the Brazilian Chemical**

**Society**, v. 9, n. 3, p. 249–251, 1998.

FERREIRA, N. G.; SILVA, L. L. G.; CORAT, E. J. Electrochemical activity of boron-doped diamond electrodes grown on carbon fiber cloths. **Diamond and Related Materials**, v. 11, n. 3, p. 657–661, 2002.

FISHER, V. et al. Preparation and characterization of Ti/Diamond electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 44, n. 2–3, p. 521–524, 1998.

FREITAS, J. M. et al. Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Talanta**, v. 146, p. 670–675, 2016.

GIMENES, D. T. **Desenvolvimento de metodologias analíticas usando FIA com detecção amperométrica: análise de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico** (Dissertação). 2009. 101 p. Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia 2009.

GIMENES, D. T. et al. A Simple Strategy to Improve the Accuracy of the Injection Step in Batch Injection Analysis Systems with Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 24, n. 9, p. 1805–1810, 2012.

GOETING, C. H. et al. Electrochemically induced surface modifications of boron-doped diamond electrodes: An X-ray photoelectron spectroscopy study. **Diamond and Related Materials**, v. 9, n. 3–6, p. 390–396, 2000.

GÖRÖG, S. The sacred cow: The questionable role of assay methods in characterising the quality of bulk pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 5, p. 931–937, 2005.

GRANGER, M. C. The Influence of Surface Interactions on the Reversibility of Ferri/Ferrocyanide at Boron-Doped Diamond Thin-Film Electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 146, n. 12, p. 4551, 1999.

HAGHIGHI, B. et al. Carbon ceramic electrodes modified with laccase from *Trametes hirsuta*: Fabrication, characterization and their use for phenolic compounds detection. **Electroanalysis**, v. 19, n. 9, p. 907–917, 2007.

HAŁKA-GRYSIŃSKA, A. et al. Simultaneous determination of acetaminophen, propyphenazone and caffeine in cefalgin preparation by pressurized planar electrochromatography and high-performance thin-layer chromatography. **Analytical**

**Methods**, v. 4, n. 4, p. 973, 2012.

HASOŇ, S. et al. Label-free sequence-specific DNA sensing using copper-enhanced anodic stripping of purine bases at boron-doped diamond electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 7, p. 2391–2399, 2008.

HSU, P. F.; CIOU, W. L.; CHEN, P. Y. Voltammetric study of polyviologen and the application of polyviologen-modified glassy carbon electrode in amperometric detection of vitamin C. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1285–1292, 2008.

INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial**, p. 25, 2007.

ISSA, Y. M.; HASSOUNA, M. E. M.; ZAYED, A. G. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, domperidone, ergotamine tartrate, propyphenazone, and drotaverine hcl by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 35, n. 15, p. 2148–2161, 2012.

IVASHENKO, O. et al. Oxidative electrochemical aryl C-C coupling of spiropyrans. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 49, n. 60, p. 6737–9, 2013.

JIA, W. et al. Vertically aligned CuO nanowires based electrode for amperometric detection of hydrogen peroxide. **Electroanalysis**, v. 20, n. 19, p. 2153–2157, 2008.

KIERSCH, T. A; MINIC, M. R. The onset of action and the analgesic efficacy of Saridon (a propyphenazone/paracetamol/ caffeine combination) in comparison with paracetamol, ibuprofen, aspirin and placebo (pooled statistical analysis). **Current medical research and opinion**, v. 18, n. 1, p. 18–25, 2002.

KONDO, T. et al. Electrochemical detection of lipophilic antioxidants with high sensitivity at boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 95, p. 205–211, 2013.

KRAETSCH, H. G. et al. Analgesic effects of propyphenazone in comparison to its combination with caffeine. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 49, n. 5, p. 377–382, 1996.

KRAFT, A. Doped Diamond: A Compact Review on a New, Versatile Electrode Material - Open Access Library. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, p. 355–385, 2007.



LOURENÇÃO, B. C. et al. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 748–752, 2009.

LOVRIĆ, M.; KOMORSKY-LOVRIC, Š. Square-wave voltammetry of an adsorbed reactant. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 248, n. 2, p. 239–253, 1988.

MAHÉ, E.; DEVILLIERS, D.; COMNINELLIS, C. Electrochemical reactivity at graphitic micro-domains on polycrystalline boron doped diamond thin-films electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 11, p. 2263–2277, 2005.

MARTIN, H. B. Hydrogen and Oxygen Evolution on Boron-Doped Diamond Electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 143, n. 6, p. L133, 1996.

MARTIN, H. B. Voltammetry Studies of Single-Crystal and Polycrystalline Diamond Electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 146, n. 8, p. 2959, 1999.

MATOS, R. C. et al. Modified microelectrodes and multivariate calibration for flow injection amperometric simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, epinephrine and dipyrone. **The Analyst**, v. 125, n. 11, p. 2011–2015, 2000.

MAZZARINO, M. et al. Effects of propyphenazone and other non-steroidal anti-inflammatory agents on the synthetic and endogenous androgenic anabolic steroids urinary excretion and/or instrumental detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 657, n. 1, p. 60–68, 2010.

MEDEIROS, R. A. et al. Determinação voltamétrica de ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando um eletrodo de diamante dopado com boro. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1405–1409, 2008.

MEDEIROS, R. A. et al. Simple flow injection analysis system for simultaneous determination of phenolic antioxidants with multiple pulse amperometric detection at a boron-doped diamond electrode. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 20, p. 8658–8663, 2010.

NOTSU, H. et al. Surface carbonyl groups on oxidized diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 492, n. 1, p. 31–37, 2000.

NUWER, M. J.; O'DEA, J. J.; OSTERYOUNG, J. Analytical and kinetic investigations of totally irreversible electron transfer reactions by square-wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 251, n. 1–2, p. 13–25, 1991.

OLIVEIRA, T. DA C. et al. A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Talanta**, v. 152, p. 308–313, 2016.

ÖZGÜR, M. Ü.; ALPDOĞAN, G.; AŞÇI, B. A rapid spectrophotometric method to resolve ternary mixtures of propyphenazone, caffeine, and acetaminophen in tablets. **Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly**, v. 133, n. 2, p. 219–223, 2002.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PAIXÃO, T. R. L. C.; MATOS, R. C.; BERTOTTI, M. Development of a Dual-Band Amperometric Detector for Determination of Ascorbic Acid and Glucose. **Electroanalysis**, v. 15, n. 23–24, p. 1884–1889, 2003.

PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Application of diamond electrodes to electrochemical processes. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 2, p. 191–199, 2005.

PEDROSA, V. A.; LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. FIA determination of paracetamol in pharmaceutical drugs by using gold electrodes modified with a 3-mercaptopropionic acid monolayer. **Electroanalysis**, v. 18, n. 9, p. 931–934, 2006.

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L. L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 673–675, 1996.

PEREIRA, P. F. et al. Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol. **Talanta**, v. 90, p. 99–102, 2012.

PEREIRA, P. F. et al. Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 713, p. 32–38, 2014.

PEREIRA, P. F. et al. 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**, v. 766, p. 87–93, 2016.

PERRET, A. et al. Electrochemical behavior of synthetic diamond thin film electrodes. **Diamond and Related Materials**, v. 8, n. 2–5, p. 820–823, 1999.

PETRUCCI, E. et al. Modeling and optimization of Reactive Green 19 oxidation on a BDD

thin-film electrode. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 51, p. 152–158, 2015.

PINO, F. et al. Magnetic Enzymatic Platform for Organophosphate Pesticide Detection Using Boron-doped Diamond Electrodes. **Analytical Sciences**, v. 31, n. 10, p. 1061–1068, 2015.

PLESKOV, Y. V. Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1045–1050, 2000.

PLESKOV, Y. V. Electrochemistry of Diamond: A Review. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1275–1291, 2002.

PLETCHER, D. et al. **Instrumental Methods in Electrochemistry**. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2001.

PRABAKAR, S. J. R.; NARAYANAN, S. S. Amperometric determination of paracetamol by a surface modified cobalt hexacyanoferrate graphite wax composite electrode. **Talanta**, v. 72, n. 5, p. 1818–1827, 2007.

QUINTINO, M. D. S. M. et al. Amperometric sensor for glucose based on electrochemically polymerized tetraruthenated nickel-porphyrin. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, n. 1–2, p. 215–222, 2005.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Bia-amperometric quantification of salbutamol in pharmaceutical products. **Talanta**, v. 62, n. 2, p. 231–236, 2004a.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513–523, 2004b.

RAMESHAM, R. Effect of annealing and hydrogen plasma treatment on the voltammetric and impedance behavior of the diamond electrode. **Thin Solid Films**, v. 315, p. 222–228, 1998.

RAO, T. N. et al. Band-edge movements of semiconducting diamond in aqueous electrolyte induced by anodic surface treatment. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 146, n. 2, p. 680–684, 1999.

RICHTER, E. M. et al. Disposable twin gold electrodes for amperometric detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 17, p. 2965–2969, 2004.

ROUAN, M. C. et al. Rapid determination of propyphenazone in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 387–

390, 1992.

SALAZAR-BANDA, G. R. et al. On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 22, p. 4612–4619, 2006.

SANTOS, W. DOS et al. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: Potencialidades e aplicações. **Química nova**, v. 34, n. 10, p. 1753–1761, 2011.

SARADA, B. V et al. Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron-doped diamond electrodes. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 7, p. 1632–1638, 2000.

SILVA, W. C. et al. A simple strategy for simultaneous determination of paracetamol and caffeine using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Electroanalysis**, v. 23, n. 12, p. 2764–2770, 2011.

SIMÕES, F. R.; VAZ, C. M. P.; BRETT, C. M. A. Electroanalytical Detection of the Pesticide Paraquat by Batch Injection Analysis. **Analytical Letters**, v. 40, n. 9, p. 1800–1810, 2007.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de química analítica**. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning, 1997.

SOPONAR, F. et al. Simultaneous determination of paracetamol, propyphenazone and caffeine from pharmaceutical preparations in the presence of related substances using a validated HPLC-DAD method. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 58, n. 4–5, p. 433–440, 2013.

SPĂȚARU, N. et al. Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application. **Electroanalysis**, v. 14, n. 11, p. 721–728, 2002.

SUFFREDINI, H. B. et al. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 22–23 SPEC. ISS., p. 4021–4026, 2004.

SURAREUNGCHAI, W.; DEEPUNYA, W.; TASAKORN, P. Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose. **Analytica Chimica Acta**, v. 448, n. 1–2, p. 215–220, 2001.

ŠVORC, L. et al. Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-

doped diamond electrode. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1198–1204, 2012a.

ŠVORC, L. Determination of caffeine: A comprehensive review on electrochemical methods. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, n. 4, p. 5755–5773, 2013.

ŠVORC, L. et al. Simultaneous determination of paracetamol and penicillin V by square-wave voltammetry at a bare boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 68, p. 227–234, 2012b.

SWAIN, G. M. Solid electrode materials: Pretreatment and activation. **Handbook of Electrochemistry**, p. 111–153, 2007.

SWAIN, G. M.; ANDERSON, A. B.; ANGUS, J. C. Applications of Diamond Thin Films in Electrochemistry. **MRS Bulletin**, v. 23, n. 9, p. 56–60, 1998.

TEIXEIRA, M. E.; SEDENHO, G. C.; STRADIOTTO, N. R. Detection of several carbohydrates using boron-doped diamond electrodes modified with nickel hydroxide nanoparticles. **Analytical Sciences**, v. 31, n. 8, p. 773–780, 2015.

TERASHIMA, C. et al. Direct electrochemical oxidation of disulfides at anodically pretreated boron-doped diamond electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 7, p. 1564–1572, 2003.

THANGARAJ, R. et al. A flow injection analysis coupled dual electrochemical detector for selective and simultaneous detection of guanine and adenine. **Electrochimica Acta**, v. 123, p. 485–493, 2014.

THAVARUNGKUL, P. et al. Batch injection analysis for the determination of sucrose in sugar cane juice using immobilized invertase and thermometric detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 14, n. 1, p. 19–25, jan. 1999.

TORMIN, T. F. et al. Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1274–1278, 2011.

TORMIN, T. F. et al. Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. **Talanta**, v. 99, p. 527–531, 2012.

TORMIN, T. F. et al. Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 202, p. 93–98, 2014.

VIDAL, A. D.; BARRALES, P. O.; DÍAZ, A. M. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in pharmaceuticals by means of a single flow-through UV multiparameter sensor. **Mikrochimica Acta**, v. 141, n. 3–4, p. 157–163, 2003.

WANG, J. et al. Computerized pipettes with programmable dispensation. **Analytica Chimica Acta**, v. 267, n. 1, p. 171–177, 1992.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2006.

WANG, J.; ANGNES, L. Batch Injection Spectroscopy. **Analytical Letters**, v. 26, n. 11, p. 2329–2339, 1993.

WANG, J.; RAYSON, G. D.; TAHA, Z. Batch Injection Analysis Using Fiber-Optic Fluorometric Detection. **Applied Spectroscopy**, v. 46, n. 1, p. 107–110, 1992.

WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053–1056, maio 1991.

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**, v. 28, n. 5, p. 841–847, 2002.

WEINBERG, D. R. et al. Proton-coupled electron transfer. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 5004–5064, 2007.

YIN, H. et al. Voltammetric sensing of paracetamol, dopamine and 4-aminophenol at a glassy carbon electrode coated with gold nanoparticles and an organophilic layered double hydroxide. **Mikrochimica Acta**, v. 175, n. 1–2, p. 39–46, 2011.

ZACHOWSKI, E. J.; WOJCIECHOWSKI, M.; OSTERYOUNG, J. The analytical application of square-wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 183, p. 47–57, 1986.

ZHANG, T. et al. Determination of Cd<sup>2+</sup> by ultrasound-assisted square wave anodic stripping voltammetry with a boron-doped diamond electrode. **Ionics**, v. 21, n. 6, p. 1761–1769, 2015.

ZHANG, W. et al. Amperometric Detection of Hydrogen Peroxide Using Glassy Carbon Electrodes Modified with Chromium Hexacyanoferrate/Single-Walled Carbon Nanotube Nanocomposites. **Electroanalysis**, v. 21, n. 2, p. 179–183, 2009.