



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



**Desenvolvimento de metodologias analíticas usando  
FIA com detecção amperométrica: análise de  
dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico**

**Denise Tofanello Gimenes**

**Uberlândia  
Julho/2009**



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



**Desenvolvimento de metodologias analíticas usando  
FIA com detecção amperométrica: análise de  
dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico**

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

**Mestranda: Denise Tofanello Gimenes**

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

**Área de Concentração: Química Analítica**

**Uberlândia**

**Julho/2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

G491d Gimenes, Denise Tofanello, 1980-

Desenvolvimento de metodologias analíticas usando FIA com detecção amperométrica : análise de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico / Denise Tofanello Gimenes. - 2009.  
101 f. : il.

Orientador: Eduardo Mathias Richter.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Dopamina - Teses. 3. Vitamina C - Teses. 4. Ácido úrico - Teses. I. Richter, Eduardo Mathias. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 543



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Química  
Programa de Pós Graduação em Química – MESTRADO  
E-mail: [pgqquimica@ufu.br](mailto:pgqquimica@ufu.br) – Fone: 3239-4385

ALUNO(A): DENISE TOFANELLO GIMENES

NÚMERO DE MATRÍCULA: 90476

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

*"Desenvolvimento de metodologias analíticas usando FIA  
com detecção amperométrica: análise de dopamina, ácido  
ascórbico e ácido úrico"*

ORIENTADOR:

PROF. DR. EDUARDO MATHIAS RICHTER

A Dissertação foi APROVADA em apresentação pública realizada no Anfiteatro do Bloco 1X, no Campus Santa Mônica, no dia 31 de julho de 2009, às 14:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

(IQUFU)

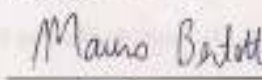
Prof. Dr. Mauro Bertotti

(USP)

Prof. Dr. Otávio Luiz Bottecchia

(IQUFU)

Uberlândia, 31 de julho de 2009.


*Ao meu marido Joel pelo amor, companheirismo, afeto, compreensão,  
amizade, dedicação, respeito  
e fidelidade que sempre fizeram partes da nossa relação.*

*Aos meus pais: Ana e João por serem exemplos de coragem, paciência,  
atitude, humildade e sabedoria.*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido concluído sem prestar uma breve homenagem às pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização e êxito do mesmo:

- ✓ *A Deus pela força e coragem concedida nos momentos de fraqueza e por estar sempre comigo.*
- ✓ *Aos meus sogros: Reginaldo e Marlene por tudo o que fizeram e fazem por mim. Também aos meus cunhados Márcia e Thiago pelos momentos de distração e conhecimentos que passamos juntos.*
- ✓ *Ao meu Orientador em especial, Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter, pela orientação, sabedoria, oportunidade, paciência e apoio para que a realização deste trabalho tivesse sucesso.*
- ✓ *Em especial ao Wallans, que durante todo o tempo contribuiu para realização deste trabalho.*
- ✓ *Em especial também a minha prima e amiga Sabrina, pelos conselhos e momentos de distração e alegria.*
- ✓ *Todos os colegas e amigos de laboratório: Joyce, Rodrigo Amorim, Thiago, Jhonys, Abílio, Rafael, Adriana, Juliana e todos os demais que não estão reportados aqui, mas que com certeza ficaram guardados na memória.*
- ✓ *A Mayta, secretária do curso de Pós-Graduação, pela paciência e colaboração.*
- ✓ *Aos mestres, Yaico, Rodrigo Muñoz, Sebastião, Nívea e aos outros docentes não relatados, mas que nunca serão esquecidos, pelos conhecimentos adquiridos, meu muito obrigada.*
- ✓ *A CAPES pela concessão da bolsa de estudos, meu muito obrigada.*
- ✓ *Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pelo espaço físico concedido.*
- ✓ *Aos membros das bancas pela aceitação e valiosa contribuição para o aprimoramento deste trabalho.*

*“Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite. É minha função escolher que dia vou ter hoje.*

*Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo.*

*Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto para morar.*

*Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.*

*O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma.*

*Tudo depende só de mim.”*

*(Charles Chaplin)*

## **Índice**

|                                                                    |            |
|--------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Resumo</b>                                                      | <b>i</b>   |
| <b>Abstract</b>                                                    | <b>iii</b> |
| <b>Índice de figuras</b>                                           | <b>v</b>   |
| <b>Índice de tabelas</b>                                           | <b>ix</b>  |
| <b>Lista de abreviações e siglas</b>                               | <b>x</b>   |
| <b>Trabalhos desenvolvidos durante o mestrado</b>                  | <b>xi</b>  |
| <b>Parte 1</b>                                                     | <b>1</b>   |
| <b>Introdução e objetivos do Trabalho</b>                          | <b>1</b>   |
| <b>1.1 ESPÉCIES ANALÍTICAS ESTUDADAS</b>                           | <b>2</b>   |
| 1.1.1 Dopamina                                                     | 2          |
| 1.1.1.1 Mal de Alzheimer                                           | 3          |
| 1.1.1.2 Mal de Parkinson                                           | 4          |
| 1.1.2 Ácido Ascórbico (AA)                                         | 5          |
| 1.1.3 Ácido Úrico (AU)                                             | 6          |
| <b>1.2 DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA E ÁCIDO ASCÓRBICO</b>              | <b>7</b>   |
| <b>1.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ASCÓRBICO E ÚRICO</b>                | <b>9</b>   |
| <b>1.4 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)</b>                      | <b>11</b>  |
| <b>1.5 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS</b>                                  | <b>13</b>  |
| 1.5.1 Voltametria Cíclica                                          | 14         |
| 1.5.2 Amperometria                                                 | 15         |
| <b>1.6 PARÂMETROS DE MÉRITO UTILIZADOS NA METODOLOGIA PROPOSTA</b> | <b>19</b>  |
| <b>1.7 OBJETIVOS</b>                                               | <b>23</b>  |
| <b>Parte 2</b>                                                     | <b>24</b>  |
| <b>Procedimento Experimental</b>                                   | <b>24</b>  |
| <b>2.1. REAGENTES</b>                                              | <b>25</b>  |
| <b>2.2. SOLUÇÕES</b>                                               | <b>25</b>  |
| <b>2.3. INSTRUMENTAÇÃO</b>                                         | <b>26</b>  |
| 2.3.1 Equipamentos utilizados                                      | 26         |
| 2.3.2 Células Eletroquímicas                                       | 27         |
| 2.3.3 Eletrodo de Trabalho                                         | 28         |
| 2.3.4 Eletrodo de Referência                                       | 28         |
| 2.3.5 Eletrodo Auxiliar                                            | 28         |
| <b>2.4. METODOLOGIA</b>                                            | <b>28</b>  |
| 2.4.1 Voltametria cíclica                                          | 28         |

|                                                                                                        |                                                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4.1.1                                                                                                | Comportamento eletroquímico da Dopamina, Ácido Ascórbico e Ácido Úrico                                                                       | 28        |
| 2.4.2                                                                                                  | Amperometria de múltiplos pulsos acoplada ao sistema FIA para determinação de dopamina na presença de altas concentrações de ácido ascórbico | 29        |
| 2.4.2.1                                                                                                | Estudo da interferência do AA na análise de DA em tampão acetato 0,10 mol L <sup>-1</sup> (pH 4,7)                                           | 29        |
| 2.4.2.2                                                                                                | Estudo para otimização dos pulsos potenciais a serem utilizados para detecção de DA na presença de AA por FIA com detecção AMP               | 29        |
| 2.4.2.3                                                                                                | Otimização dos parâmetros hidrodinâmicos                                                                                                     | 30        |
| 2.4.2.4                                                                                                | Análise da Seletividade da Técnica AMP acoplada ao sistema FIA para análise de DA na presença de AA                                          | 30        |
| 2.4.2.5                                                                                                | Estudos de repetibilidade do método e interferência de AA na análise de DA                                                                   | 31        |
| 2.4.2.6                                                                                                | Estudos de quantificação, recuperação e limite de detecção para Dopamina em amostras farmacêuticas                                           | 31        |
| 2.4.3                                                                                                  | Amperometria de Múltiplos Pulsos acoplada ao sistema FIA para determinação de Dopamina na presença de AA e AU.                               | 31        |
| 2.4.3.1                                                                                                | Estudo da I <sub>red</sub> para DA e da I <sub>red</sub> para o AU aplicando-se diferentes potenciais de oxidação.                           | 31        |
| 2.4.3.2                                                                                                | Seletividade da Técnica AMP acoplada ao sistema FIA para determinação de DA na presença de AA e AU                                           | 32        |
| 2.4.3.3                                                                                                | Estudo da repetibilidade do método                                                                                                           | 32        |
| 2.4.3.4                                                                                                | Curva analítica para quantificação de DA na presença de AA e AU                                                                              | 32        |
| 2.4.4                                                                                                  | Amperometria de Múltiplos Pulsos acoplada ao sistema FIA para determinação simultânea de AA e AU                                             | 33        |
| 2.4.4.1                                                                                                | Avaliação dos parâmetros hidrodinâmicos                                                                                                      | 33        |
| 2.4.4.2                                                                                                | Seletividade da Técnica AMP acoplada ao Sistema FIA para determinação de AA e AU simultaneamente                                             | 33        |
| 2.4.4.3                                                                                                | Estudos de quantificação, recuperação e limite de detecção para AA e AU em amostras padrão                                                   | 34        |
| <b>Parte 3</b>                                                                                         |                                                                                                                                              | <b>35</b> |
| <b>Resultados e Discussões</b>                                                                         |                                                                                                                                              | <b>35</b> |
| <b>3.1 ESTUDOS PARA DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA NA PRESENÇA DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO</b> |                                                                                                                                              | <b>36</b> |
| 3.1.1                                                                                                  | Comportamento eletroquímico da dopamina e do ácido ascórbico em meio de ácido sulfúrico 0,20 mol L <sup>-1</sup>                             | 37        |
| 3.1.2                                                                                                  | Estudo da variação da velocidade de varredura da Dopamina por Voltametria Cíclica                                                            | 39        |
| 3.1.3                                                                                                  | Uso da detecção amperométrica acoplada a FIA para análise de DA                                                                              | 41        |
| 3.1.3.1                                                                                                | Escolha do potencial de oxidação da DA                                                                                                       | 42        |
| 3.1.3.2                                                                                                | Estudo para definição do tempo de aplicação do pulso de potencial para oxidação da DA (geração da o-DQ)                                      | 42        |
| 3.1.3.3                                                                                                | Escolha do potencial de redução para o produto de oxidação da DA                                                                             | 43        |
| 3.1.3.4                                                                                                | Investigação da sensibilidade obtida na detecção AMP para análise de DA em função da vazão da solução carregadora e do volume injetado       | 44        |
| 3.1.3.5                                                                                                | Uso da técnica AMP acoplada ao sistema FIA para análise de DA na presença de altas concentrações de AA                                       | 45        |
| 3.1.3.6                                                                                                | Curva analítica para determinação de DA em amostras de fármacos                                                                              | 49        |
| <b>3.2 ESTUDOS PARA DETERMINAÇÃO DE DA NA PRESENÇA DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE AA E AU</b>               |                                                                                                                                              | <b>51</b> |
| 3.2.1                                                                                                  | Uso da técnica AMP em FIA para análise de DA na presença de altas concentrações de AA e AU                                                   | 54        |

|                                   |                                                                                                                                     |           |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2                             | Curva de Calibração para DA, limite de detecção e limite de quantificação                                                           | 57        |
| <b>3.3</b>                        | <b>AMPEROMETRIA DE MÚLTIPLOS PULSOS ACOPLADA AO SISTEMA FIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AA E AU</b>                             | <b>58</b> |
| 3.3.1                             | Estudo de Variação da Velocidade de Varredura                                                                                       | 58        |
| 3.3.2                             | Identificação do potencial de oxidação do AA e AU                                                                                   | 61        |
| 3.3.3                             | Identificação do potencial de redução do produto de oxidação do AU                                                                  | 63        |
| 3.3.4                             | Investigação do sinal amperométrico obtido por FIA com detecção AMP para AA e AU em função da vazão e do volume de amostra injetado | 64        |
| 3.3.5                             | Uso da técnica AMP acoplada ao sistema FIA para análise simultânea de AA e AU                                                       | 65        |
| 3.3.6                             | Curva de Calibração para AA e AU, limite de detecção e limite de quantificação e recuperação da amostra analisada                   | 69        |
| <b>Parte 4</b>                    |                                                                                                                                     | <b>72</b> |
| <b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>  |                                                                                                                                     | <b>72</b> |
| 4.1                               | Conclusões                                                                                                                          | 73        |
| 4.2                               | Propostas de continuidade                                                                                                           | 75        |
| <b>Parte 5:</b>                   |                                                                                                                                     | <b>76</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> |                                                                                                                                     | <b>76</b> |

## RESUMO

No presente trabalho foi investigada uma metodologia simples, sensível e seletiva para a determinação de espécie analíticas de interesse farmacêutico e biológico. Os estudos foram direcionados para a determinação de dopamina (DA) na presença de altas concentrações de ácido ascórbico (AA), dopamina na presença de AA e ácido úrico (AU) e determinação simultânea de AA e AU usando Análise por Injeção em Fluxo (FIA) com detecção amperométrica de múltiplos pulsos (AMP) e carbono vítreo como eletrodo de trabalho (sem modificação química).

Inicialmente, um estudo do comportamento eletroquímico das espécies analíticas foi avaliado em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20 mol  $\text{L}^{-1}$ . A opção por este eletrólito se deve ao fato de que a cinética de reação entre a *o*-dopaminoquinona (*o*-DQ) e AA ser muito lenta nesta condição. Em seguida foram otimizados os potenciais de oxidação e redução para a determinação indireta de DA e AU em sistema FIA com detecção por AMP. Para a análise de dopamina na presença de altas concentrações de ácido ascórbico, os seguintes pulsos de potenciais em função do tempo foram utilizados:

- (a) +0,8V / 700 ms: oxidação simultânea de DA e AA;
- (b) +0,35V / 30 ms: determinação indireta de DA através da redução da *o*-DQ gerada no pulso de potencial anterior;
- (c) 0,00V / 500ms para limpeza e/ou regeneração do eletrodo de trabalho.

Testes de repetibilidade apresentaram um DPR de 1,2% (n=24), o que demonstra um bom desempenho do método, principalmente em relação à eficácia do pulso de potencial relacionado com a limpeza eletroquímica. A faixa linear para a análise de DA na presença de 1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$  de ácido ascórbico ficou entre 1,0 e 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com coeficiente de correlação calculado em 0,998 e limites de detecção e quantificação em 50 e 170 nmol  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Estudos de adição/recuperação em uma amostra farmacêutica contendo DA geraram recuperações na ordem de 96,3%.

Na determinação de DA na presença de AA e AU, o potencial referente ao processo de oxidação (geração da *o*-DQ) necessitou ser modificado para +0,65V / 700ms (não ocorre oxidação do AU), mantendo-se o mesmo potencial correspondente ao processo de redução e o potencial para limpeza do eletrodo necessitou de um tempo maior (800ms). Estudos de repetibilidade nas análises de DA na presença de AA e AU mostraram-se eficientes para a

técnica proposta, com DPR calculado em 0,25% para 15 injeções sucessivas de solução contendo AA ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), AU ( $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e DA ( $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Neste caso, a faixa linear para análise de DA também ficou entre  $1,0$  e  $100,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação em 0,998 e os limites de detecção e quantificação calculados em 11 e  $37 \text{ nmol L}^{-1}$ , respectivamente.

Nas análises simultâneas de AA e AU, a seguinte sequência de pulsos de potenciais foi utilizada:

- (a) +0,6V / 100ms: oxidação e quantificação do AA;
- (b) +0,8V / 100ms: oxidação do AA e AU;
- (c) +0,1V / 30ms: redução do produto de oxidação do AU e sua respectiva quantificação;
- (d) 0,00V / 1s: limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho;

Na análise simultânea de AA e AU, o DPR para injeções sucessivas ( $n=25$ ) de uma solução contendo AA+AU ( $100,0$  e  $200,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi calculado em 0,3 e 0,6 %, respectivamente. A curva analítica apresentou linearidade na faixa de concentração entre  $100,0$  a  $300,0$  e  $50,0$  a  $150,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  para AA e AU, respectivamente. Baseado nos resultados experimentais obtidos, foram calculados os coeficientes de correlação ( $R = 0,997$  e  $0,995$ ), limites de detecção ( $82$  e  $273 \text{ nmol L}^{-1}$ ) e de quantificação ( $169$  e  $563 \text{ nmol L}^{-1}$ ) para AA e AU, respectivamente.

**Palavras-chave:** *Detecção Amperométrica de Múltiplos Pulsos, Análise por Injeção em Fluxo, Dopamina, Ácido Ascórbico, Ácido Úrico.*

## ABSTRACT

In the present work a simple, sensitive and selective method for determination of compounds of pharmaceutical and biological interest was investigated. The studies were addressed for analysis of the following analytes: (1) dopamine (DA) in the presence of high concentrations of ascorbic acid (AA); (2) dopamine in the presence of ascorbic and uric acid (UA) and (3) ascorbic and uric acid simultaneously. In all cases, Flow Injection Analysis (FIA) with Multiple Pulse Amperometry (MPA) technique and glassy carbon as work electrode (without chemical modification) were used.

Initially, the electrochemical behavior of the analytes in sulfuric acid medium ( $0.20 \text{ mol L}^{-1}$ ) was evaluated. The choice of this electrolyte was due to the fact that the chemical reaction between the *o*-dopaminoquinone (*o*-DQ) and AA in this condition is very slow. For dopamine analysis, in the presence of high concentrations of ascorbic acid, the following potential pulses in function of the time were used:

- (a)  $+0.8\text{V} / 700\text{ms}$  : simultaneous oxidation of DA and AA;
- (b)  $+0.35\text{V} / 30\text{ms}$ : indirect determination of DA through the reduction of *o*-DQ generated in the previous potential pulse;
- (c)  $0.0\text{V} / 500\text{ms}$ : cleaning or regeneration of the electrode surface.

Repeatability tests presented a RSD of 1.2% ( $n=24$ ), which demonstrates a good performance of the proposed method in relation to the technique efficiency to avoid electrode surface contamination. The linear range for DA analysis in the presence of  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  of ascorbic acid was found to be from 1,0 to  $100,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . The correlation coefficient was calculated as  $R=0.9988$ . The detection and quantification limits were 50 and  $170 \text{ nmol L}^{-1}$ , respectively. Recovery studies were carried out by adding standard DA to a pharmaceutical sample. Good recovery values were obtained (96.3%).

For DA determination in the presence of AA and UA, it was necessary to change the oxidation potential pulse (generation of *o*-DQ) from 0.80 V to +0.65V (the UA oxidation does not occur). The same reduction and cleaning potential pulses were used and only the time of application for the cleaning potential pulse needed to be increased (800ms). Repeatability studies for DA analysis in the presence of AA and UA presented good results, with RSD calculated in 0.25% for 15 successive injections of solution containing simultaneously AA ( $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), UA ( $0.50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and DA ( $50.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ). In this last case, the linear range for DA analysis was also between 1.0 to  $100.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , with correlation coefficient,

detection and quantification limits calculated, respectively, as 0.998, 11 nmol L<sup>-1</sup> and 37 nmol L<sup>-1</sup>.

Simultaneous analysis of AA and UA were carried out using the following sequence of potential pulses:

- a) +0.6V / 100ms: oxidation and quantification of ascorbic acid;
- b) +0.8V / 100ms: oxidation of AA and UA;
- c) +0.1V / 30ms: reduction of the oxidation product of UA and respective quantification;
- d) 0.0V/ 1s: cleaning and/or regeneration of the electrode surface.

In the simultaneous analysis of AA and UA, the RSD for successive injections (n=25) of a solution containing AA+UA (100.0 and 200.0 µmol L<sup>-1</sup>) was calculated in 0.3 and 0.6 %, respectively. The analytical curve presented linear behavior (current vs concentration) between 100.0 to 300.0 and 50.0 to 150.0 µmol L<sup>-1</sup> for AA and UA, respectively. Based on these results, other parameters were calculated, respectively, for AA and AU analysis: correlation coefficients ( $R = 0.997$  and  $0.995$ ), detection limits (82 and 273 nmol L<sup>-1</sup>) and quantification limits (169 and 563 nmol L<sup>-1</sup>).

**Keywords:** Multiple Pulse Amperometry, flow injection analysis, dopamine, ascorbic acid, uric acid.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.1:** Fórmula estrutural da Dopamina.

**Figura 1.2:** Etapas do processo de biossíntese da dopamina.

**Figura 1.3:** Estrutura do cérebro.

**Figura 1.4:** Fórmula Estrutural do Ácido Ascórbico.

**Figura 1.5:** Fórmula Estrutural do Ácido Úrico.

**Figura 1.6:** (a) perfil apresentado momentos após a introdução da amostra. (b) perfil da amostra, após o processo de dispersão.

**Figura 1.7:** (A) Esquema da varredura do potencial vs tempo. (B) Voltamograma da corrente obtido em função do potencial.

**Figura 2.1:** Esquema de montagem para utilização da pressão gerada por uma coluna de água para controle de vazão de sistemas em fluxo.

**Figura 2.2:** Célula eletroquímica de três eletrodos (tipo “wall- jet”).

**Figura 2.3:** Esquema do sistema FIA empregado nos estudos.

**Figura 3.1:** Mecanismo da oxidação eletroquímica da DA e do AA e a reação química entre o AA e a *o*-DQ e entre o AA e a água.

**Figura 3.2:** Voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  sem (a) e com a adição de (b)  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AA ou (c)  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de DA. ]

**Figura 3.3:** Mecanismo das etapas eletroquímicas e possíveis etapas químicas para a reação de oxidação da DA.

**Figura 3.4:** Mecanismo de oxidação eletroquímica do AA e da reação química entre o ADA e a água.

**Figura 3.5:** Efeito da velocidade de varredura usando VC para DA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  sobre ECV em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Figura 3.6:** Dependência linear das correntes de pico ( $\mu\text{A}$ ) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura  $(\text{mV s}^{-1})^{1/2}$ .

**Figura 3.7:** Intensidade de corrente obtida da injeção de  $300 \mu\text{L}$  de solução de dopamina  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função do tempo de aplicação do pulso de potencial de oxidação da dopamina.

**Figura 3.8:** Intensidade dos sinais de corrente de redução em função do potencial.

**Figura 3.9:** Intensidade dos sinais de corrente de redução em função da vazão da solução carregadora.

**Figura 3.10:** Intensidade do sinal amperométrico em função do volume da amostra injetada.

**Figura 3.11:** (A<sub>1</sub>) Amperogramas para injeções de soluções contendo 90  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AA (a), 90  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DA (b) e uma mistura de ambas as espécies analíticas na mesma concentração anterior (c). (A<sub>2</sub>) Escada de potenciais aplicados.

**Figura 3.12:** (A<sub>1</sub>) Amperogramas de múltiplos pulsos com injeção de soluções em duplicata contendo 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DA (a), 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de AA (b) e mistura de ambas as espécies analíticas nas mesmas concentrações de a e b (c). (A<sub>2</sub>) Escada de aplicação dos pulsos de potenciais.

**Figura 3.13:** Respostas amperométricas após 24 injeções consecutivas de 300  $\mu\text{L}$  de solução contendo simultaneamente DA e AA (100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , respectivamente).

**Figura 3.14:** Resposta amperométrica em fluxo para injeções de soluções contendo 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DA (exceto a) e aumento da concentração de AA: a=b= 0,25; c= 0,5; d= 1,0; e=2,0; f=4,0; g=8,0 e h= 16,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2  $\text{mol L}^{-1}$ .

**Figura 3.15:** Amperograma para redução de *o*-DQ para a injeção de soluções de concentrações crescentes de DA (a=1,0; b=10; c=20; d=30; e=40; f=50; g=60; h=70; i=80; j=90 e l=100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de  $1,0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$  de AA.

**Figura 3.16** Curva analítica obtida para concentrações crescentes de DA.

**Figura 3.17:** Voltamogramas cíclicos obtidos para  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2  $\text{mol L}^{-1}$  sem (a) e com a adição de (b) AA  $1,0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ , (c) DA  $1,0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$  ou (d) AU  $0,5 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ , sobre ECV.

**Figura 3.18:** Mecanismo de oxidação do ácido úrico.

**Figura 3.19:** Intensidade da corrente amperométrica de redução monitorada no potencial de redução em função da variação do potencial de oxidação para uma solução contendo 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de dopamina ou 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido úrico.

**Figura 3.20:** Intensidade do sinal amperométrico de oxidação, obtida da injeção de 300  $\mu\text{L}$  de solução contendo DA (10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e AU ( $2,0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ ) em função do tempo de aplicação do potencial de +0,65 V.

**Figura 3.21:** Amperograma de múltiplos pulsos com injeção de soluções em triplicata contendo 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de dopamina (a), 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido ascórbico (b),  $0,5 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$  de ácido úrico (c) ou mistura de todas as espécies analíticas nas mesmas concentrações dos itens anteriores (d).

**Figura 3.22:** Resposta amperométrica após 15 injeções consecutivas de 300  $\mu\text{L}$  de solução contendo simultaneamente DA, AA e AU ( $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente).

**Figura 3.23:** Resposta amperométrica em fluxo obtidas para injeções em duplicatas de soluções contendo  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DA e aumento da concentração de AU: a=0,05; b= 0,1; c= 0,2; d= 0,50; e=1,0; f=2,0 e g=4,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Figura 3.24:** Amperograma obtido para a injeção de soluções com concentrações crescentes de DA em  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (a=1,0; b=10; c=20; d=30; e=40; f=50; g=60; h=70; i=80; j=90 e l=100) na presença de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de AA e  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de AU.

**Figura 3.25:** Curva de calibração para a dopamina.

**Figura 3.26:** Efeito da velocidade de varredura usando VC de  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de AA em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  sobre eletrodo de carbono vítreo.

**Figura 3.27:** Dependência linear das correntes de pico anódico ( $\mu\text{A}$ ) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ )<sup>1/2</sup> para o ácido ascórbico em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Figura 3.28:** Efeito da velocidade de varredura usando VC para  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido úrico em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  sobre ECV.

**Figura 3.29:** Dependência linear das correntes de pico anódica ( $\mu\text{A}$ ) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

**Figura 3.30:** Amperogramas para injeção em fluxo em soluções em triplicata de  $100 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de AU ou  $200 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de AA nos seguintes potenciais: +0,3 V; +0,4 V; +0,5 V; +0,6 V; +0,7 V; +0,8 V; +0,9 V; +1,0 V sobre eletrodo de carbono vítreo.

**Figura 3.31:** Intensidade de corrente em função da vazão da solução carregadora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) obtida nos seguintes pulsos de potenciais: (■) +0,6 V / 100ms (oxidação do AA), +0,8 V / 100ms (não apresentado) e (●) +0,1V / 30ms (redução do produto da oxidação do AU).

**Figura 3.32:** Intensidade dos sinais amperométricos em função da alíquota de amostra injetada no sistema FIA. (■) +0,6 V / 100ms (oxidação do AA) e (●) +0,1V / 30ms (redução do produto de oxidação do AU). Solução de AA=  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  e AU =  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Figura 3.33:** Amperograma de múltiplos pulsos com injeção em fluxo ( $n=3$ ) de soluções contendo  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AU (a),  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA (b) ou AU e AA nas mesmas concentrações anteriores (c).

**Figura 3.34:** Amperograma de múltiplos pulsos obtido para 25 injeções consecutivas de alíquotas de  $300 \mu\text{L}$  de solução contendo simultaneamente  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AU e  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA respectivamente.

**Figura 3.35:** Respostas amperométricas em fluxo para injeções em duplicatas de soluções contendo  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA e aumento da concentração de AU (a = somente AA): b= 100; c= 200; d= 400 e e=800  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Figura 3.36:** Respostas amperométricas em fluxo para injeções em duplicatas de soluções contendo  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AU e aumento da concentração de AA (a = somente AU; b= 100; c= 200; d= 400 e e=800  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Figura 3.37:** Amperograma para oxidação do AA ( $+0,6\text{V} / 100\text{ms}$ ) e redução do produto da oxidação do AU ( $+0,1\text{V} / 30\text{ms}$ ) para injeções ( $n=3$ ) de soluções com concentrações crescentes de AA e AU (a=100/50; b=150/75; c=200:100; d=250/125; e=300:150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

**Figura 3.38:** (A) Curva de calibração obtida na análise de AA no pulso de potencial  $+0,60\text{V} / 100\text{ms}$ . (B) Curva de calibração obtida na análise do AU no pulso de potencial  $+0,1\text{V} / 30\text{ms}$ .

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 3.1:** Valores de corrente anódica ( $I_a$ ) e catódica ( $I_c$ ) e potencial de pico anódico ( $E_a$ ) e catódico ( $E_c$ ) para DA em diferentes velocidades de varredura ( $v$ ).

**Tabela 3.2:** Resultados obtidos na determinação de dopamina em amostra de fármaco na ausência e após a adição de AA.

**Tabela 3.3:** Valores de corrente anódica ( $I$ ) e potencial de pico ( $E$ ) para oxidação do AA para diferentes velocidades de varredura ( $v$ ).

**Tabela 3.4:** Valores de corrente anódica ( $I$ ) e potencial de pico ( $E$ ) para oxidação do ácido úrico para diferentes velocidades de varredura ( $v$ ).

**Tabela 3.5:** Intensidade das correntes amperométricas para redução do produto da oxidação do AU e oxidação do AA em meio de  $H_2SO_4$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Tabela 3.6:** Coeficientes de Correlação, limites de detecção e de quantificação do AA e AU.

**Tabela 3.7:** Resultados obtidos na determinação de AA e AU em amostra padrões.

**LISTA DE ABREVIações E SIGLAS**

|                              |                                          |
|------------------------------|------------------------------------------|
| <b>AA</b> .....              | Ácido Ascórbico                          |
| <b>ADA</b> .....             | Ácido Dehidroascórbico                   |
| <b>AMP</b> .....             | Amperometria de Múltiplos Pulsos         |
| <b>AU</b> .....              | Ácido Úrico                              |
| <b>CLAE</b> .....            | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| <b>CV</b> .....              | Carbono Vítreo                           |
| <b>DA</b> .....              | Dopamina                                 |
| <b>EA</b> .....              | Eletrodo Auxiliar                        |
| <b>EDTA</b> .....            | Ácido etilenodiamino tetra-ácetico       |
| <b>ER</b> .....              | Eletrodo de Referência                   |
| <b>ET</b> .....              | Eletrodo de Trabalho                     |
| <b>FIA</b> .....             | Análise por Injeção em Fluxo             |
| <b>I<sub>red</sub></b> ..... | Corrente de redução                      |
| <b>I<sub>oxi</sub></b> ..... | Corrente de oxidação                     |
| <b>LD</b> .....              | Limite de Detecção                       |
| <b>LQ</b> .....              | Limite de Quantificação                  |
| <b>ms</b> .....              | milisegundos                             |
| <b>SDS</b> .....             | Dodecil Sulfato de Sódio                 |
| <b>USP</b> .....             | Farmacopéia dos Estados Unidos           |
| <b><i>o</i>-DQ</b> .....     | <i>o</i> -dopaminoquinona                |
| <b>VC</b> .....              | voltametria cíclica                      |

## TRABALHOS DESENVOLVIDOS DURANTE O MESTRADO

- ✓ Artigo submetido para publicação: **Flow-injection amperometric method for indirect determination of dopamine in the presence of a large excess of ascorbic acid, 2009.**
- ✓ Wallans T. P. dos Santos, Denise T. Gimenes, Edimar G.N. de Almeida, Sebastião de P. Eiras, Yaico D. T. de Albuquerque, Eduardo M. Richter, **Simple Flow Injection Amperometric System for Simultaneous Determination of Dipyrone and Paracetamol in Pharmaceutical Formulation**, Journal of the Brazilian Chemical Society, **2009** (disponível online).
- ✓ Wallans T. P. dos Santos, Edimar G.N. de Almeida, Humberto E. A. Ferreira, Denise T. Gimenes, Eduardo M. Richter, **Simultaneous Flow Injection Analysis of Paracetamol and Ascorbic Acid with Multiple Pulse Amperometric Detection**, Eletroanalysis, 20, 1878-1883, **2008.**
- ✓ Denise T. Gimenes, Wallans T. P. dos Santos, Thiago F. Tormin, Joyce T. Miranda, Eduardo M. Richter, **Determinação indireta de dopamina na presença de altas concentrações de ácido ascórbico usando FIA com detecção amperométrica**, Livro de resumos do XVII simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Fortaleza-CE, **2009.**
- ✓ Thiago F. Tormin, Denise T. Gimenes, Wallans T. P. dos Santos, Eduardo M. Richter, **Estudos iniciais para determinação simultânea de diclofenaco e paracetamol em fármacos utilizando Fia com detecção amperométrica**, Anais do XXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Belo Horizonte-MG, **2008.**
- ✓ Denise T. Gimenes, Edimar G.N. de Almeida, Wallans T. P. dos Santos, Eduardo M. Richter, **Estudos para determinação eletroquímica de Dopamina (DP) na presença de Ácido Ascórbico (AA) em sistema FIA**, Anais do XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Uberlândia, **2007.**
- ✓ Denise T. Gimenes, Wallans T. P. dos Santos, Eduardo M. Richter, **investigação para determinação de Ácido Acetilsalicílico (AAS) e Ácido Ascórbico (AA) em formulações farmacêuticas**, Anais do XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Uberlândia, **2007.**

---

# PARTE 1

## INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO

## 1.1 ESPÉCIES ANALÍTICAS ESTUDADAS

### 1.1.1 Dopamina

A Dopamina (DA), 2-(3,4-dihidroxi-fenil)etilamina, com a fórmula estrutural apresentada na Figura 1.1, é uma catecolamina (apresenta os grupos catecol e amino). Existe no cérebro e serve para conduzir a transmissão de uma célula nervosa (neurônio) para outra, sendo precursora de outras catecolaminas, como por exemplo, a noradrenalina e a adrenalina.

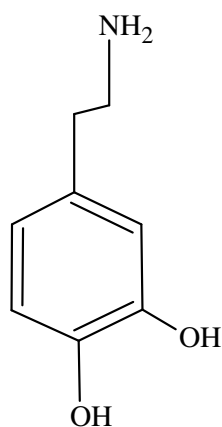


**Figura 1.1:** Fórmula estrutural da Dopamina.

A síntese da dopamina ocorre nos neurônios a partir do aminoácido tirosina, que é hidrólizado pela enzima tirosina hidroxilase a L-Dopa. Em seguida, a L-Dopa é descarboxilada e forma a dopamina pela ação da enzima dopa carboxilase. É armazenada nas vesículas dos terminais pré-sinápticos [1]. A Figura 1.2 descreve a síntese.

A dopamina é utilizada no tratamento de diversos tipos de choques e da hipotensão grave após infarto agudo do miocárdio, pois atua dilatando os vasos sanguíneos renais, aumentando, dessa forma, o fluxo sanguíneo. Como medicamento, é administrada pela via endovenosa, não podendo ser administrada oralmente devido à sua oxidação e metabolização pelo fígado ou rins, sendo, assim, nulo o seu efeito [2]. É medicamento restrito ao uso hospitalar.

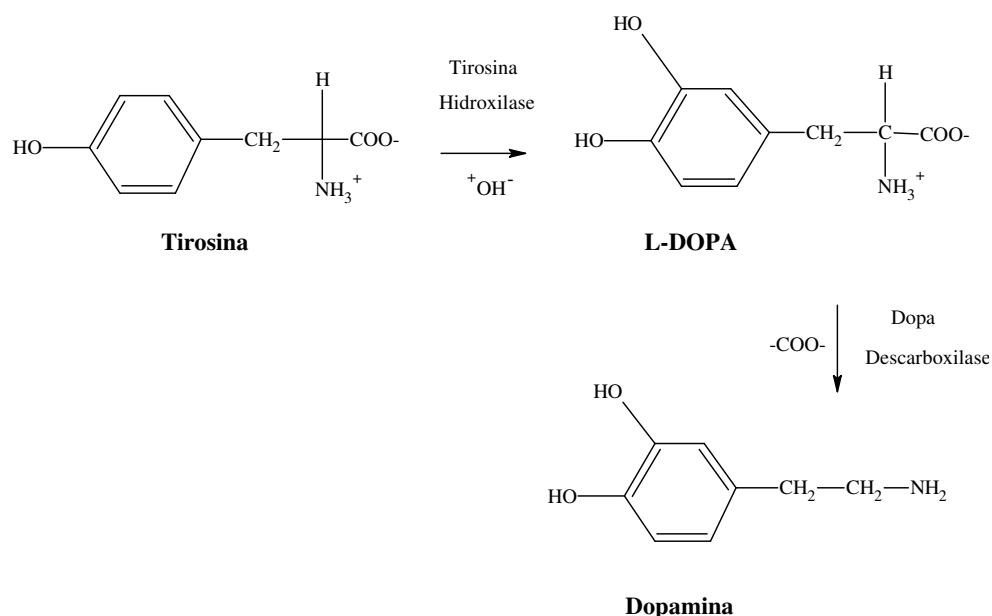


**Figura 1.2:** Etapas do processo de biossíntese da dopamina.

Baixos níveis de dopamina estão relacionados com problemas neurológicos, tais como, Mal de Alzheimer e a doença de Parkinson [3]. Devido à influência da DA e de seus produtos de oxidação nestas doenças neurodegenerativas e por estas estarem presentes em nosso meio, cabe enfatizar as mesmas com o objetivo de maior esclarecimento do mecanismo de ação e/ou alteração deste mecanismo.

#### 1.1.1.1 Mal de Alzheimer

Esta doença foi descrita pela primeira vez em 1970, pelo médico alemão Alois Alzheimer. O Mal de Alzheimer é caracterizado como uma doença cerebral degenerativa, lenta e progressiva que produz um declínio nas habilidades de pensar, raciocinar, memorizar, juntamente com alterações no comportamento. Depois das doenças cardiovasculares e do câncer, a doença de Alzheimer é a terceira maior causa de morte nos países desenvolvidos. Estima-se que 8% da população acima de 65 anos tenha a doença. No Brasil, são mais de 600 mil portadores [4].

Os sintomas iniciais, tais como, falta de memória, diminuição do tempo de atenção, problemas matemáticos, dificuldade de expressar pensamentos, humor inconstante, variável e imprevisível, menos desejo de fazer as coisas ou de conhecer pessoas são difíceis de serem identificados, sendo que a deterioração nas habilidades cognitivas pode progredir por cerca de 10 anos em alguns pacientes, levando a um sério quadro de demência [5]. Análises

microscópicas feitas da superfície cerebral de pessoas com o Mal de Alzheimer mostraram uma perda das células nervosas em certas regiões do cérebro, como no hipocampo e no córtex cerebral, região associada ao raciocínio, memória e linguagem. Um dos fatores estudados como causa do aparecimento do Mal de Alzheimer está baseado no metabolismo do cobre, onde este promove a oxidação da DA. Quando isto ocorre, há um aumento no fluxo de espécies de oxigênio reativo, que vem a ser o fator de doenças neurodegenerativas [6].

#### **1.1.1.2 Mal de Parkinson**

A doença de Parkinson foi descrita em 1817 pelo médico inglês James Parkinson. Os sinais apresentados pelo portador são tremor, rigidez e diminuição dos movimentos. É comum ser diagnosticada em pessoas com 50 e 60 anos de idade. O conjunto de manifestações da doença se deve a uma perda de células numa estrutura muito pigmentada designada substância negra. Esta envia para o *striatum* um neurotransmissor: a dopamina (Figura 1.3). Em doentes parkinsonianos há uma falta de dopamina neste circuito neural [7, 8].

Na doença de Parkinson, a deficiência de dopamina no nível *striatum* perturba o funcionamento harmonioso dos núcleos cinzentos centrais, reforçando a atividade do núcleo subtalâmico indiretamente, agindo como um freio sobre a motricidade [9]. Pessoas que apresentam esta doença são tratadas com uma substância denominada Dopa. Ao chegar ao cérebro transforma-se em DA reforçando a DA endógena que as células da substância negra, degenerada, fabricam em quantidade insuficiente. Outro grupo de fármacos utilizados são os agonistas da dopamina: a bromocriptina, o pergolide, o ropinirole. Estes fármacos controlam os sintomas não por substituírem a DA, mas porque estimulam as células sobreviventes. É importante salientar que a doença de Parkinson ainda não tem cura.

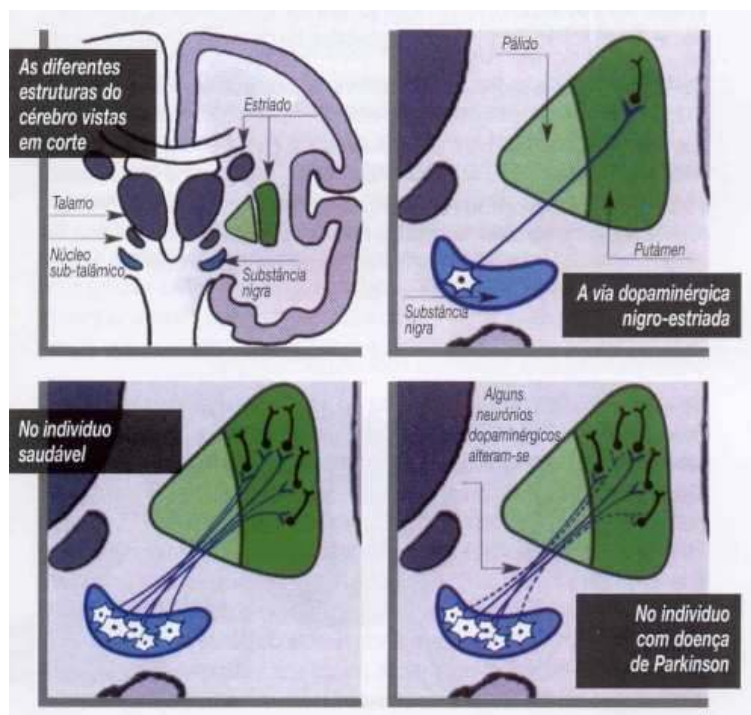


**Figura 1.3:** Estrutura do cérebro.

### 1.1.2 Ácido Ascórbico (AA)

O Ácido Ascórbico (AA) ou vitamina C, 3-oxo-L-gulofuranolactona, representado pela Figura 1.4, é uma cetolactona de seis carbonos, estruturalmente relacionada à glicose e outras hexoses.

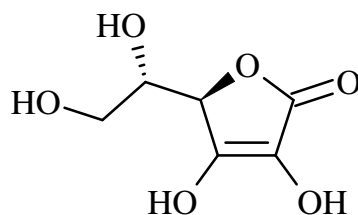


**Figura 1.4:** Fórmula Estrutural do Ácido Ascórbico.

O AA é uma molécula utilizada na hidroxilação de várias outras reações bioquímicas nas células, sendo relacionada à síntese de colágenos, proteoglicanos e outros constituintes orgânicos da matriz intercelular em diversos tecidos, como os dentes, tendões, paredes dos vasos sanguíneos, ossos e endotélio capilar. Além disso, é antioxidante, sendo usado para

transformar radicais livres de oxigênio em formas inertes. Altas concentrações de AA no sistema nervoso explicam-se pela provável necessidade de ascorbato (forma ionizada do AA) na síntese de neurohormônios e de noradrenalina. A vitamina C participa no metabolismo do triptofano e dos neurotransmissores, serotonina e DA [10].

### 1.1.3 Ácido Úrico (AU)

O AU é um ácido fraco ( $pK_a$  5,75), representado estruturalmente na Figura 1.5, sendo que sua forma ionizada, o urato monossódico, é a forma encontrada no plasma humano, no líquido extra-celular e na sinóvia (líquido viscoso, que preenche as cavidades articulares). É o principal produto final produzido pelo metabolismo das purinas.

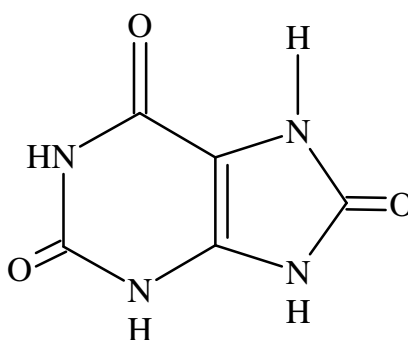


**Figura 1.5:** Fórmula Estrutural do Ácido Úrico.

A taxa de uratos no organismo humano é de  $68 \text{ mg L}^{-1}$ , a qual encontra-se no seu limite de solubilidade na temperatura normal do corpo humano. O urato de sódio é solúvel a  $37^\circ \text{C}$ , mas pode depositar-se provocando inflamações nas articulações periféricas, joelhos, tornozelos, calcanhares e artelhos do pé, onde a temperatura do corpo é mais baixa. Quando o ácido úrico atinge taxas superiores a  $80 \text{ mg L}^{-1}$  no plasma sanguíneo, ele pode depositar-se em qualquer tecido do organismo. Quando isso ocorre, podem surgir processos inflamatórios como gota, artrite ou nefrite. A quantificação de AU no sangue e na urina é de grande valor para o diagnóstico das alterações do metabolismo do AU estando a hiperuricemia relacionada a diversas doenças como, por exemplo, a leucemia, hipertiroidismo, hipertensão e diabetes [11].

## 1.2 DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA E ÁCIDO ASCÓRBICO

A determinação analítica de DA tem sido fonte de diversos estudos, tendo em vista a sua importância biológica e farmacêutica, porém, sua determinação é dificultada pela coexistência com outros compostos interferentes. Dentre estes compostos, destaca-se o AA. A DA e o AA estão presentes em amostras biológicas, como por exemplo, no sistema nervoso central e no fluido extracelular [3]. O AA está presente nestas amostras em altas concentrações ( $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) para proteger neurotransmissores catecolamínicos de sua oxidação espontânea [12], enquanto que a DA apresenta concentrações baixas ( $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) [13], o que dificulta ainda mais a sua determinação, pois o AA normalmente é um interferente. Por isso, seletividade e sensibilidade são importantes no desenvolvimento de qualquer procedimento para a determinação de DA.

Para a determinação da DA, a farmacopéia dos Estados Unidos “USP” recomenda o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção espectrofotométrica a 280nm [14]. Métodos alternativos localizados na literatura para quantificação da DA envolvem técnicas como a cromatografia [15-17], fluorescência molecular [18], quimiluminescência [19-21], potenciometria [22, 23], amperometria [14, 24, 25] e espectrofotometria [26, 27]. Como a DA pode ser eletroquimicamente oxidada sobre diversos materiais eletródicos com a obtenção de valores que apresentam sensibilidade considerada, as técnicas eletroquímicas são constantemente exploradas para sua quantificação. No entanto, um problema já citado anteriormente, também persiste usando estas técnicas: o AA também oxida na mesma região de potencial que a dopamina. Para contornar este problema e quantificar seletivamente a dopamina, vários artifícios podem ser localizados na literatura, como, por exemplo, o uso de eletrodos modificados [28-30] ou o uso de surfactantes em solução [31-33].

Explicitar todos estes exemplos se tornaria um assunto vasto e fugiria do intuito deste trabalho. Entretanto, uma breve revisão bibliográfica foi feita destacando-se alguns destes métodos eletroanalíticos.

A determinação de dopamina em formulações farmacêuticas foi estudada por Bezerra *et al.* [14]. Eles utilizaram a análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica. Um eletrodo de pasta de carbono foi modificado enzimaticamente constituído por 25% (m/m) de polifenol oxidase obtido de tecido de *Annona muricata* L., 30 % grafite (m/m), 30 % (m/m)

de silicone e 15% (m/m) de 7,7,8,7 tetracianoquinodimetano. A detecção foi feita no potencial de 0,10 V (vs Ag/AgCl) com volume injetado de 250  $\mu\text{L}$ . Como solução carregadora utilizou-se tampão fosfato (pH 7,8) a uma vazão correspondente a 2,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Segundo os autores, o biossensor desenvolvido apresentou uma considerada estabilidade e reprodutibilidade, permitindo até 500 determinações em 60 dias, sem perda significativa da atividade enzimática. O sistema FIA apresentou resposta linear com concentrações de DA no intervalo de  $2,0 \times 10^{-2}$  a  $2,0 \times 10^{-4}$  com desvio padrão relativo menor que 1,5 % ( $n = 10$ ).

Utilizando voltametria, análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica e uma célula de camada delgada com dois eletrodos de trabalho, Yeh [24] e co-autores determinaram DA indiretamente. DA é pré-oxidada no primeiro eletrodo formando imediatamente um aduto com um nucleófilo, eletricamente inativo (o 4-aminobenzenosulfonato de sódio) presente no eletrólito. A corrente de redução obtida no segundo eletrodo de trabalho (carbono vítreo) a partir do aduto formado foi utilizada para monitorar a DA. A adição do nucleófilo tem a função de evitar a reação química entre o produto de oxidação da dopamina (*o*-DQ) e o AA presente em solução. Segundo os autores, o método apresenta um baixo valor para o limite de detecção ( $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e desvio padrão relativo (0,2%) com 10 consecutivas injeções de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de padrão de dopamina e o sistema se mantém estável por 5 horas sem tratamento. Apesar do uso do nucleófilo, o método continuava apresentando problemas na presença de concentrações mais elevadas de AA e a curva analítica apresentada no trabalho foi obtida sem a presença de AA.

Matos e colaboradores [34] quantificaram simultaneamente ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona usando microeletrodos modificados pela eletrodeposição de diferentes metais nobres. Quatro grupos de microeletrodos foram utilizados incluindo um eletrodo de ouro sem modificação e eletrodos modificados com platina, paládio ou mistura de platina e paládio. Os eletrodos foram inseridos em uma célula em fluxo e a aquisição dos dados foi feita amperometricamente a potencial constante, com um potenciostato de quatro canais (multipotenciostato). A interpretação dos dados foi feita quimiometricamente por calibração multivariada, utilizando um grupo de 16 padrões com misturas selecionadas por dois níveis de fatorial. A análise de amostras sintéticas e farmacêuticas contendo ácido ascórbico e dipirona conduziu a valores próximos aos obtidos por iodimetria clássica.

Kachoosangi e Compton [35] descrevem um procedimento simples para a determinação de dopamina, serotonina e ácido ascórbico utilizando um eletrodo de grafite pirolítico e voltametria de pulso diferencial. Segundo os autores, o desempenho deste eletrodo é superior a outros não modificados à base de carbono e também aos eletrodos modificados, em termos

de limite de detecção e separação de picos (resolução) para determinação de dopamina, serotonina e ácido ascórbico. Com o uso deste método, os autores conseguiram um limite de detecção de 90, 60 e 200 nmol L<sup>-1</sup> para dopamina, serotonina e ácido ascórbico, respectivamente. O eletrodo foi utilizado na determinação das substâncias citadas acima tanto em amostras padrão como em amostras reais.

Em outro trabalho, a técnica de voltametria de pulso diferencial foi utilizada para determinação do comportamento eletroquímico da dopamina e ácido ascórbico [32]. Um eletrodo de pasta de carbono foi utilizado em solução contendo o surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) com concentração próxima à concentração micelar crítica. Os autores descrevem que, quando as análises são feitas em solução sem SDS, os potenciais de pico do AA e DA são completamente sobrepostos. No entanto, quando a concentração de SDS é maior que a concentração micelar crítica há uma separação entre as duas espécie analíticas (~240 mV). O potencial de pico da DA se torna menos positivo do que o do AA. Assim, o método permite a determinação seletiva de DA mesmo na presença de AA. A otimização dos parâmetros experimentais permitiu obter uma curva de calibração para a DA na presença de AA na faixa de 0,01-0,20 mmol L<sup>-1</sup>, um limite de detecção de 5,0 µmol L<sup>-1</sup> e 0,04812 µA µmol L<sup>-1</sup> de sensibilidade. De acordo com os autores, esta nova abordagem se mostrou eficaz para a determinação de DA em amostras reais.

Vários outros métodos são citados na literatura para a determinação de DA, mas em geral, todos apresentam inconveniências, tais como, necessidade de pré-tratamento da amostra ou etapas dispendiosas para modificação prévia do eletrodo de trabalho ou ainda adição de substâncias ao eletrólito para promover a separação entre o potencial de oxidação da dopamina e de seus interferentes.

### **1.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ASCÓRBICO E ÚRICO**

Assim como a DA e o AA, o AU também está presente em fluidos fisiológicos. Em alguns fluidos coexistem AA e AU. Como exemplo, podemos citar a urina, cujo nível de concentração de AU [36] é próximo a 450,0 µmol L<sup>-1</sup> e de AA entre 570,0-3400,0 µmol L<sup>-1</sup>. Devido à importância biológica destes dois compostos, e considerando o fato de ambos se oxidarem em potenciais muito próximos, o desenvolvimento de novas metodologias sensíveis e seletivas são requeridas para quantificação de AU e AA.

Na literatura, alguns trabalhos podem ser localizados onde a determinação de AA e AU é o foco do trabalho.

Usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica, Angnes et al [37] demonstraram a possibilidade de quantificar o teor de AA e AU em amostras de urina. Alíquotas da amostra foram injetadas sem e com tratamento enzimático com uricase (remoção do AU) e/ou ascorbato oxidase (remoção de AA). A diferença entre as intensidades dos sinais de corrente para a amostra com e sem tratamento enzimático é usado para a quantificação dos compostos. A quantificação foi possível usando o método de adição de padrão.

Um sensor fabricado pela eletropolimerização de 4-(2-piridilazo)-resorcinol [38] sobre um eletrodo de carbono vítreo foi usado para quantificação de AU na presença de AA, usando voltametria de pulso diferencial. Segundo os autores, utilizando este sensor os dois compostos podem ser separados, apresentando uma diferença de potencial de 345 mV a uma taxa de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . O pico de corrente de oxidação do AU aumenta linearmente na faixa de concentração de  $1,0 \times 10^{-8} - 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e o limite de detecção do AU calculado foi  $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ . O método também foi aplicado para determinação de ácido úrico em amostras de urina humana.

Eletrodos de carbono vítreo modificados com ácido glutâmico [39] foram aplicados na oxidação catalítica de ácido úrico e ácido ascórbico. Segundo os autores, o eletrodo modificado resolveu o problema da sobreposição dos sinais das espécies analíticas, apresentando picos voltamétricos bem definidos, tanto por voltametria cíclica quanto por pulso diferencial. A faixa de linearidade obtida para AU e AA foi de  $2,0 \times 10^{-6}$  a  $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  ( $R=0,996$ ) e de  $1,0 \times 10^{-6}$  a  $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  ( $R=0,997$ ), respectivamente. O eletrodo modificado mostrou melhora nos valores de sensibilidade, seletividade e estabilidade.

Em outro trabalho, Polímeros de N,N-dimetilalanina foram eletroquimicamente depositados [40] sobre eletrodos de pasta de carbono, formando filmes positivamente carregados devido ao grupo amônio quaternário presente no polímero. Com esta característica catiônica, o filme pré-concentrava AA e AU, que em pH 7,0, encontram-se carregados negativamente, facilitando o processo de oxidação para regiões mais negativas de potencial. Concomitantemente, foram observados maiores níveis de corrente e ausência de envenenamento, sendo que o efeito foi mais pronunciado para o AU. A determinação deste último foi efetuada com bons resultados de reprodutibilidade e sensibilidade. O limite de detecção do AU na presença de um excesso de AA (160 vezes mais) foi calculado, encontrando-se o valor de  $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

A quantificação de AA [41] na presença de AU também foi realizada usando um sistema com eletrodo de pasta de carbono modificado com um filme polimérico de 3,4 dihidroxibenzaldeído. A curva de calibração apresentou-se linear na faixa de concentração de

0,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ . Foi obtida melhora da sensibilidade, associada à diminuição de sobrepotencial de oxidação do AA.

Retornando-se à questão da importância do monitoramento da DA, tanto em sistemas biológicos, como em amostras farmacêuticas, assim como o monitoramento do AA e do AU em amostras biológicas, o desenvolvimento de metodologias de fácil execução, de custo moderado e com alta frequência analítica para a determinação da destes compostos é de fundamental importância. Neste âmbito, a Análise por Injeção em Fluxo associada com Amperometria de Múltiplos Pulsos representa uma ferramenta útil na busca destas metodologias.

## **1.4 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)**

Os sistemas de Análise por Injeção em Fluxo - FIA (do inglês “Flow Injection Analysis”) tiveram sua proposta e desenvolvimento inicial a partir de uma criativa combinação de características de métodos analíticos já existentes tais como técnicas eletroquímicas, espectroscopia de absorção atômica, espectrofotometria, fluorescência, quimiluminescência, bem como, aperfeiçoamento do método de análise em fluxo segmentado. Em pouco tempo, mostrou-se uma ferramenta muito útil para diversas determinações analíticas [2].

Esta técnica foi desenvolvida por Růzicka & Hansen em 1975 e tornou-se uma das mais populares técnicas analíticas para aplicações dentro de um curto período de tempo devido às suas diversas vantagens, como simplicidade na instrumentação, economia no consumo de amostra e reagente, eliminação de algumas possibilidades de contaminação, diminuição da manipulação das amostras por parte do analista, melhor precisão, diminuição do custo operacional e aumento na velocidade de processamento [42].

O processo de análise por injeção em fluxo pode ser dividido em três partes: propulsão dos fluidos, injeção da amostra e detecção. Para fazer a propulsão em sistemas FIA comumente se utiliza bombas peristálticas. Esta deve possuir um torque suficiente para manter a vazão constante, mesmo que ocorram alterações (de percurso, por exemplo) no sistema [43]. O uso das bombas peristálticas apresenta limitações devido ao seu alto custo e a sensibilidade a vazão quando se deseja trabalhar com detectores voltamétricos e amperométricos, pois há uma intensa geração de ruídos na linha base proveniente do sistema de roletes de propulsão (pulsção) fornecido pela bomba [44]. Uma alternativa para diminuir os ruídos da linha base é o uso de amortecedores de pulsos ou a utilização de bombas tipo

seringa [45, 46] ou gravidade [47, 48]. Entre estas opções, o uso da gravidade é inconveniente quando se deseja alterar a vazão de um valor preciso a outro. Uma alternativa de baixo custo foi desenvolvida por Matos e colaboradores [44]. Os autores descrevem o uso de um mini-compressor de ar do tipo bomba de diafragma, cuja função primeira era destinada a oxigenação de aquários domésticos. Segundo os autores, este sistema é uma alternativa versátil, de baixo custo, que permite ajuste contínuo da vazão em largo intervalo, assim como operação com vários canais, sempre com a vantagem da ausência de pulsação do fluido carregador. Este sistema apresenta algumas desvantagens tais como: necessidade de pausa na operação para preenchimento do frasco; necessidade de reajuste da vazão após modificações no circuito (alteração da vazão hidrodinâmica); obstrução da válvula de ajuste de vazão por partículas maiores; necessidade de válvula adicional para operação no modo *stopped flow*; maior susceptibilidade a flutuações na tensão da rede elétrica, na temperatura ambiente ou na viscosidade dos fluidos injetados. Outro trabalho disponibilizado na literatura recentemente [49] faz uso da resistência gerada por uma coluna de água para controlar a vazão em sistemas em fluxo. O sistema se mostra eficiente quanto à linearidade entre a vazão e a altura da coluna de água utilizada.

Outro sistema que é parte integrante do sistema FIA é o injetor. Sua função é introduzir um volume definido e reprodutível de uma amostra em um fluxo de reagentes ou de um transportador adequado. Diversos tipos de injetores são relatados na literatura, sendo os mais comuns os de válvula rotatória desenvolvido por Ruzicka e Hansen [50] e o injetor desenvolvido por pesquisadores do CENA/USP [51]. Esse injetor é constituído por três peças de acrílico, sendo duas fixas e uma peça central móvel, que por meio de movimentos para frente e para trás, coleta e insere a amostra no percurso analítico.

Após a injeção da amostra em um fluxo transportador tem-se um perfil de concentração retangular (Figura 1.6a). Conforme uma alíquota da amostra flui em direção ao detector, ela se dispersa através do fluido transportador (Figura 1.6b). O processo de dispersão ocorre como resultado do processo de convecção, ou seja, o fluxo laminar faz com que o centro do fluido se movimente mais rápido do que sua fração próxima às paredes dos tubos. Outro fator é a difusão por concentração, que também provoca alterações no perfil de concentração da alíquota injetada [2].



**Figura 1.6:** (a) perfil apresentado imediatamente após a introdução da amostra. (b) perfil da amostra, após o processo de dispersão.

O ultimo processo do sistema FIA compreende a detecção analítica. Vários sistemas de detecção são empregados em sistemas FIA. Como exemplo, podemos citar absorção atômica [52, 53], fluorescência [54], quimiluminescência [55-57], amperometria [58, 59], voltametria [60, 61], entre outros.

## 1.5 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

As técnicas voltamétricas abrangem um conjunto de técnicas eletroquímicas onde o controle do potencial é feito no eletrodo de trabalho. Para que este controle seja possível, uma diferença de potencial é aplicada entre o eletrodo de trabalho (ET) e um eletrodo de referência (ER) cujo potencial químico é conhecido e constante. Para que o potencial se mantenha constante no eletrodo de referência durante os experimentos, a corrente gerada pelo sistema flui entre os eletrodos de trabalho e auxiliar (arranjo eletrônico).

O potencial aplicado entre o ET e o ER é em forma de varredura, isto é, varia-se o potencial em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente. A curva de corrente vs potencial obtida é denominada voltamograma. Dentre as técnicas voltamétricas podemos destacar as lineares (voltametria linear e cíclica) e as de pulsos (pulso normal, diferencial e de onda quadrada). Estas técnicas baseiam-se nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do ET e a camada fina da solução adjacente a essa superfície, denominada camada de Nernst. Esta camada surge de um gradiente de concentração próximo à superfície do eletrodo devido ao consumo ou origem de espécies eletroativas nesta área. Portanto, a concentração nesta camada difere da concentração existente no seio da solução. Para que a relação entre o sinal eletroquímico medido e concentração da espécie analítica de interesse seja linear é indispensável que a velocidade do transporte de massa nesta camada seja constante. O artifício usado para atingir este objetivo é o uso de um eletrólito inerte cuja concentração seja pelo menos 50 vezes superior ao das espécies analíticas de interesse, sendo que este eletrólito deve estar presente nas amostras e

nas soluções padrão. Com isso, a mesma força iônica é mantida, minimizando variações na região da dupla camada elétrica e garantindo que o sinal transiente registrado possa ser atribuído ao processo faradaico preferencialmente controlado por difusão e minimizando o efeito de migração.

Existem três formas pelo qual o transporte de massa pode ocorrer: difusão, migração e convecção [62]. A difusão é criada pela diferença de concentração entre as espécies próximas a superfície do eletrodo e o seio da solução; a migração deve-se à movimentação de espécies iônicas devido à ação de um campo elétrico e a convecção consiste na movimentação de espécies iônicas ou neutras devido à agitação mecânica da solução (sistemas hidrodinâmicos) ou em função de um gradiente de temperatura.

Dois tipos de processos podem conduzir corrente através da interface eletrodo/solução: a corrente faradaica e a corrente não faradaica ou capacitiva [63]. A origem da corrente faradaica está na transferência de elétrons entre o ET e as espécies eletroativas da solução. Este processo obedece à lei de Faraday, a qual determina que a corrente é proporcional a quantidade de reagentes formados ou consumidos no eletrodo. A corrente capacitiva é gerada pela dupla camada elétrica formada na interface eletrodo/solução devido a uma variação de potencial ou até mesmo a potencial constante, caso a capacitância do eletrodo estiver mudando por alguma razão, que pode ser pela mudança de área do eletrodo ou pela variação de temperatura. Esta corrente não depende de nenhuma reação química.

A seguir um breve resumo sobre as duas técnicas eletroquímicas utilizadas neste trabalho.

### **1.5.1 Voltametria Cíclica**

Os principais atributos responsáveis pela popularização, em diversas áreas de aplicação, da técnica de voltametria cíclica são facilidade de utilização e versatilidade. Frequentemente, a voltametria cíclica é o primeiro experimento a ser realizado quando se deseja estudar o comportamento eletroquímico de um composto ou a superfície de um eletrodo [64], pois permite verificar rapidamente o comportamento redox de um sistema em um intervalo de potencial.

A voltametria cíclica é uma técnica em que se estuda a relação potencial-corrente (Figura 1.7B), em uma célula voltamétrica apropriada quando submetida a uma varredura de potencial cíclico e linear (Figura 1.7A).

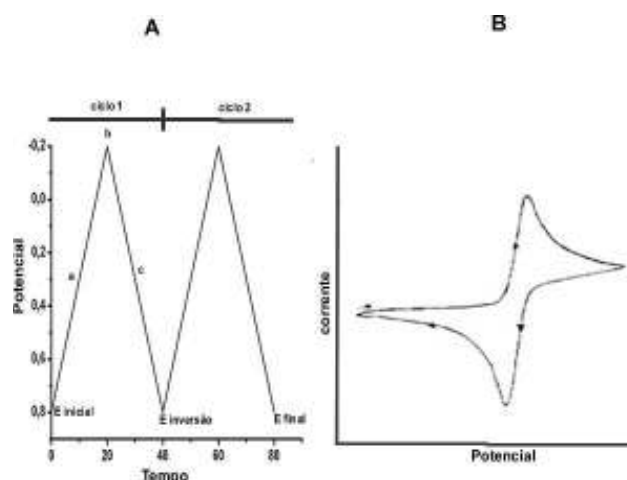


**Figura 1.7:** (A) Esquema da varredura do potencial vs tempo. (B) Voltamograma da corrente obtida em função do potencial.

Normalmente, a célula voltamétrica é constituída por três eletrodos: um eletrodo de trabalho (polarizável, ou seja, assume o potencial que lhe é aplicado), um eletrodo de referência (Ag/AgCl ou de calomelano) e um eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo (fio ou placa de platina). Esses eletrodos se encontram imersos em uma solução da espécie eletroativa de interesse (espécie analítica) contendo um excesso de um eletrólito inerte (eletrólito suporte) responsável por diminuir a resistência da solução e garantir o controle difusional das espécies. Esses três eletrodos são conectados a um potenciostato que aplica potenciais num intervalo pré-definido e faz a aquisição do sinal de corrente. A análise dos voltamogramas cíclicos indica em que região de potencial ocorre determinada reação de oxidação e/ou redução de compostos eletroativos, além de indicar informações a respeito da reversibilidade destes compostos, da quantidade de elétrons envolvidos, da possível formação de espécies intermediárias e se o sistema é controlado por processos difusionais ou adsortivos. Deve-se enfatizar, porém, que a técnica gera em muitas situações somente resultados qualitativos de diagnósticos das reações eletroquímicas. Medidas quantitativas mais precisas são comumente obtidas com o emprego de técnicas de pulso [65].

### 1.5.2 Amperometria

Um sensor amperométrico mede uma corrente a um potencial aplicado fixo, isto é, para um ponto na curva de corrente-potencial. Um sensor voltamétrico registra vários pontos em uma região selecionada do perfil corrente-potencial. Portanto, um sensor amperométrico é um sensor voltamétrico para um potencial fixo [66].

Na detecção amperométrica a potencial constante, um potencial é aplicado no eletrodo de trabalho e, uma reação de oxidação ou de redução de uma espécie analítica em solução ocorre. Este tipo de detecção é amplamente utilizada, conforme relatado na literatura [67-74]. Uma limitação desta técnica é a falta de repetibilidade devido à adsorção de alguns subprodutos e/ou impurezas na superfície do eletrodo. Como por exemplo, na determinação eletroquímica de fenóis e de derivados fenólicos [75], onde ocorre a contaminação ou a passivação do eletrodo, comprometendo, assim, a taxa de transferência de carga entre o eletrodo e a espécie analítica de interesse. Além disto, também podem aparecer sinais eletroquímicos provenientes de subprodutos de reações que interferem no sinal de interesse na análise. Para a obtenção de resultados reprodutíveis durante a análise, a superfície do eletrodo deve ser limpa com frequência, quer pelo polimento mecânico ou por um procedimento de limpeza eletroquímica [42].

Na literatura, diversas estratégias são apresentadas para promover a limpeza da superfície do eletrodo de trabalho ou impedir sua contaminação ou passivação, tais como, adição de EDTA ao eletrólito suporte [75], o uso de eletrodos modificados [76, 77] ou regeneração da superfície do eletrodo realizada constantemente (“on line”) [78]. O sistema FIA acoplado à detecção amperométrica, em muitos casos, minimiza o problema da contaminação da superfície do eletrodo, uma vez que pequenos volumes da amostra são injetados (em geral na ordem de alguns  $\mu\text{L}$ ). Assim, a contaminação pode levar mais tempo para ocorrer. Além disto, a amostra não permanece em contato com o eletrodo em tempo integral (sinais transientes), o que contribui para que o eletrodo permaneça limpo por um período de tempo maior.

Este modo de detecção (amperometria a  $E_{\text{constante}}$ ) não é viável quando o objetivo é a determinação simultânea de compostos eletroativos em potenciais redox distintos. Quando a diferença de potencial envolvida entre os compostos de interesse é suficientemente grande, superior a 0,1 V [79], é possível contornar esta limitação realizando-se medidas do sinal amperométrico em dois pulsos de potenciais distintos:

1<sup>o</sup>) em  $E_1$ , somente uma das espécies é reduzida ou oxidada, sendo o sinal de corrente proporcional à concentração desta espécie eletroativa.

2<sup>o</sup>) em  $E_2$ , ambas as espécies sofrem processo de oxidação ou redução.

A diferença entre o sinal de corrente obtido em ambos os potenciais permite a quantificação da 2<sup>a</sup> espécie eletroativa. Essa medida pode ser também realizada simultaneamente utilizando-se uma célula em fluxo com dois eletrodos de trabalho (ou

sensores) em paralelo. Nesse caso, um bi-potenciostato é normalmente exigido para controlar o potencial de cada eletrodo de trabalho [80].

A Amperometria de Múltiplos Pulsos (AMP) acoplada a um sistema FIA representa uma alternativa para prevenir a contaminação do eletrodo e analisar compostos eletroativos [81, 82]. Esta técnica permite a aquisição sequencial de até 10 amperogramas vs tempo em até 10 potenciais diferentes com pulsos de curta duração (mínimo de 30 ms) usando, por exemplo, o software GPES comercializado pela empresa Metrohm - Autolab.

Conforme descrito na literatura, este tipo de detecção quando acoplada à CLAE é basicamente utilizada para manter a reprodutibilidade de sinal (constante limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo) durante uma análise cromatográfica [83, 84]. Ultimamente, este tipo de detecção também vem sendo explorada no modo gerador-coletor [85]. Este modo consiste em aplicar pulsos de potencial em sequência e monitorar simultaneamente o sinal eletroquímico da espécie analítica em um potencial, assim como de seu produto formado na reação eletroquímica em outro potencial. Além disso, pode-se ainda aplicar um terceiro E para constante limpeza eletroquímica do eletrodo. Esta técnica possibilita também a quantificação seletiva de dois compostos eletroativos presentes em uma mesma amostra [81, 82]. Um composto é diretamente detectado em um primeiro pulso de potencial (sem interferência da outra espécie). Em um segundo pulso de potencial (de maior energia), ambos os compostos presentes na amostra são oxidados e o segundo composto é detectado indiretamente (3º pulso de potencial) pela redução do produto eletroquimicamente gerado no potencial anterior (detecção seletiva da segunda espécie).

A corrente amperométrica monitorada durante a aplicação de um pulso de E é governada por dois componentes de corrente, a saber: a corrente capacitiva,  $I_C$  (referente ao carregamento da dupla camada elétrica quando um potencial é aplicado e não envolve a ocorrência de nenhuma reação química) e a corrente faradaica,  $I_F$  (referente a processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo-solução) [86]. Quando há na solução espécies que podem ser oxidadas ou reduzidas no eletrodo há a geração da  $I_F$ . Assim, numa detecção amperométrica em fluxo, quando apenas a solução carregadora inerte estiver passando através da célula eletroquímica, a magnitude de  $I_F$  dependerá da concentração de impurezas eletroativas presentes na solução, que em geral são baixas. Por outro lado, quando a zona da amostra passa através da célula eletroquímica, a magnitude de  $I_F$  é governada pela quantidade de espécie analítica que chega a superfície do detector eletroquímico.

A dependência da  $I_F$  e de  $I_C$  com o tempo de aplicação do pulso de potenciais 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 ( $I_C \propto e^{-t}$ ). Em uma solução que contém um espécie analítica eletroativa, a dependência da corrente faradaica com o tempo de aplicação do pulso depende das condições do transporte de massa do espécie analítica em direção ao eletrodo. Em condições estacionárias, a corrente faradaica diminui mais lentamente com o tempo de aplicação do pulso ( $I_F \propto t^{1/2}$ ) quando comparada com a corrente capacitiva. Já em fluxo contínuo e constante, a corrente faradaica mantém-se constante. Portanto, se a vazão da solução carregadora contendo a alíquota da amostra é mantida constante, a taxa do transporte de massa será constante, e por consequência, a magnitude da corrente faradaica dependerá somente da concentração da espécie analítica na zona de amostra que alcança o eletrodo. Considerando-se a dependência da corrente faradaica e da corrente capacitiva com o tempo de aplicação do pulso, tem-se que, quanto maior o tempo de aplicação do pulso de potencial, menor será a contribuição de  $I_C$  na corrente amperométrica total monitorada. Entretanto, deve-se ressaltar que, apesar da contribuição de  $I_C$  ser maior quando pulsos de potenciais são aplicados por curtos períodos de tempo, esta contribuição não afetará o sinal amperométrico de interesse, pois, a corrente amperométrica está sendo medida continuamente, antes, durante e após a passagem da zona da amostra. Dessa forma, a contribuição de  $I_C$  será a mesma antes, durante e após a passagem da zona da amostra, que contém a espécie analítica de interesse. Por consequência, durante a passagem da zona da amostra, monitora-se somente a contribuição da  $I_F$  (devido à espécie analítica) para o sinal amperométrico. Como a corrente faradaica depende somente da concentração da espécie analítica no fluido de solução que passa através do eletrodo, o tempo de aplicação do pulso de  $E$  governará a quantidade da espécie analítica que reagirá no eletrodo.

Levando em consideração o potencial na AMP acoplada a sistemas FIA, o desenvolvimento de novas metodologias de análise se torna vantajosa, uma vez que custo reduzido, bons resultados de reprodutibilidade, seletividade e sensibilidade, menor tempo de análise e maior simplicidade na execução da metodologia são algumas características desta detecção.

## 1.6 PARÂMETROS DE MÉRITO UTILIZADOS NA METODOLOGIA PROPOSTA

Os procedimentos analíticos são caracterizados por inúmeros parâmetros de mérito, tais como sensibilidade, limite de detecção e quantificação, dentre outros. A seguir uma breve descrição dos parâmetros [87-90] utilizados no presente trabalho.

### ➤ **Sensibilidade**

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

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

A sensibilidade depende da natureza da espécie analítica e da técnica de detecção utilizada.

### ➤ **Especificidade e Seletividade**

Uma amostra, de maneira geral, consiste nas espécies analíticas a serem medidas, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são freqüentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações.

Na prática, a seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o

grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse

### ➤ **Linearidade**

Linearidade corresponde à capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração da espécie analítica em uma dada faixa de concentração.

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

Onde:

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

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

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

O coeficiente de correlação linear (R) permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

A relação linear descrita pela equação da reta só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. Este intervalo de massas ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica.

Para definição da faixa linear de resposta necessita-se de pelo menos cinco níveis crescentes de concentração, no mínimo três análises de cada concentração, com estimativa do desvio padrão relativo inferior a 5%.

➤ **Limite de Detecção**

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

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

onde,

$s_b$  = desvio padrão relativo do branco;

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

➤ **Limite de Quantificação**

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

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

O LQ pode ser calculado multiplicando o LD por 3,33.

➤ **Repetibilidade**

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade a seguir: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo

instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local, e repetições em curto espaço de tempo.

A repetibilidade do método é verificada contemplando uma faixa de concentração dentro do intervalo linear do método e pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas. O desvio padrão relativo é calculado pela razão entre o desvio padrão das respostas analíticas pela media das medidas e o resultado multiplicado por 100.

### ➤ **Recuperação**

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

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

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

## 1.7 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi aplicar a técnica AMP acoplada a sistemas FIA para análise de espécies sem a necessidade de etapas morosas para a preparação da amostra ou modificação química/eletroquímica da superfície do eletrodo. Neste contexto, o foco do trabalho foi direcionado para espécies analíticas de interesse farmacêutico e/ou biológico:

- Determinação de dopamina na presença de altas concentrações de ácido ascórbico;
- Determinação de dopamina na presença de ácido ascórbico e ácido úrico;
- Determinação simultânea de ácido ascórbico e ácido úrico;

Diversos parâmetros foram estudados para que os objetivos fossem alcançados:

- Comportamento eletroquímico das espécies analíticas de interesse.
- Sistema FIA: vazão e volume de amostra a ser injetado.
- Detecção amperométrica: pulsos de potenciais a serem aplicados e tempos de aplicação de cada pulso.
- Seletividade e estabilidade dos métodos.

---

## **PARTE 2**

### **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

## 2.1. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de pureza analítica (Merck , Sigma-Aldrich, Synth, Vetec, Reagen) e foram utilizados sem purificação prévia.

## 2.2. SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade superior a 18  $M\Omega\text{ cm}^{-1}$ ) obtida de sistema de purificação Milli-Q.plus (Millipore).

✓ ***Solução tampão de ácido acético / acetato 0,10 mol L<sup>-1</sup>:*** a solução foi preparada a partir de 4,10 g de acetato de sódio anidro e 3,0 mL de ácido acético. Os reagentes foram transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 1000,0 mL e o volume completado com água deionizada.

✓ ***Solução de ácido sulfúrico 0,20 mol L<sup>-1</sup>:*** transferiram-se 22,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado para um balão volumétrico de 2000,0 mL e completou-se o volume com água deionizada.

✓ ***Solução de Hidróxido de Sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>:*** pesou-se 0,40 g do hidróxido de sódio e completou-se o volume de 100,0 mL de um balão volumétrico com água deionizada. Esta solução foi utilizada para fazer o estoque da solução de ácido úrico.

✓ ***Solução estoque de Dopamina 0,01 mol L<sup>-1</sup>:*** foi preparada pesando-se 0,0115 g de hidrocloreto de dopamina, transferiu-se quantitativamente a massa para um balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o volume com água deionizada para posterior diluição no tampão ou eletrólito correspondente.

✓ ***Solução estoque de ácido ascórbico 0,10 mol L<sup>-1</sup>:*** pesaram-se 0,18 g de ácido ascórbico, transferiu-se quantitativamente a massa para um balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com água deionizada para posterior diluição em solução tampão ou eletrólito correspondente.

- ✓ ***Solução estoque de ácido úrico 0,02 mol L<sup>-1</sup>***: pesou-se a massa de 0,0336 g e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com uma solução de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Posteriormente, a solução foi diluída em eletrólito ou solução tampão.
  
- ✓ ***Solução estoque da amostra de Dopamina***: Determinou-se dopamina na amostra do medicamento genérico injetável Cloridrato de Dopamina da marca Hipolabor. A solução foi preparada dissolvendo-se diretamente 385,0 µL do medicamento em um balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com água deionizada, obtendo-se assim uma solução estoque com concentração final de 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, de acordo com o rótulo. A solução posteriormente foi diluída em eletrólito.
  
- ✓ ***Amostra padrão de ácido ascórbico e ácido úrico***: uma amostra padrão contendo simultaneamente ácido ascórbico e ácido úrico foi gerada no próprio laboratório. A amostra foi preparada pesando-se 0,09 g de ácido ascórbico e 0,0168 g de AU (dissolvida em 5,00 mL de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup>), transferiu-se quantitativamente a massa de AA e a solução de AU para um balão volumétrico de 10,0 mL e completou o volume com água deionizada, obtendo-se assim uma solução de 0,50 mol L<sup>-1</sup> de AA e 0,01 mol L<sup>-1</sup> de AU. Para a análise diluiu-se quantidade adequada desta amostra em eletrólito.

## 2.3. INSTRUMENTAÇÃO

### 2.3.1 Equipamentos utilizados

Para a realização das medidas voltamétricas e amperométricas foi utilizado o equipamento Potenciostato/Galvanostato da Autolab modelo µAUTOLAB tipo III, interfaceado a um micro computador através do software GPES 4.9.

Nas medidas em fluxo, utilizou-se um sistema de controle de vazão da solução carregadora (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>) desenvolvido no próprio laboratório [91] que consiste em um mini-compressor de ar acoplado a uma coluna d'água apresentado na Figura 2.1. Um injetor manual (Cena/USP) e um detector eletroquímico (construído no próprio laboratório)

também foram utilizados. Antes da detecção analítica, eventuais bolhas de ar eram removidas por uma célula de permeação gasosa [92].

Os dados obtidos foram tratados com uso do software Origin Lab 5.0.

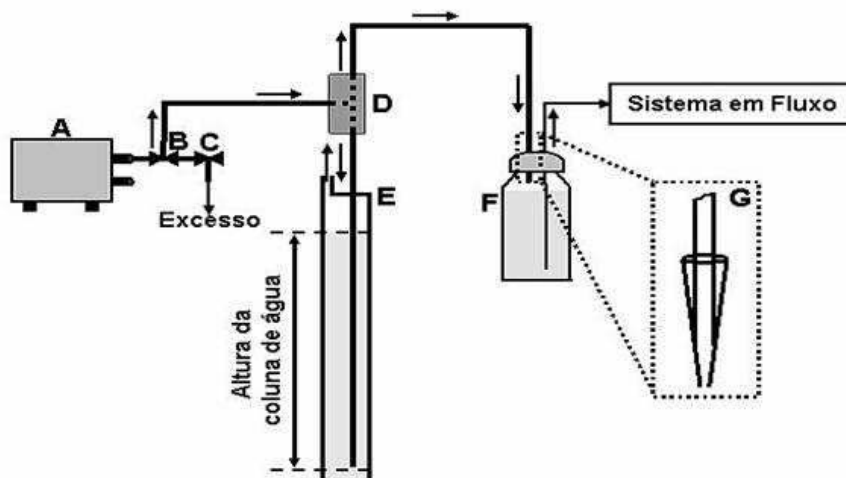


**Figura 2.1:** Esquema de montagem para utilização da pressão gerada por uma coluna de água para controle de vazão de sistemas em fluxo. (A) Mini-compressor de ar; (B, C) Válvulas usadas em aquarismo para divisão e controle de fluxo de ar; (D) Junção de acrílico tipo T; (E) Tubo de PVC – coluna de água; (F) Reservatório do carregador; (G) Vista ampliada da conexão do tubo de polietileno ao reservatório com eletrólito.

### 2.3.2 Células Eletroquímicas

Nas medidas eletroquímicas estacionárias utilizou-se uma célula eletroquímica convencional de acrílico com capacidade para 7,0 mL. Nas medidas amperométricas em fluxo utilizou-se uma célula eletroquímica do tipo “wall-jet” com três eletrodos, a qual foi construída no próprio laboratório (Figura 2.2).

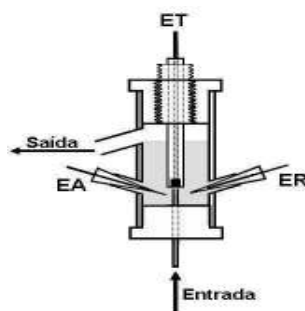


**Figura 2.2:** Célula eletroquímica de três eletrodos (tipo “wall- jet”). (EA) eletrodo auxiliar; (ER) eletrodo referência; (ET) eletrodo de trabalho.

### **2.3.3 Eletrodo de Trabalho**

Utilizou-se um eletrodo de carbono vítreo comercial adquirido da empresa Metrohm com 3,0 mm de diâmetro para as medidas voltamétricas e amperométricas.

Na limpeza deste eletrodo usou-se o polimento manual com alumina (granulometria 0,3  $\mu\text{m}$ ). O eletrodo foi lavado exaustivamente com água deionizada e posteriormente levado ao ultra-som imerso em água deionizada (~ 30 minutos) para retirada de resíduos de alumina. Como teste para análise da superfície de resposta do eletrodo, assim como para sua ativação, voltamogramas cíclicos sucessivos foram registrados em meio do eletrólito de interesse (até obtenção de estabilidade), na faixa de potencial de -0,8 a +1,5 V e velocidade de varredura 50  $\text{mV s}^{-1}$ .

### **2.3.4 Eletrodo de Referência**

Em todos os experimentos utilizou-se mini eletrodo de referência Ag/AgCl ( $\text{KCl}_{\text{sat.}}$ ) [93], preparado no próprio laboratório pela eletrodeposição de AgCl em um fio de Ag através da eletrólise de uma solução de HCl 0,10  $\text{mol L}^{-1}$ , sob corrente constante de 0,2 mA, durante 2 h, utilizando o Potenciostato/Galvanostato da Autolab modelo  $\mu\text{AUTOLAB}$  tipo III.

### **2.3.5 Eletrodo Auxiliar**

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

## **2.4. METODOLOGIA**

### **2.4.1 Voltametria cíclica**

#### **2.4.1.1 Comportamento eletroquímico da Dopamina, Ácido Ascórbico e Ácido Úrico**

A técnica de voltametria cíclica foi empregada para o estudo preliminar do comportamento eletroquímico da Dopamina (DA), Ácido Ascórbico (AA) e Ácido Úrico (AU). A varredura foi registrada na faixa de trabalho de -0,2 a 1,0 V *vs* Ag/AgCl sobre eletrodo de carbono vítreo com velocidade de varredura de 50  $\text{mV s}^{-1}$  em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$

0,20 mol L<sup>-1</sup>, vide item 2.2. Um estudo do comportamento de cada espécie analítica também foi realizado com diferentes velocidades de varreduras, com taxa de variação de 10, 20, 50, 100, 200 e 500 mV s<sup>-1</sup>.

#### **2.4.2 Amperometria de múltiplos pulsos acoplada ao sistema FIA para determinação de dopamina na presença de altas concentrações de ácido ascórbico**

##### **2.4.2.1 Estudo da interferência do AA na análise de DA em tampão acetato 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,7)**

Para estes estudos, soluções contendo apenas DA ou apenas AA ou simultaneamente DA e AA (90,0 µmol L<sup>-1</sup> de cada espécie analítica) foram injetadas em duplicata. Utilizou-se como eletrólito suporte o tampão ácido acético/acetato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, uma vazão de 2,0 mL min<sup>-1</sup>, alça de amostragem de 150 µL e eletrodo de trabalho de carbono vítreo.

##### **2.4.2.2 Estudo para otimização dos pulsos potenciais a serem utilizados para detecção de DA na presença de AA por FIA com detecção AMP**

Tomando-se como base os resultados obtidos usando voltametria cíclica e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito para as espécies analíticas DA e AA, um estudo foi realizado para a escolha do melhor tempo de aplicação do pulso de potencial de oxidação. Este estudo foi realizado fixando o potencial para oxidação e variando o tempo de aplicação do mesmo utilizando CV como eletrodo de trabalho. Uma solução contendo 10,0 µmol L<sup>-1</sup> de DA, foi usada nestes estudos. O estudo do tempo foi feita na faixa entre 300 e 800ms.

Outro estudo realizado foi com o intuito de verificar o melhor potencial para redução para análise indireta de DA usando uma solução contendo 10,0 µmol L<sup>-1</sup> do composto. Neste estudo, foi utilizado o pulso de potencial referente a oxidação da DA e o tempo de aplicação otimizado no estudo anterior. O tempo de aplicação deste pulso (redução) foi de 30 ms, pois a intenção era de obter a melhor sensibilidade possível.

Para estes estudos utilizou-se a técnica AMP acoplada ao sistema FIA, com alça de amostragem de 300 µL e vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup> (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>). O sistema FIA utilizado

em todos os estudos foi de linha única com tubos de polietileno de 0,5 ou 1,0 mm de diâmetro interno. O sistema de análise em fluxo utilizado durante os experimentos é mostrado na Figura 2.3.

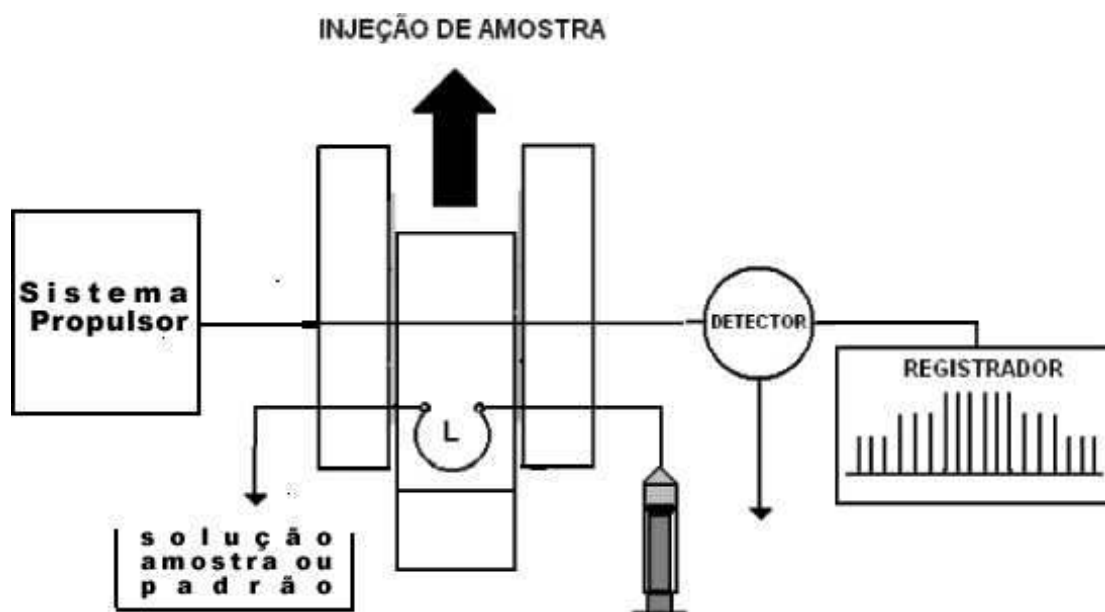


**Figura 2.3:** Esquema do sistema FIA empregado nos estudos.

#### **2.4.2.3 Otimização dos parâmetros hidrodinâmicos**

Os parâmetros hidrodinâmicos analisados foram: volume injetado e vazão da solução transportadora. Em ambos os parâmetros, analisou-se a intensidade da corrente obtida na redução de uma solução contendo  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DA em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , detectada no potencial para redução otimizado no item 2.4.2.2..

#### **2.4.2.4 Análise da Seletividade da Técnica AMP acoplada ao sistema FIA para análise de DA na presença de AA**

Após a otimização dos parâmetros hidrodinâmicos e potenciais de oxidação e redução, assim como os respectivos tempos de aplicação, uma serie de injeções em duplicata de soluções contendo somente DA, somente AA e simultaneamente DA e AA ( $0,1$  e  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente), foram injetadas no sistema FIA com objetivo de verificar a seletividade do método proposto e a possibilidade da determinação de DA na presença de altas concentrações de AA ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

#### **2.2.4.5 Estudos de repetibilidade do método e interferência de AA na análise de DA**

Para avaliar a repetibilidade do método, uma série de 24 injeções sucessivas de soluções contendo 1,0 e 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de AA e DA, respectivamente, foram realizadas usando as condições otimizadas anteriormente. O desvio padrão relativo foi calculado dividindo-se o desvio padrão absoluto pela média dos valores das medidas de intensidade de corrente e o resultado multiplicado por 100.

Para avaliar a concentração máxima de AA que pode estar presente em solução para que a análise seletiva de DA continue sendo possível, partiu-se de uma solução de 100,0 µmol L<sup>-1</sup> de dopamina e soluções crescentes de AA (0,25 a 16,0 mmol L<sup>-1</sup>) em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 mol L<sup>-1</sup>.

#### **2.4.2.6 Estudos de quantificação, recuperação e limite de detecção para Dopamina em amostras farmacêuticas**

A potencialidade do método para análise de dopamina foi avaliada, inicialmente, com uma curva de calibração com soluções de concentrações crescentes (n = 3) de DA (1,0-100,0 µmol L<sup>-1</sup>) contendo 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de AA usando os parâmetros otimizados anteriormente. Uma amostra de um fármaco contendo cloridrato de Dopamina foi analisada usando a curva analítica gerada a partir dos dados deste experimento. Estudos de adição/recuperação também foram realizados. O cálculo do limite de detecção (LD) foi efetuado multiplicando o desvio padrão do branco (n = 10) por três e então dividindo o resultado pelo coeficiente angular da curva de calibração [79]. O limite de quantificação (LQ) foi obtido multiplicando o LD por 3,33 [79].

#### **2.4.3 Amperometria de Múltiplos Pulsos acoplada ao sistema FIA para determinação de Dopamina na presença de AA e AU.**

##### **2.4.3.1 Estudo da I<sub>red</sub> para DA e da I<sub>red</sub> para o AU aplicando-se diferentes potenciais de oxidação.**

Estes estudos foram realizados com a injeção de soluções contendo ora 100,0 µmol L<sup>-1</sup> de DA e ora 2,0 mmol L<sup>-1</sup> de AU. Os pulsos de potenciais de oxidação foram avaliados na

faixa entre 0,50 e 0,80 V (700 ms). A corrente de redução foi adquirida no pulso de potencial de 0,35 V (30 ms). O objetivo para este estudo é identificar, em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , um potencial capaz de oxidar a DA sem promover a oxidação do AU. Desta forma, também poder quantificar DA na presença de AU. O potencial usado para este fim na presença de somente AA (0,80 V) também promove a oxidação do AU e o produto gerado também apresenta um sinal de redução em 0,35 V.

O tempo de aplicação do pulso de potencial para oxidação de DA na presença de AA e AU selecionado anteriormente também foi objeto de estudo, com o objetivo de obter um maior sinal analítico (melhor sensibilidade). Os tempos estudados variaram de 100 a 700ms. Os parâmetros hidrodinâmicos utilizados foram os mesmos otimizados para determinação de DA na presença de altas concentrações de AA.

#### **2.4.3.2 Seletividade da Técnica AMP acoplada ao sistema FIA para determinação de DA na presença de AA e AU**

Para demonstrar a potencialidade da técnica, uma série de injeções (em triplicatas) de soluções contendo: (a) 0,1 mmol  $\text{L}^{-1}$  de DA; (b) 1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$  de AA; (c) 0,5 mmol  $\text{L}^{-1}$  de AU e (d) as três espécies analíticas nas mesmas concentrações citadas anteriormente foram realizadas com objetivo de verificar a seletividade do método proposto e a consequente possibilidade da determinação de DA na presença de AA e AU.

#### **2.4.3.3 Estudo da repetibilidade do método**

Para avaliar a repetibilidade do método, uma série de 15 injeções consecutivas de soluções contendo simultaneamente 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DA, 1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$  de AA e 0,5 mmol  $\text{L}^{-1}$  de AU foram injetadas e avaliadas usando os pulsos de potenciais otimizados anteriormente. O desvio padrão relativo foi calculado dividindo-se o desvio padrão absoluto pela média dos valores das medidas de intensidade de corrente e o resultado multiplicado por 100.

#### **2.4.3.4 Curva analítica para quantificação de DA na presença de AA e AU**

A curva analítica foi obtida a partir de injeções, em triplicata, no sistema FIA, de soluções de concentrações crescentes de DA (1,0-100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de 1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$  de AA e 0,5 mmol  $\text{L}^{-1}$  de AU.

#### **2.4.4 Amperometria de Múltiplos Pulsos acoplada ao sistema FIA para determinação simultânea de AA e AU.**

Analisando os voltamogramas obtidos para uma solução contendo separadamente AA e AU em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ , apresentados no item 2.4.1.1, foram realizado estudos para definição dos pulsos de potencial a serem utilizados para quantificação simultânea AA e AU usando FIA com detecção por AMP. Os pulsos de potenciais estudados foram: 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e  $1,0 \text{ V}$  (por  $100 \text{ ms}$  cada). Neste estudo, soluções contendo ora  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  AA e ora  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AU foram injetadas a uma vazão  $2,2 \text{ mL min}^{-1}$ .

Outro estudo foi realizado com o objetivo de definir o potencial onde há redução para o produto de oxidação gerado a partir do AU (detecção indireta). Neste caso, o potencial de oxidação otimizado anteriormente foi mantido constante e o potencial de redução com tempo de aplicação de  $30 \text{ ms}$  (melhor sensibilidade) foi estudado em uma faixa pré-definida ( $+0,5$ ;  $+0,4$ ;  $+0,3$ ;  $+0,2$ ;  $+0,1 \text{ V}$ ).

##### **2.4.4.1 Avaliação dos parâmetros hidrodinâmicos**

Neste estudo parâmetros como volume injetado e vazão da solução carregadora foram avaliados. Os volumes relacionados neste estudo foram:  $50$ ,  $100$ ,  $200$ ,  $300$  e  $400 \mu\text{L}$ . As vazões estudadas foram as seguintes:  $0,5$ ,  $1,0$ ,  $2,0$  e  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Nestes experimentos, soluções de  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA e  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AU foram injetadas separadamente.

##### **2.4.4.2 Seletividade da Técnica AMP acoplada ao Sistema FIA para determinação de AA e AU simultaneamente**

Após as otimizações dos pulsos de potenciais (oxidação e redução) e demais parâmetros (vazão e volume injetado), um estudo para evidenciar a seletividade do método para análise simultânea de AA e AU foi realizado. Para tanto, uma série de soluções em triplicatas foram injetadas contendo, respectivamente,  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AU,  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA e uma solução contendo ambas as espécies analíticas na mesma concentração das soluções individuais.

A fim de avaliar a repetibilidade do método proposto, uma série de  $21$  injeções consecutivas de uma solução contendo simultaneamente  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AU e  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA foram injetadas no sistema FIA. Para este estudo calculou-se o desvio padrão

relativo dividindo-se o desvio padrão absoluto pela média dos valores das medidas de intensidade de corrente e o resultado multiplicado por 100.

Outro estudo realizado foi com intuito de verificar a probabilidade de interferência de AA na análise do AU, assim como a interferência de AU nas análises de AA. Para tanto, fixou-se a concentração de AA em  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e variou-se a concentração de AU ( $100,0$ ;  $200,0$ ;  $400,0$  e  $800,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). O inverso também foi feito, ou seja, fixou-se a concentração de AU em  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e variou-se a concentração de AA ( $100,0$ ;  $200,0$ ;  $400,0$  e  $800,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

#### **2.4.4.3 Estudos de quantificação, recuperação e limite de detecção para AA e AU em amostras padrão**

Para estes estudos partiu-se de uma curva analítica com injeções em triplicatas de soluções contendo AA e AU nas seguintes razões de concentração (todas em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) respectivamente: 100/50; 150/75; 200/100; 250/125; 300/150. Em seguida foram injetadas 3 amostras padrão contendo simultaneamente AA e AU nas seguintes razões de concentração (todas em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), respectivamente: 110/110; 110/55; 220/55. A equação da reta calculada a partir da curva analítica foi utilizada para determinar a concentração presente nas amostras padrão. O cálculo do LD e LQ foi realizado de acordo com o citado no item 2.4.2.6.

---

## PARTE 3

# RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 ESTUDOS PARA DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA NA PRESENÇA DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Conforme já descrito na literatura [24], a DA pode ser quantificada seletivamente usando uma célula de camada delgada com dois eletrodos de trabalho. A DA é oxidada no primeiro eletrodo e quantificada no segundo através da redução do produto gerado na etapa de oxidação. Porém, na presença de AA ocorre uma reação química (oxi-redução) entre o AA e o produto de oxidação da DA (*o*-dopaminoquinona), causando um desvio negativo na curva de analítica, impedindo a quantificação da DA. O mecanismo da oxidação eletroquímica do AA e da DA, assim como, a reação química entre o AA e a *o*-dopaminoquinona (*o*-DQ) gerada eletroquimicamente estão apresentados na Figura 3.1.

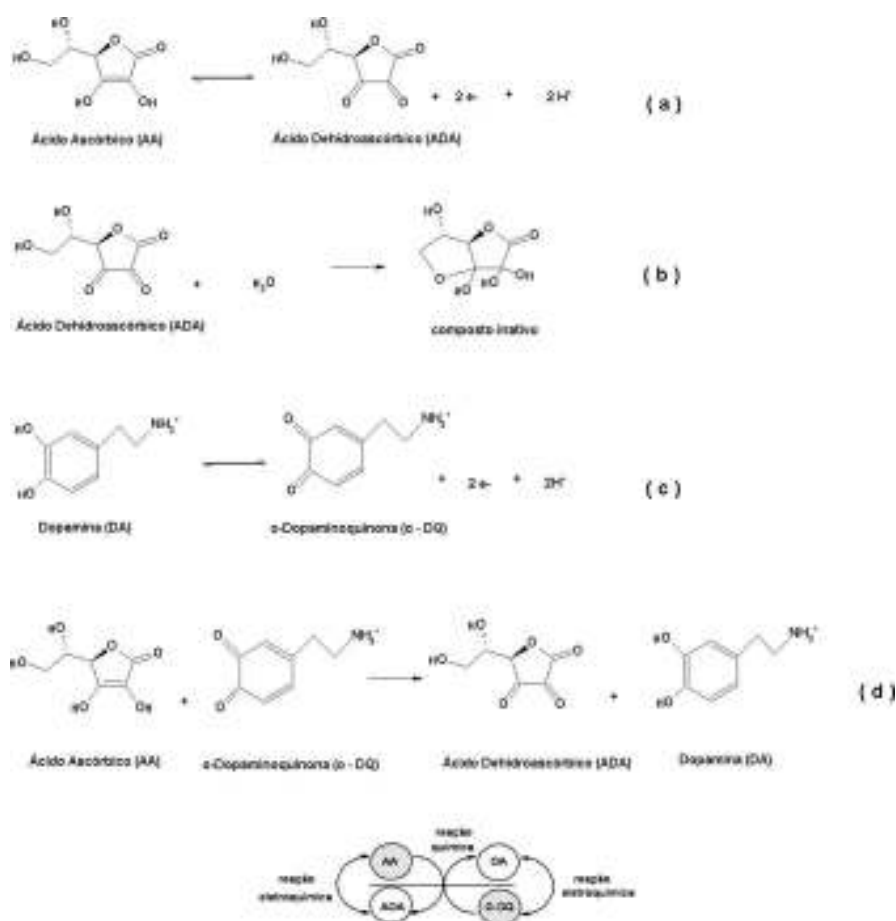


**Figura 3.1:** Mecanismo da oxidação eletroquímica da DA e do AA e a reação química entre o AA e a *o*-DQ e entre o AA e a água.

Um fenômeno parecido ao descrito acima já foi relatado na literatura [94], onde há a demonstração que existe um desvio significativo do comportamento ideal da curva de calibração catódica quando o catecol é quantificado pela redução do dehidrocatecol eletroquimicamente gerado no primeiro eletrodo (célula de camada delgada com dois eletrodos). Segundo este trabalho, o fenômeno ocorre devido à reação química entre dehidrocatecol (gerado eletroquimicamente) e ascorbato presente em solução (interferente).

Segundo a literatura pode-se usar meio ácido [94] ou a adição de um nucleófilo [24, 95] a fim de minimizar a reação entre o ascorbato e a *o*-DQ. Avaliando as alternativas disponíveis, a que parece ser mais simples e acessível financeiramente é a utilização de uma solução ácida, uma vez que está disponível em um laboratório químico comum e ser de custo reduzido.

### 3.1.1 Comportamento eletroquímico da dopamina e do ácido ascórbico em meio de ácido sulfúrico 0,20 mol L<sup>-1</sup>

O comportamento eletroquímico da DA e do AA sobre eletrodo de carbono vítreo foi estudado por voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos referentes a estes dois compostos em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup> são apresentados na Figura 3.2.

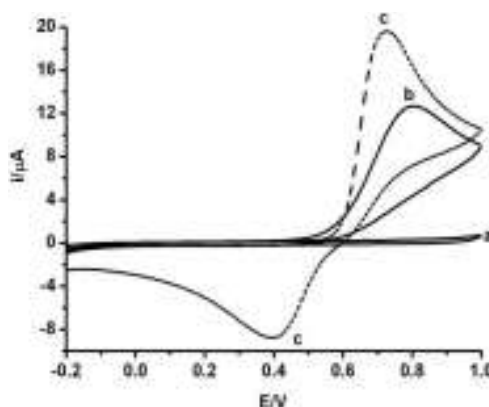


**Figura 3.2:** Voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup> sem (a) e com a adição de (b) 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de AA ou (c) 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de DA. ET: CV; Faixa de trabalho: -0,2 V a 1,0 V *vs* Ag/AgCl;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Observa-se pelos voltamogramas da Figura 3.2 que as respostas voltamétricas da DA e do AA estão bem definidas. Podemos observar que para a DA há dois picos: um em aproximadamente +700 mV referente à sua oxidação e outro em +400 mV referente à redução

do produto gerado na etapa de oxidação (*o*-DQ). Com AA observa-se apenas um pico de oxidação em torno de +800 mV.

Segundo a literatura [96], a oxidação eletroquímica da DA ocorre em solução aquosa com um processo de transferência de dois elétrons, formando inicialmente *o*-dopaminoquinona (*o*-DQ). Em sequência, a amina é desprotonada, podendo ocorrer a reação de ciclização, formando a leucodopaminocromo (LDC). Estas espécies são mais facilmente oxidadas que DA e podem oxidar-se com uma etapa que envolve a transferência de dois elétrons para dopaminocromo (DC).

O mecanismo do comportamento eletroquímico da DA é apresentado na Figura 3.3, onde estão resumidas as etapas eletroquímicas e químicas citadas acima.

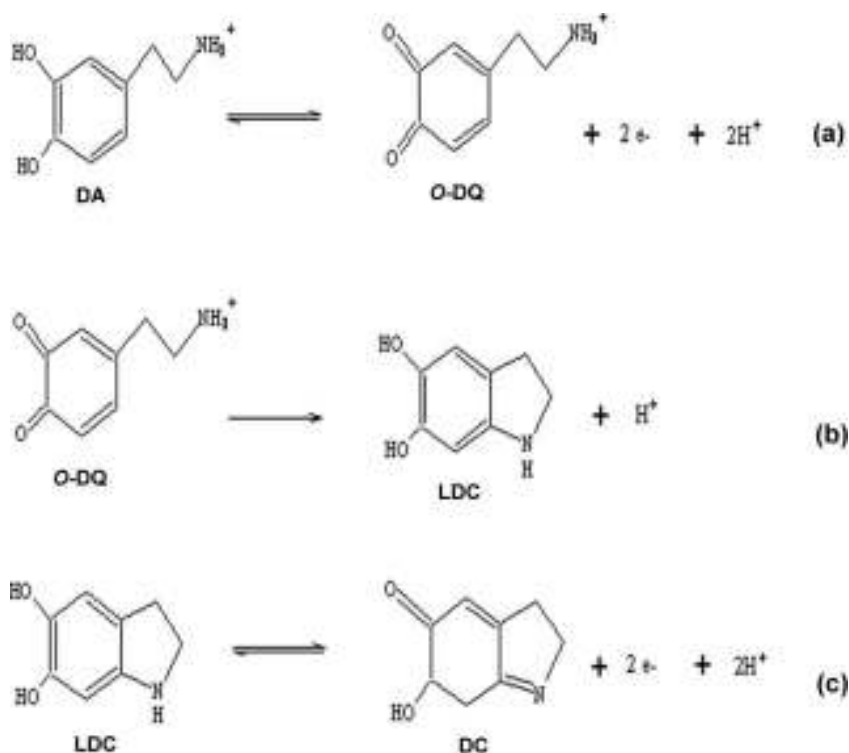


**Figura 3.3:** Mecanismo das etapas eletroquímicas e possíveis etapas químicas para a reação de oxidação da DA.

Pelo voltamograma apresentado na Figura 3.2 não é possível observar os dois processos de oxidação da DA descritos pelo esquema da Figura 3.3: o processo representado pelo mecanismo da oxidação da dopamina a *o*-dopaminoquinona (Figura 3.3 a) e o processo representado pelo mecanismo da oxidação da leucodopaminocromo a dopaminocromo (Figura 3.3 c), pois o potencial eletroquímico de todas as etapas depende da concentração de íons H<sup>+</sup> presente na solução. Analisando a equação (a) observa-se que na oxidação da dopamina a *o*-DQ há a liberação de dois elétrons e dois íons H<sup>+</sup>. Levando em consideração o princípio de Lê

Chatelier [97], este processo é difícil de ocorrer em meio ácido onde o equilíbrio é deslocado no sentido desfavorável a oxidação da DA. No entanto, o esquema representado pela oxidação da dopamina a *o*-dopaminoquinona pode ser visualizado no voltamograma apresentado na Fig. 3.2. Já o segundo processo de oxidação, devido ao meio fortemente ácido, não ocorre neste meio. Os processos de oxidação da dopamina e da leucodopaminocromo podem ser visualizados por exemplo, quando se trabalha em meio de tampão acetato (pH 4,7).

A oxidação anódica do AA é conhecido por ser um processo irreversível, com a transferência de 2 elétrons [98]. O AA é oxidado a ácido dehidroascórbico (ADA) e os grupos carbonílicos deste ácido podem hidratar-se gerando um composto eletricamente inativo. As etapas deste processo estão descritas na Figura 3.4.

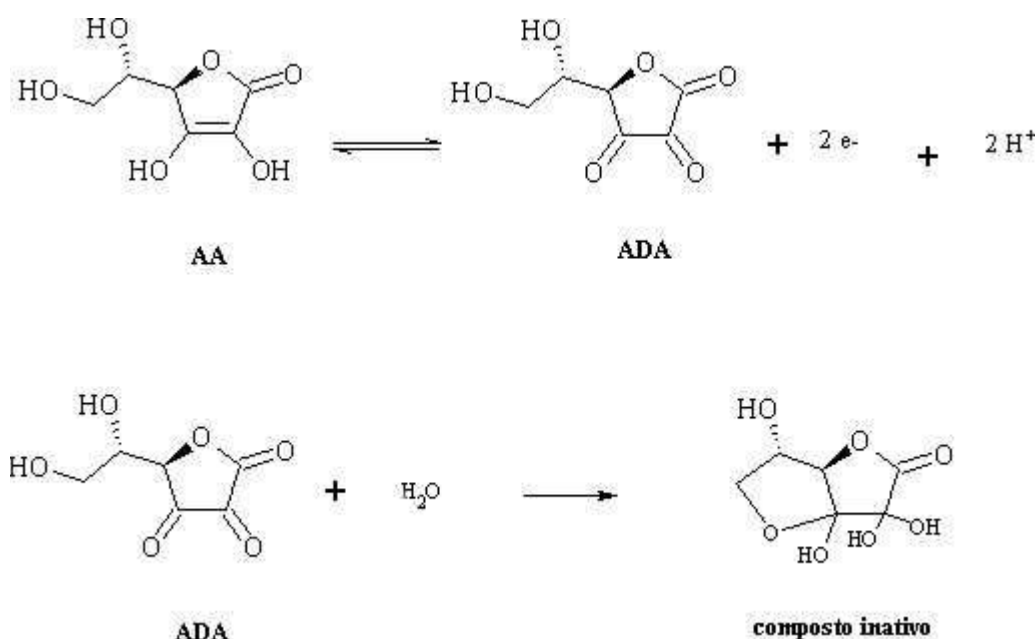


**Figura 3.4:** Mecanismo de oxidação eletroquímica do AA e da reação química entre o ADA e a água.

### 3.1.2 Estudo da variação da velocidade de varredura da Dopamina por Voltametria Cíclica

Um estudo relacionado à variação de velocidade de varredura para a DA foi realizado no intervalo de 10 a 500  $\text{mV s}^{-1}$ . Os voltamogramas cíclicos deste estudo estão apresentados na Figura 3.5. Analisando os resultados observa-se que com o aumento da velocidade de varredura, ocorre um aumento na intensidade de corrente, de acordo com a Tabela 3.1

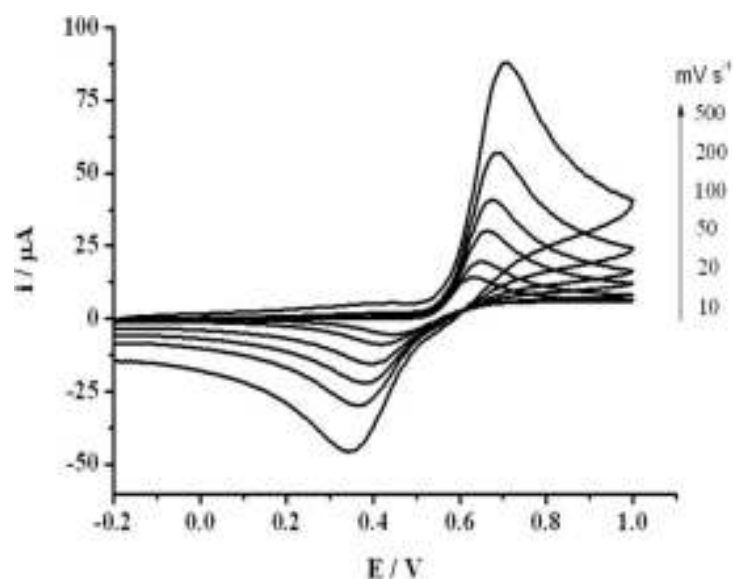


**Figura 3.5:** Efeito da velocidade de varredura usando VC para DA 1,0 mmol L<sup>-1</sup> sobre ECV em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>.

**Tabela 3.1:** Valores de corrente anódica (I<sub>a</sub>) e catódica (I<sub>c</sub>) e potencial de pico anódico (E<sub>a</sub>) e catódico (E<sub>c</sub>) para DA em diferentes velocidades de varredura (v).

| v (mVs <sup>-1</sup> ) | I <sub>a</sub> /μA | E <sub>a</sub> /mV | I <sub>c</sub> /μA | E <sub>c</sub> /mV |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 10                     | 14,3               | 630                | -5,3               | 450                |
| 20                     | 19,7               | 649                | -8,7               | 420                |
| 50                     | 30,2               | 664                | -15,4              | 396                |
| 100                    | 40,7               | 679                | -22,0              | 380                |
| 200                    | 56,8               | 694                | -29,7              | 366                |
| 500                    | 88,0               | 708                | -45,4              | 347                |

De acordo com a equação de Randles-Sevcik [63] (eq. 1), quando há uma relação linear entre as correntes de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura, o processo eletroquímico é preferencialmente controlada por difusão. Os outros termos da equação são constantes.

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

**Equação 1**

Onde,

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

$n$  – número de elétrons envolvidos na reação redox.

$A$  – área do eletrodo

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

$C_0$  – concentração das espécies eletroativas

$v$  – velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ )

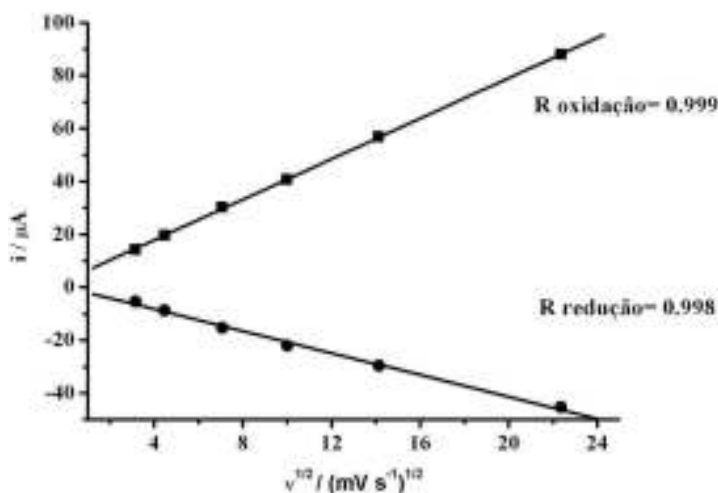


**Figura 3.6:** Dependência linear das correntes de pico ( $\mu\text{A}$ ) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ )<sup>1/2</sup> para: [■] pico de oxidação da DA e [●] pico de redução da DA.

Analisando o gráfico da Figura 3.6, obtido a partir dos voltamogramas da Figura 3.5, podemos observar que há uma linearidade entre as duas variáveis descritas no gráfico. Isto indica que a transferência de massa no processo de oxidação da DA em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20  $\text{mol L}^{-1}$  é preferencialmente controlado por difusão.

### 3.1.3 Uso da detecção amperométrica acoplada a FIA para análise de DA

Para detecção de DA na presença de altas concentrações de AA (1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ), o uso da técnica de amperometria convencional (medida de corrente com a aplicação de um  $E$  constante) não é eficaz, pois conforme voltamogramas apresentados da Figura 3.2, há uma sobreposição dos potenciais de oxidação da DA e AA, impossibilitando a análise seletiva de DA. A alternativa proposta neste trabalho é usar a técnica amperometria de múltiplos pulsos (AMP) para a determinação indireta de DA na presença de altas concentrações de AA. Esta técnica permite a aplicação de pulsos de potenciais rápidos e sequenciais, podendo, desta forma, operar de forma semelhante a um sistema gerador-coletor, conforme descrito na literatura [80-82].

### 3.1.3.1 Escolha do potencial de oxidação da DA

Para obtenção da melhor sensibilidade na análise de DA, o pulso de potencial a ser selecionado (oxidação) deve estar localizado na região de potencial onde ocorre a taxa máxima de conversão de DA em *o*-DQ. Conforme apresentado na Figura 3.2, a DA gera um pico de oxidação próximo a +700 mV *vs* Ag/AgCl. Portanto, o pulso de potencial correspondente a +800 mV foi adotado para a oxidação da DA. Vale lembrar que neste potencial também ocorre a oxidação do AA.

### 3.1.3.2 Estudo para definição do tempo de aplicação do pulso de potencial para oxidação da DA (geração da *o*-DQ)

Conforme já descrito na literatura, a dependência de corrente faradaica e da corrente amperométrica com o tempo de aplicação do pulso de potencial é diferente. Considerando isto, um estudo do tempo de aplicação do potencial de oxidação da dopamina (+800 mV) foi avaliado.

Na Figura 3.7 encontra-se o gráfico de intensidade de corrente de oxidação para uma solução de 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DA em função do tempo de aplicação do pulso de potencial (+800 mV).

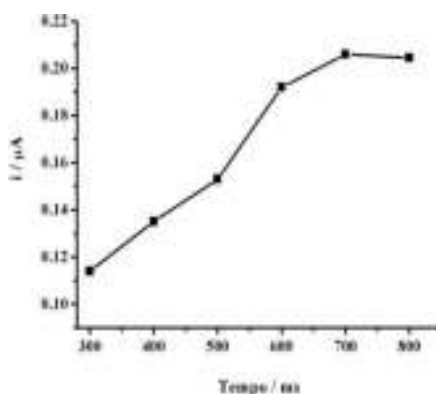


**Figura 3.7:** Intensidade de corrente obtida da injeção de 300 $\mu\text{L}$  de solução de dopamina 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em função do tempo de aplicação do pulso de potencial de oxidação da dopamina. Eletrólito suporte:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20  $\text{mol L}^{-1}$ , vazão: 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ .

A corrente de oxidação da DA aumenta com o tempo de duração do pulso de potencial estabilizando para tempos superiores a 700 ms. Portanto o tempo de aplicação de 700 ms para o pulso de potencial de oxidação da DA foi adotado. Apesar de estudos demonstrarem que o

fenômeno de oxidação da DA é controlado preferencialmente por difusão, um provável fenômeno de adsorção deve estar presente.

### 3.1.3.3 Escolha do potencial de redução para o produto de oxidação da DA

Considerando o fato de que a detecção da DA será monitorada de forma indireta, uma avaliação do melhor potencial de redução também se faz necessário. A Figura 3.8 apresenta o gráfico do potencial de redução em função da intensidade de corrente. Cabe ressaltar que neste estudo, dois pulsos de potenciais foram aplicados: o pulso  $E_1$  de +800 mV/700 ms para oxidar a DA e um segundo pulso,  $E_2$ , para redução do produto formado. Os valores de  $E_2$  avaliados foram: +0,10; +0,15; +0,20; +0,25; +0,30; +0,35; +0,40 e +0,45 V. A aplicação destes pulsos foi realizada por um tempo de 30 ms devido ao produto gerado na oxidação ser consumido e/ou removido da interface eletrodo/solução em função do tempo. Tempos menores não foram estudados devido à limitação do equipamento.

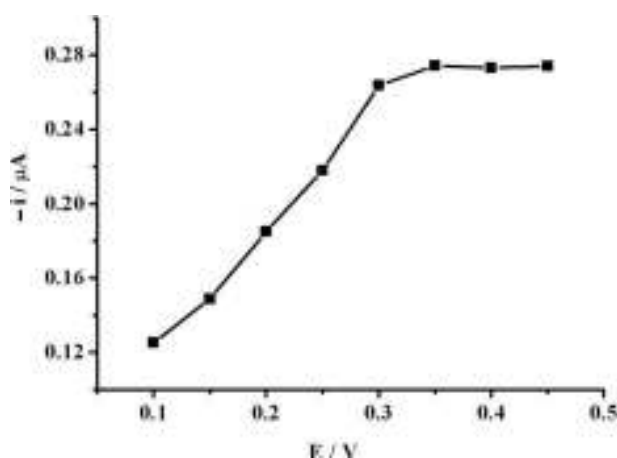


**Figura 3.8:** Intensidade dos sinais de corrente de redução em função do potencial aplicado durante 30 ms para uma solução de dopamina  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito suporte:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ; vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

Pelo gráfico da Figura 3.8 observa-se que em potenciais mais positivos a partir de +0,35 V, a intensidade da corrente de redução é máxima. O potencial de +0,35 V foi utilizado para determinar a DA no modo gerador-coletor. Não temos explicação teórica do motivo da corrente de redução diminuir em potenciais menos positivos que +0,30 V.

### 3.1.3.4 Investigação da sensibilidade obtida na detecção AMP para análise de DA em função da vazão da solução carregadora e do volume injetado

Inicialmente, estudos foram realizados para verificar o efeito da vazão da solução carregadora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ) sobre as intensidades dos sinais transientes obtidos usando FIA com detecção AMP. Neste experimento, os dois pulsos de potenciais otimizados anteriormente foram utilizados:  $+0,80 \text{ V}/700\text{ms}$  e  $+0,35 \text{ V}/30\text{ms}$ . A Figura 3.9 mostra os respectivos sinais obtidos no pulso de potencial de  $+0,35 \text{ V}/30\text{ms}$  com solução de  $10,00 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DA obtidos usando o sistema FIA de linha única com alça de amostragem fixada em  $300 \mu\text{L}$ .

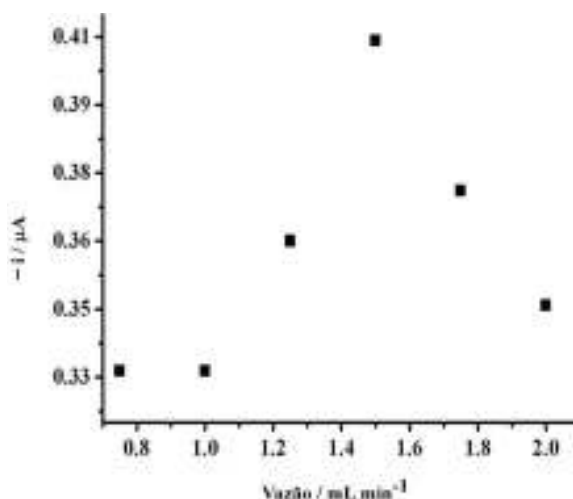


**Figura 3.9:** Intensidade dos sinais de corrente de redução em função da vazão da solução carregadora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ), no pulso de potencial  $+0,35\text{V} / 30\text{ms}$ . Alça de amostragem =  $300\mu\text{L}$ . Solução de dopamina =  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Os resultados apresentados na Figura 3.9 indicam que o sinal adquirido (redução da *o*-DQ) vai aumentando com a vazão da solução carregadora até  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Inicialmente, a corrente vai aumentando devido ao aumento gradativo da quantidade da espécie gerada no potencial de oxidação. Com vazões superiores, o sinal analítico decresce devido à remoção da espécie eletroquimicamente gerada na proximidade (nanômetros) do eletrodo se tornar mais rápida do que a detecção no potencial coletor. A vazão de  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$  foi a que apresentou melhor sensibilidade para detecção de DA em sistema FIA com detecção por AMP.

Estudou-se também a dependência dos sinais amperométricos no pulso de potencial de redução (+0,35V/30ms) em função do volume de amostra injetado. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.10 ( $DA = 10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

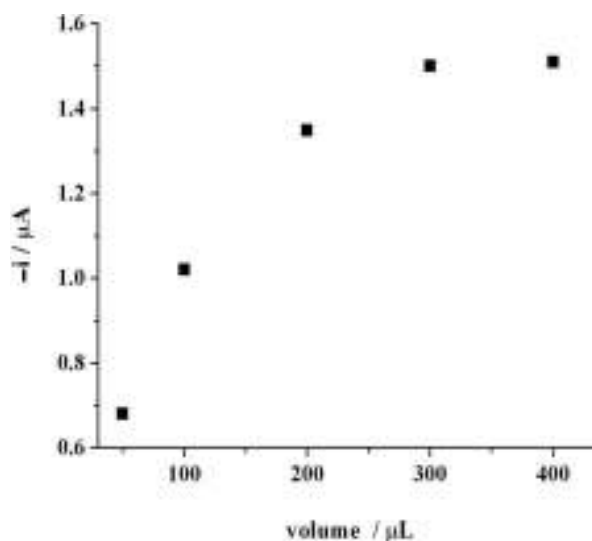


**Figura 3.10:** Intensidade do sinal amperométrico em função do volume da amostra injetada no sistema FIA em +0,35 / 30ms. Vazão ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ):  $1,50 \text{ mL min}^{-1}$ . Solução de DA:  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Observa-se pelos dados da Figura 3.10, que a intensidade do sinal amperométrico aumenta para alíquotas injetadas de até  $300 \mu\text{L}$ . Com volumes maiores, o sinal amperométrico mantém-se constante. Isto se deve ao fato de a dispersão (diluição) da amostra, que ocorre no percurso entre o ponto da injeção da amostra e o detector eletroquímico, não atingir o centro da zona da amostra a partir deste volume. Portanto, o volume de amostra a ser injetado no sistema FIA com detecção por AMP foi de  $300 \mu\text{L}$ .

### 3.1.3.5 Uso da técnica AMP acoplada ao sistema FIA para análise de DA na presença de altas concentrações de AA

Um estudo foi efetuado para demonstrar o fenômeno da interação química entre o AA e a *o*-DQ eletroquimicamente gerada a partir de soluções contendo DA em meio de tampão acetato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,7). A Figura 3.11 apresenta uma série de injeções no sistema FIA com detecção amperométrica com aplicação de três pulsos de potenciais (+0,7V / 100ms; -0,09V / 30ms e -0,15V / 500ms) de soluções contendo (a) DA, (b) AA e (c) DA e AA.

Como pode ser observado, a reação química entre o AA e o produto de oxidação da DA (*o*-DQ) gera uma diminuição acentuada no sinal de redução deste composto. Isto pode ser observado pelos sinais adquiridos com solução contendo somente DA (Figura 3.11 A<sub>1</sub>a) em comparação aos sinais obtidos para a solução contendo DA e AA (Figura 3.11 A<sub>1</sub>c).

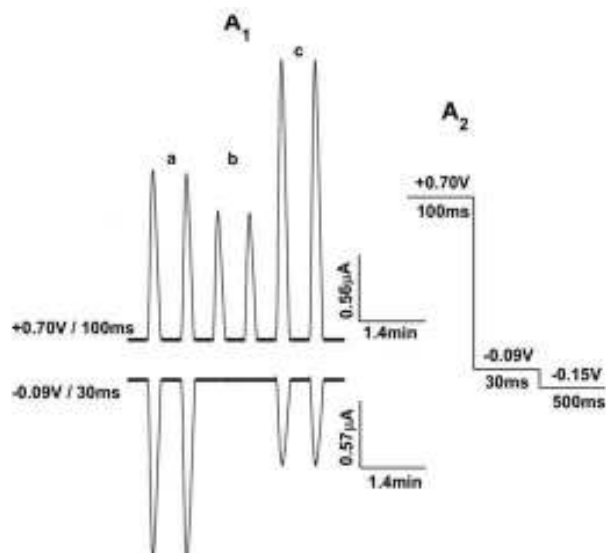


**Figura 3.11:** (A<sub>1</sub>) Amperogramas de múltiplos pulsos para injeções de soluções contendo 90,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AA (a), 90,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DA (b) e uma mistura de ambas as espécies analíticas na mesma concentração anterior (c), em meio tampão ácido acético/acetato 0,10  $\text{mol L}^{-1}$ . Eletrodo: CV; Vazão: 2,0  $\text{mL min}^{-1}$ ; Volume injetado: 150,0  $\mu\text{L}$ ; (A<sub>2</sub>) Escada de potenciais aplicados.

Para verificar a potencialidade da solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20  $\text{mol L}^{-1}$  na determinação de DA na presença de altas concentrações de AA, injeções em duplicata de 3 soluções contendo (a) DA, (b) AA e (c) DA e AA também foram realizadas. A Figura 3.12 mostra os amperogramas obtidos com aplicação de três pulsos de potenciais (+0,80V / 700ms; +0,35V / 30ms e 0,0V / 500ms).

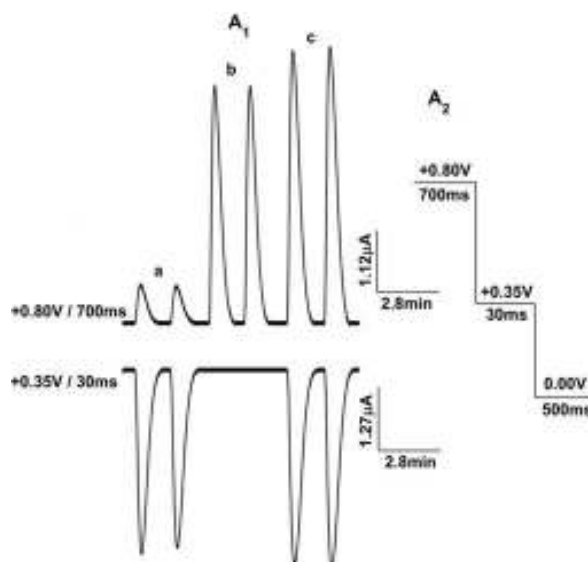


**Figura 3.12:** (A<sub>1</sub>) Amperogramas de múltiplos pulsos com injeção de soluções em duplicata contendo 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DA (a), 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de AA (b) e mistura de ambas as espécies analíticas nas mesmas concentrações de a e b (c). O amperograma de 0,0V / 500ms não foi apresentado. (A<sub>2</sub>) Escada de aplicação dos pulsos de potenciais. Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20  $\text{mol L}^{-1}$ . Vazão: 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Volume injetado: 300 $\mu\text{L}$ . Eletrodo: CV.

Observando-se a Figura 3.12, dois pontos importantes podem ser observados. O primeiro é que a cinética da reação entre o produto da oxidação da DA e o AA diminuiu significativamente em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0, 20  $\text{mol L}^{-1}$ , em relação às intensidades de corrente. Isto pode ser observado analisando os dados obtidos no pulso de potencial de +0,35V/30ms na injeção de uma solução contendo somente DA (a) em comparação à injeção de uma solução contendo DA e AA (c). Estes resultados diferem aos obtidos quando o eletrólito usado foi o tampão acetato 0,10  $\text{mol L}^{-1}$  (Figura 3.11) onde houve significativa interação entre a o-DQ (eletroquimicamente gerada) e o AA presente na solução (desvio negativo). É necessário ressaltar ainda que a concentração de AA em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  é 11 vezes maior que a concentração usada em meio de tampão acetato.

O segundo ponto importante é que se pode determinar seletivamente DA na presença de AA em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Fig. 3.12A<sub>1</sub>b). A alternativa consiste em aplicar, portanto, três pulsos de potenciais continuamente em função do tempo:

- (a) +0,80 V / 700 ms: ambas as espécies (AA e DA) são oxidadas gerando ácido dehidroascórbico (que reage com a água formando um composto eletroinativo – Figura 3.4) e *o*-dopaminoquinona (*o*-DQ).

- (b) +0,35V / 30 ms: quantificação indireta de DA através da redução de seu produto de oxidação (*o*-DQ) gerado no pulso de potencial anterior;
- (c) 0,00 V / 500 ms: limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de carbono vítreo. A aplicação deste pulso de potencial é essencial para obtenção de resultados estáveis em função do tempo.

A investigação da repetibilidade do método foi verificada pela comparação da magnitude da corrente de redução para injeções sucessivas de soluções contendo simultaneamente  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DA e  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AA. A Figura 3.13 indica que o método proposto apresenta uma boa repetibilidade para o sinal amperométrico monitorado. O desvio padrão relativo foi calculado em 1,2 % ( $n = 24$ ), mostrando um bom desempenho do método.

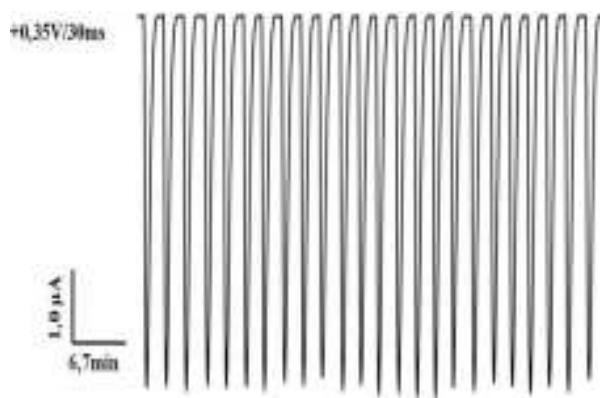


**Figura 3.13:** Respostas amperométricas após 24 injeções consecutivas de  $300 \mu\text{L}$  de uma solução contendo simultaneamente DA e AA ( $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente). Condições experimentais conforme Figura 3.12.

Outro estudo realizado foi com o intuito de verificar qual é a concentração máxima de AA que pode estar presente em solução para que a análise de dopamina ainda seja possível. Neste estudo a concentração de dopamina foi fixada em  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e a de AA foi variada na faixa de  $0,25$  a  $16,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . A Figura 3.14 mostra os amperogramas obtidos no estudo.

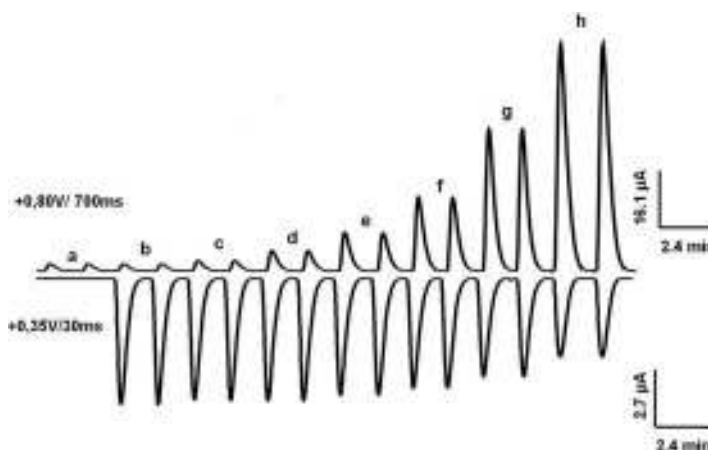


**Figura 3.14:** Resposta amperométrica em fluxo com injeções de soluções contendo 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DA (exceto a) e aumento da concentração de AA: a=b= 0,25; c= 0,5; d= 1,0; e=2,0; f=4,0; g=8,0 e h= 16,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20  $\text{mol L}^{-1}$ . Pulsos de potencial aplicados: +0,80V / 700ms para oxidação do AA e DA; +0,35 V /30ms para redução da *o*-DQ e 0,0 V/ 500ms, não apresentado, para limpeza do eletrodo. Vazão: 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Volume injetado: 300  $\mu\text{L}$ .

Segundo trabalhos publicados na literatura [3, 99], a concentração de AA em fluidos biológicos não é superior a 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  e pelo resultado experimental da Figura 3.14, o sinal de redução da *o*-DQ é relativamente constante na presença de até 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de AA. Portanto, pode-se empregar o método proposto com uma margem de segurança com relação a concentração de AA. Na presença de concentrações superiores, uma queda no sinal pode ser observada.

### 3.1.3.6 Curva analítica para determinação de DA em amostras de fármacos

A Figura 3.15 apresenta um amperograma de redução da *o*-DQ com a aplicação de 3 pulsos de potencial em função do tempo com a injeção em triplicata de soluções com concentrações crescentes de DA todas em  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (a = 1,0; b = 10,0; c = 20,0; d = 30,0; e = 40,0; f = 50,0; g = 60,0; h = 70,0; i = 80,0; j = 90,0 e l = 100,0) na presença de 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de AA. A curva analítica obtida a partir do amperograma apresentou um excelente coeficiente de correlação linear ( $R=0,998$ ). A curva foi linear no intervalo de 1,0 a 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , como representado pela Figura 3.16.

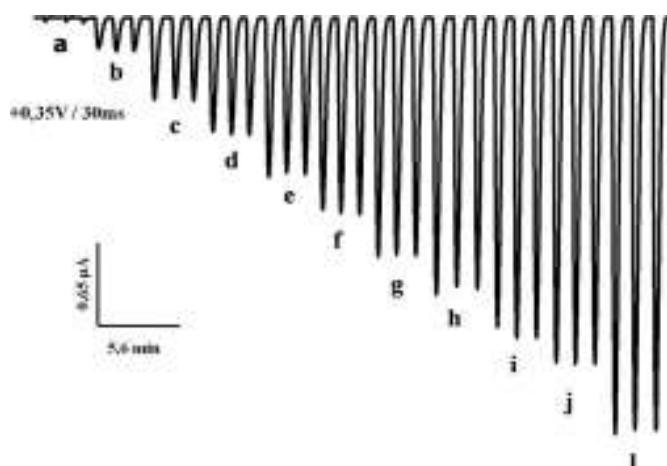


**Figura 3.15:** Amperograma para redução de *o*-DQ para a injeção de soluções de concentrações crescentes de DA (a=1,0; b=10,0; c=20,0; d=30,0; e=40,0; f=50,0; g=60,0; h=70,0; i=80,0; j=90,0 e l=100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de AA. Condições experimentais, conforme Figura 3.12.

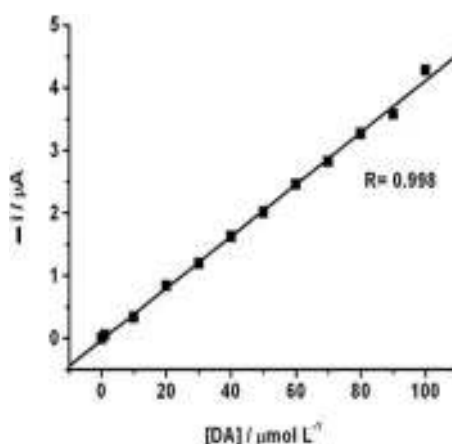


**Figura 3.16:** Curva analítica obtida para concentrações crescentes de DA no pulso de potencial de +0,35V / 30ms.

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) da DA foram obtidos de acordo com o descrito no procedimento experimental. Os valores foram respectivamente: 50 e 170  $\text{nmol L}^{-1}$ . O mesmo amperograma da Figura 3.15 e sua respectiva curva de calibração foi utilizada na determinação da concentração de DA presente em uma formulação farmacêutica do Hidrocloreto de Dopamina<sup>®</sup>. Esta análise foi repetida após a adição de 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de AA ao medicamento, simulando uma amostra biológica. Um estudo de adição e recuperação também foi realizado. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2:** Resultados obtidos na determinação de dopamina em amostra de fármaco na

ausência e após a adição de AA.

| Amostra                                                | Tabelado (mg) | Encontrado (mg) <sup>a</sup> | Diferença relativa (%) |
|--------------------------------------------------------|---------------|------------------------------|------------------------|
| Amostra 1                                              | 50,0          | 43,5 ± 1,0                   | -13%                   |
| Amostra 1 +1,0 mmol L <sup>-1</sup> de AA              | 50,0          | 43,0 ± 0,5                   | -14%                   |
| Amostra 1 +1,0 mmol L <sup>-1</sup> de AA +50 mg de DA | 100,0         | 96,3 ± 1,0                   | -3,7%                  |

<sup>a</sup> = resultado ± desvio padrão (n=3)

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a metodologia baseada em FIA com detecção AMP pode ser utilizada para determinação de DA em amostras farmacêuticas e também na presença de altas concentrações de AA.

### 3.2 ESTUDOS PARA DETERMINAÇÃO DE DA NA PRESENÇA DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE AA E AU

Ultimamente, tem-se observado um grande interesse no desenvolvimento de metodologias para determinação de DA na presença de AA e AU pelo fato de coexistirem em amostras biológicas. Utilizando técnicas eletroanalíticas, duas limitações podem ser identificadas: oxidação dos três compostos na mesma região de potencial e contaminação da superfície do eletrodo de trabalho. Além disto, a DA, em amostras biológicas, normalmente está presente em baixas concentrações, enquanto que AA e AU em concentrações mais elevadas.

O comportamento voltamétrico do AU foi estudado em meio H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>, com intuito de observar o perfil voltamétrico desta espécie neste eletrólito. A Figura 3.17 mostra o perfil voltamétrico do AU, da DA e do AA.

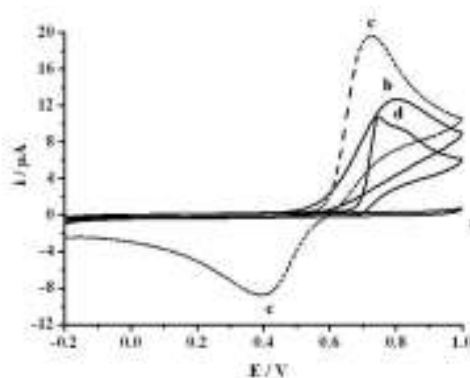


**Figura 3.17:** Voltamogramas cíclicos obtidos para  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  sem (a) e com a adição de (b) AA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , (c) DA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  ou (d) AU  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , sobre ECV. Faixa de Trabalho de  $-0,20 \text{ V}$  a  $1,00 \text{ V}$  vs Ag/AgCl;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Observa-se pelo voltamograma da Figura 3.17 que o AU apresenta um comportamento irreversível sobre eletrodo de carbono vítreo em meio de ácido sulfúrico  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ , com um pico de oxidação por volta de  $740 \text{ mV}$ . Segundo a literatura [40, 100, 101], o ácido úrico se oxida em um processo que envolve  $2e^-$  e  $2\text{H}^+$  para formar uma diimina. O mecanismo da reação está representado na Figura 3.18.

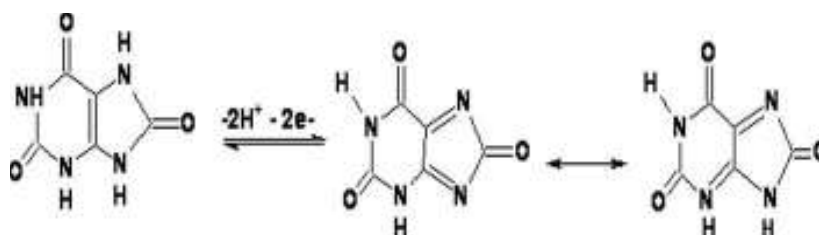


**Figura 3.18:** Mecanismo de oxidação do ácido úrico.

O ácido úrico em eletrodo de carbono vítreo ou eletrodos metálicos apresenta um comportamento irreversível, mas apresenta um comportamento quase reversível em eletrodo de pasta de carbono [100]. Isto está de acordo com o voltamograma apresentado pela Figura 3.17. No entanto, quando se tenta determinar a DA na presença de altas concentrações de AA e AU usando as mesmas condições experimentais da seção anterior, ou seja,  $+0,80 \text{ V} / 700 \text{ ms}$  para oxidação das três espécies analíticas,  $+0,35 \text{ V} / 30 \text{ ms}$  para determinação e quantificação da DA, aparece uma interferência (pico de redução) proveniente do ácido úrico. Apesar deste processo de redução não estar presente no voltamograma, quando se utiliza pulsos rápidos ( $30 \text{ ms}$ ) em amperometria pode-se obter processos redutivos originários do produto da oxidação do ácido úrico que interferem no potencial de determinação indireta da DA, impossibilitando a sua análise.

Para contornar este problema, estudos foram direcionados para identificação de um potencial que promovesse a oxidação da DA onde a interferência do AU fosse mínima e desta forma, o sinal de redução detectado em +0,35V / 30ms permitiria a análise seletiva de DA na presença de AA e AU. Os resultados destes estudos são apresentados na Figura 3.19.

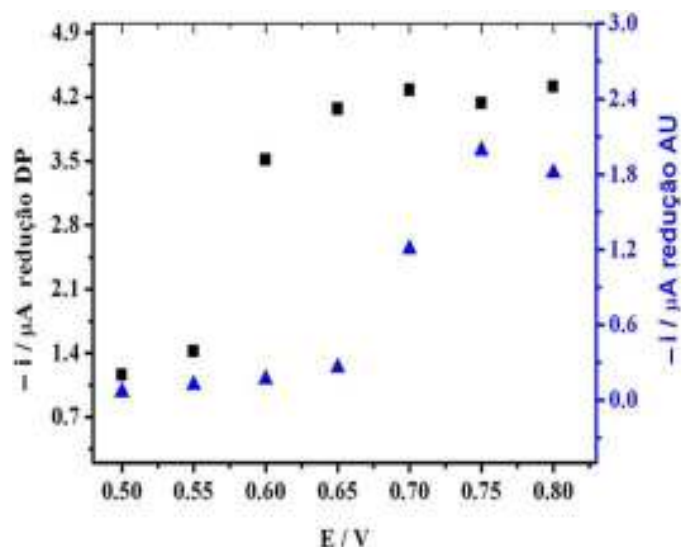


**Figura 3.19:** Intensidade da corrente amperométrica de redução monitorada no potencial de redução (+0,35V / 30ms) em função da variação do potencial de oxidação: 0,5; 0,55; 0,6; 0,65; 0,7; 0,75; 0,8 V, todos os pulsos com tempo de aplicação de 700ms para uma solução contendo 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de dopamina (■) ou 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido úrico (▲). Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20  $\text{mol L}^{-1}$ . Vazão: 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Volume injetado: 300 $\mu\text{L}$ . ET: CV.

Pelos dados experimentais da Figura 3.19, tanto o produto de oxidação da DA quanto do AU apresentam sinais de redução no potencial de +0,35V / 30ms se o pulso de potencial de oxidação for de +0,80 V. Porém, se o potencial de oxidação de +0,65 V for utilizado, a DA será oxidada e o AU apresenta uma pequena intensidade de corrente e consequentemente no pulso de  $E = +0,35\text{V} / 30\text{ms}$  uma corrente de redução seletiva para DA é adquirida. Neste potencial (+0,65 V), o sinal para oxidação da DA diminui em apenas 5,6 %. Portanto, na análise de DA na presença de altas concentrações de AA e AU, o potencial de oxidação selecionado foi de +0,65V. Neste potencial também foi estudado o tempo de aplicação, conforme apresentado na Figura 3.20.

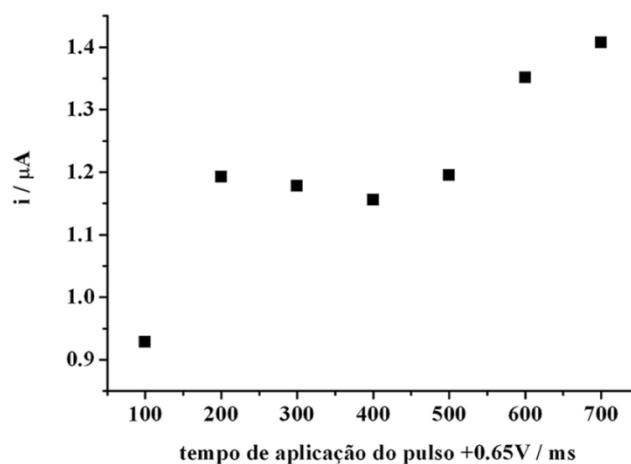


**Figura 3.20:** Intensidade do sinal amperométrico de oxidação, obtida da injeção de 300  $\mu\text{L}$  de solução contendo DA ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e AU ( $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em função do tempo de aplicação do potencial de +0,65 V. Condições experimentais: conforme Figura 3.19.

Como pode ser observado pela Figura 3.20, o tempo de 700ms propicia o maior sinal amperométrico de oxidação e, conseqüentemente, um maior sinal de coleta no potencial de +0,35V / 30ms. Esta Figura está de acordo com o tempo otimizado para a aplicação do  $E = +0,8\text{V}$ . Portanto, o tempo de 700ms também foi adotado para determinar a dopamina na presença de altas concentrações de AA e AU. Os parâmetros hidrodinâmicos utilizados foram os mesmos da seção anterior: 300 $\mu\text{L}$  para o volume de amostra injetada e vazão de 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ .

### 3.2.1 Uso da técnica AMP em FIA para análise de DA na presença de altas concentrações de AA e AU

Após a otimização do potencial de oxidação e respectivo tempo de aplicação, uma série de injeções de soluções (em triplicata) contendo individualmente DA, AA, AU e simultaneamente DA, AA e AU foi avaliada no sistema FIA com detecção por AMP. A Figura 3.21 mostra os resultados obtidos, com aplicação de três pulsos de potenciais: +0,65V / 700ms; +0,35V / 30ms e 0,0V / 800ms.

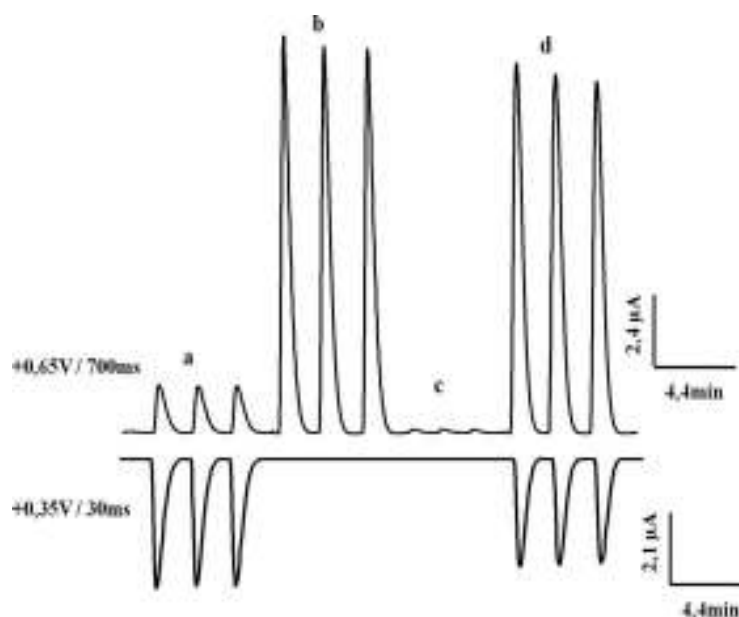


**Figura 3.21:** Amperograma de múltiplos pulsos com injeção de soluções em triplicata contendo  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de dopamina (a),  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido ascórbico (b),  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido úrico (c) ou mistura de todas as espécies analíticas nas mesmas concentrações dos itens anteriores (d). O amperograma de  $0,0 \text{ V} / 800\text{ms}$  não é apresentado. Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ . Vazão:  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Volume injetado:  $300 \mu\text{L}$ . ET: CV.

Analisando a Figura 3.21 podemos dizer que no pulso de potencial de  $+0,65\text{V} / 700\text{ms}$  há a oxidação das três espécies e no potencial de  $+0,35\text{V} / 30\text{ms}$  apenas a DA apresentou resposta. Portanto, nas condições otimizadas, a determinação seletiva de DA é possível sem a interferência do AA e do AU. A aplicação do potencial de limpeza de  $0,0\text{V}$  necessitou de um tempo maior de aplicação quando comparado à determinação de DA na presença de altas concentrações de AA ( $0,0\text{V} / 500\text{ms}$ ), para garantir uma total regeneração ou limpeza eletroquímica do eletrodo sem que este aumento de tempo prejudicasse a análise de DA.

Após a otimização destes potenciais, um estudo de repetibilidade para o método proposto (Figura 3.22) foi efetuada com 15 injeções consecutivas de soluções contendo simultaneamente DA, AA e AU ( $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente) em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ . Segundo o amperograma apresentado na Figura 3.22, o método para esta análise demonstra uma boa estabilidade, com desvio padrão relativo de  $0,25\%$  ( $n = 15$ ), o que está relacionado, principalmente, com a capacidade do pulso de  $E$   $0,0\text{V} / 800\text{ms}$  em evitar a contaminação do eletrodo de trabalho.

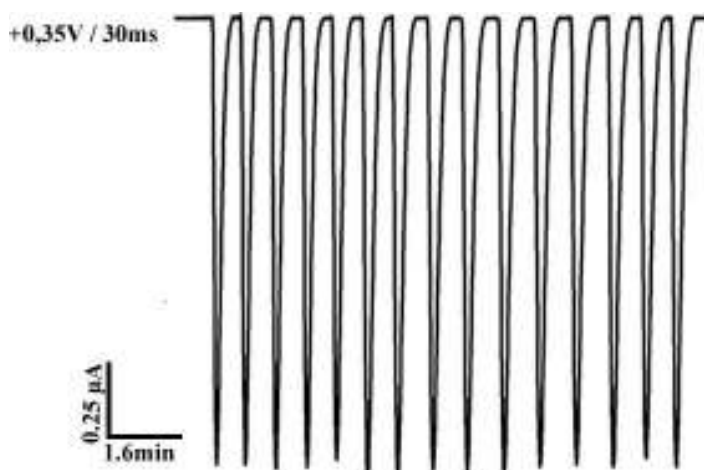


**Figura 3.22:** Resposta amperométrica após 15 injeções consecutivas de 300  $\mu\text{L}$  de solução contendo simultaneamente DA, AA e AU ( $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente). Condições experimentais conforme Figura 3.21.

Outro estudo realizado foi com o intuito de verificar a concentração máxima de AU que pode estar presente em uma amostra para que o método ainda permita a análise seletiva de DA. Para tanto, fixou-se a concentração de DA em  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e a concentração de AU foi aumentada progressivamente: 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00  $\text{mmol L}^{-1}$ . A Figura 3.23 mostra esta sequência de injeção neste estudo. Pode-se observar que a partir de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AU há um declínio da corrente amperométrica monitorada para a DA no potencial de +0,35V / 30ms indicando que a técnica está limitada a análise seletiva de DA na presença de AU até este valor. Portanto, a concentração de AU utilizada nos demais testes foi de  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ .

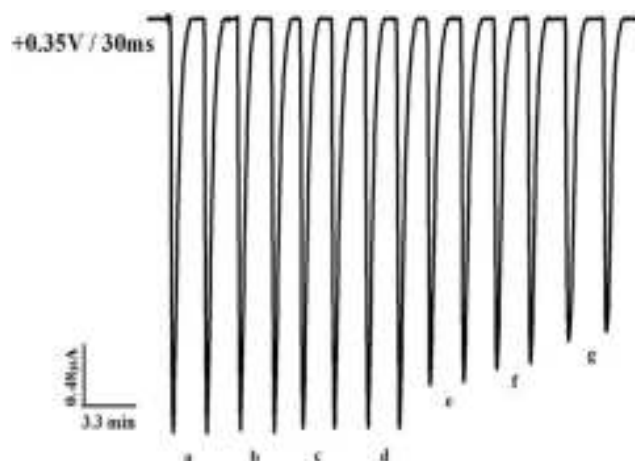


**Figura 3.23:** Resposta amperométrica em fluxo obtidas para injeções em duplicatas de soluções contendo  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DA em função do aumento da concentração de AU: a=0,05; b= 0,10; c= 0,20; d= 0,50; e=1,0; f=2,0 e g=4,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ . Pulsos de potencial aplicados: +0,35 V /30ms para redução da *o*-DQ; +0,65V / 700ms para oxidação do AA e DA; e 0,0 V/ 800ms para limpeza eletroquímica do eletrodo. Vazão:  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Volume injetado:  $300 \mu\text{L}$ .

### 3.2.2 Curva de Calibração para DA, limite de detecção e limite de quantificação

Para construção da curva analítica, realizaram-se injeções em triplicatas de soluções com concentrações crescentes de DA na presença de AA ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e AU ( $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Para a construção da curva usou-se o valor médio das três medidas adquiridas para cada solução (Fig. 3.24). A curva apresentou-se linear na faixa de concentração entre  $1,0$  e  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  com um excelente coeficiente de correlação ( $R = 0,998$ ). O limite de detecção calculado foi de  $11 \text{ nmol L}^{-1}$  e o limite de quantificação igual a  $37 \text{ nmol L}^{-1}$ .

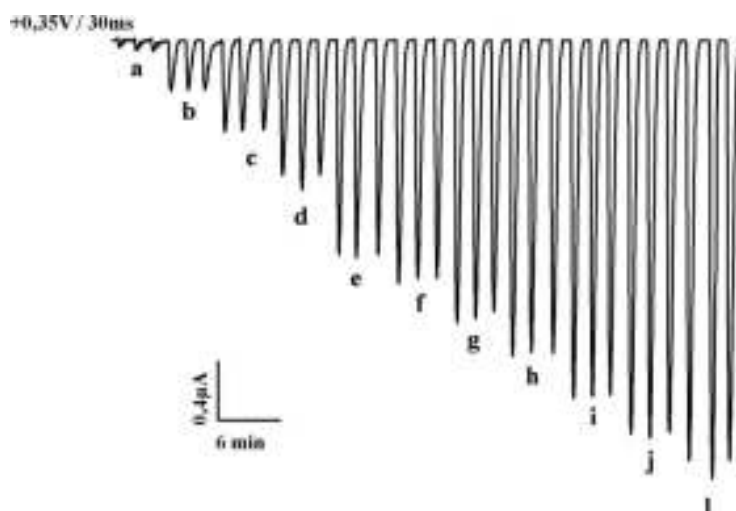


**Figura 3.24:** Amperograma obtido para a injeção de soluções com concentrações crescentes de DA em  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (a=1,0; b=10,0; c=20,0; d=30,0; e=40,0; f=50,0; g=60,0; h=70,0; i=80,0; j=90,0 e l=100,0) na presença de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AA e  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  de AU. Condições experimentais conforme Figura 3.21.

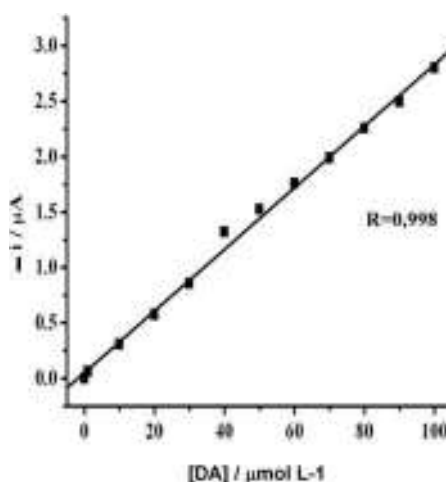


**Figura 3.25:** Curva de calibração para a dopamina obtida a partir do amperograma da Fig. 3.24.

### 3.3 AMPEROMETRIA DE MÚLTIPLOS PULSOS ACOPLADA AO SISTEMA FIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AA E AU

#### 3.3.1 Estudo de Variação da Velocidade de Varredura

Inicialmente, estudos de variação de velocidade de varredura ( $10$  a  $500 \text{ mV s}^{-1}$ ) usando a técnica de voltametria cíclica foram realizados para o AA. A Figura 3.26 representa os

voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de AA em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ . A Tabela 3.3 apresenta os potenciais de pico anódico e suas respectivas correntes para este estudo.

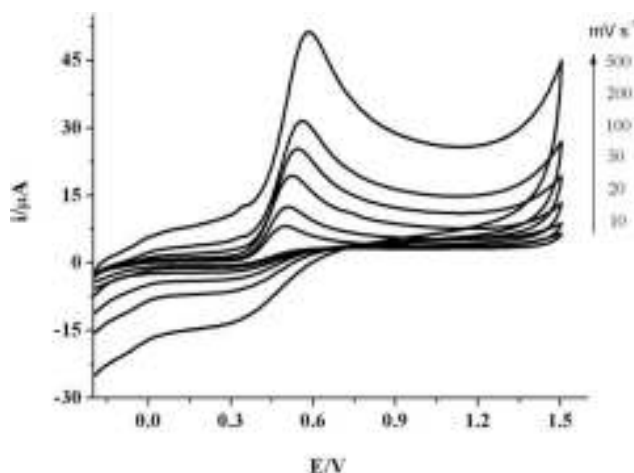


**Figura 3.26:** Efeito da velocidade de varredura usando VC de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AA em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  sobre eletrodo de carbono vítreo.

**Tabela 3.3:** Valores de corrente anódica (I) e potencial de pico (E) para oxidação do AA para diferentes velocidades de varredura (v).

| $v \text{ (mVs}^{-1}\text{)}$ | $I_{\text{anódico}} / \mu\text{A}$ | $E_{\text{pico anódico}} / \text{mV}$ |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 10                            | 8.3                                | 0.49                                  |
| 20                            | 12.5                               | 0.50                                  |
| 50                            | 19.6                               | 0.52                                  |
| 100                           | 25.8                               | 0.54                                  |
| 200                           | 31.3                               | 0.56                                  |
| 500                           | 51.3                               | 0.58                                  |

Analisando os voltamogramas cíclicos da Figura 3.26 e os dados da Tabela 3.3, observa-se que com o aumento da velocidade de varredura há um aumento na intensidade de corrente. Conforme a equação 1, quando o processo é controlado preferencialmente por difusão há uma relação linear entre as correntes de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura. Este fenômeno é observado no gráfico da Figura 3.27, o que demonstra que a oxidação do ácido ascórbico em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  é governado principalmente pelo fenômeno da difusão.

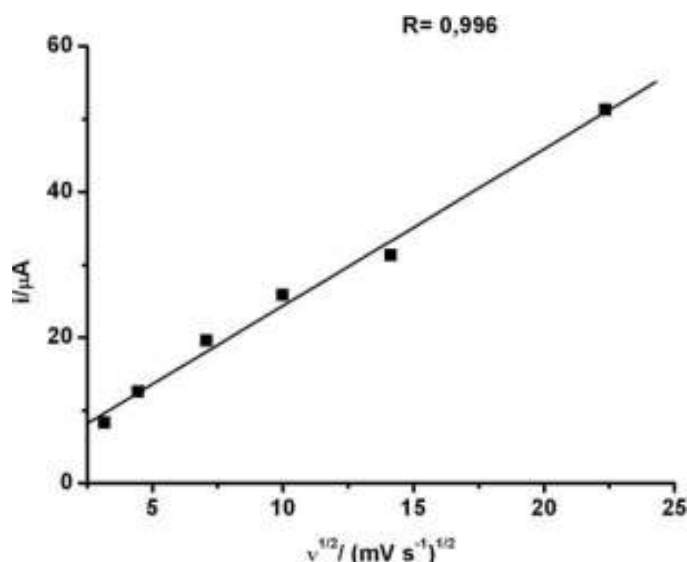


**Figura 3.27:** Dependência linear das correntes de pico anódico ( $\mu A$ ) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $mV s^{-1}$ )<sup>1/2</sup> para o pico de oxidação do ácido ascórbico em meio de  $H_2SO_4$  0,20 mol  $L^{-1}$  sobre eletrodo de carbono vítreo.

Analisou-se também o comportamento do AU nas mesmas condições experimentais. A Figura 3.28 apresenta os voltamogramas cíclicos de uma solução de 0,50 mmol  $L^{-1}$  AU com velocidades de varreduras no intervalo de 10 a 500  $mV s^{-1}$  sobre eletrodo de carbono vítreo. Os dados das intensidades de corrente anódica versus velocidade de varredura constam na Tabela 3.4

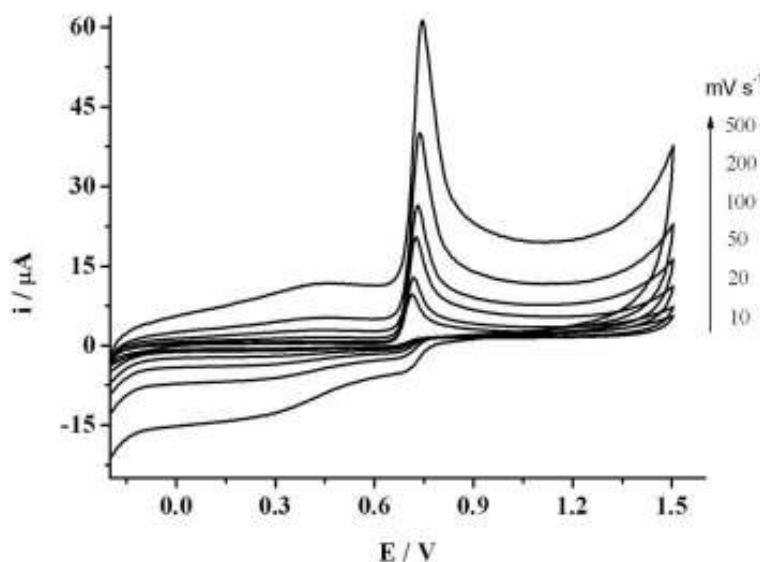


**Figura 3.28:** Efeito da velocidade de varredura usando VC para 0,50 mmol  $L^{-1}$  de ácido úrico em meio de  $H_2SO_4$  0,20 mol  $L^{-1}$  sobre ECV.

**Tabela 3.4:** Valores de corrente anódica (I) e potencial de pico (E) para oxidação do ácido úrico sob diferentes velocidades de varredura (v).

| v (mVs <sup>-1</sup> ) | I <sub>pico</sub><br>anódico/μA | E <sub>pico</sub><br>anódico/mV |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 10                     | 9.5                             | 0.71                            |
| 20                     | 13.1                            | 0.72                            |
| 50                     | 20.5                            | 0.72                            |
| 100                    | 26.8                            | 0.73                            |
| 200                    | 40.0                            | 0.74                            |
| 500                    | 61.2                            | 0.74                            |

De acordo com os voltamogramas cíclicos da Figura 3.28 e os dados da Tabela 3.4, observa-se que com o aumento da velocidade de varredura, há um aumento na intensidade de corrente. A Figura 3.29 apresenta o gráfico da intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Como também há uma relação linear entre estas variáveis o fenômeno que governa a oxidação do ácido úrico nestas condições é preferencialmente difusional.

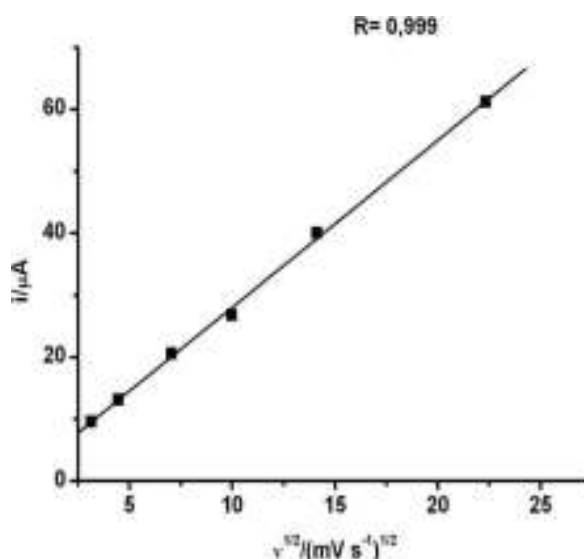


**Figura 3.29:** Dependência linear das correntes de pico anódica (μA) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura para o ácido úrico em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup> sobre eletrodo de carbono vítreo.

### 3.3.2 Identificação do potencial de oxidação do AA e AU

Voltando ao fato da impossibilidade de se usar a amperometria a potencial constante acoplada a FIA para análise simultânea de AU e AA devido à sobreposição dos picos de oxidação de ambas as espécie, estudos para contornar esta limitação são desejáveis. Na

literatura há relatos do uso de eletrodos modificados [102-104] ou o uso de meio micelar [105, 106] para obter a separação dos picos e conseguir assim determinar AA e AU. O propósito deste estudo é otimizar uma sequência de pulsos de potenciais a serem aplicados para a determinação simultânea de AU e AA usando FIA. A Figura 3.30 apresenta vários amperogramas obtidos com a injeção de  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AU ou  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em potenciais que variaram de  $+0,3 \text{ V}$  a  $+1,0 \text{ V}$  sobre eletrodo de carbono vítreo e em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,20 \text{ mol L}^{-1}$ .

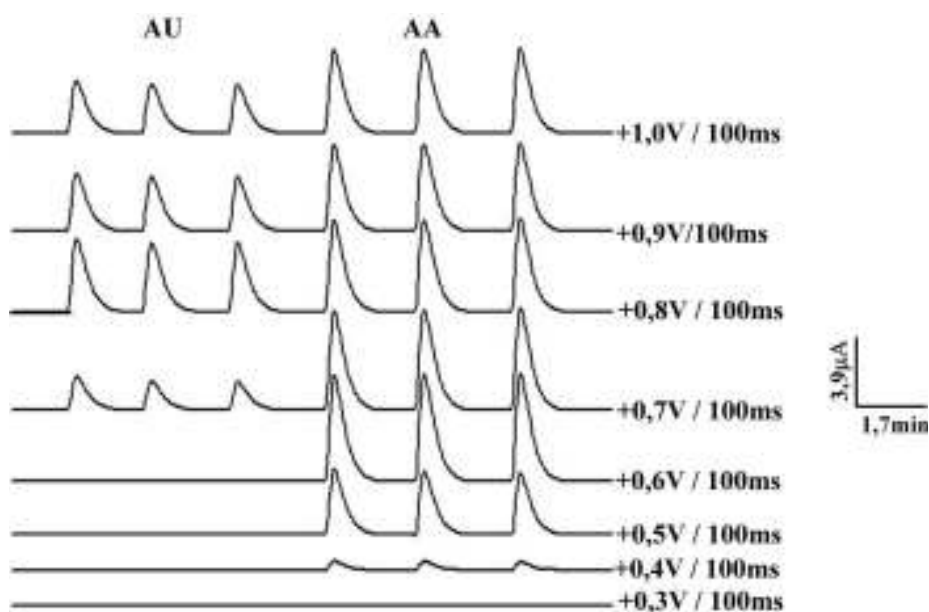


**Figura 3.30:** Amperogramas para injeção em fluxo em soluções em triplicata de  $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AU ou  $200,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AA nos seguintes potenciais:  $+0,3 \text{ V}$ ;  $+0,4 \text{ V}$ ;  $+0,5 \text{ V}$ ;  $+0,6 \text{ V}$ ;  $+0,7 \text{ V}$ ;  $+0,8 \text{ V}$ ;  $+0,9 \text{ V}$ ;  $+1,0 \text{ V}$  sobre eletrodo de carbono vítreo. Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,20 \text{ mol L}^{-1}$ . Vazão:  $2,2 \text{ mL min}^{-1}$ . Volume injetado:  $300 \mu\text{L}$ .

Observa-se pelos amperogramas da Figura 3.30 que no potencial de  $+0,3 \text{ V} / 100\text{ms}$ , tanto o AU quanto o AA não apresentam nenhum sinal. Entre os potenciais  $+0,4 \text{ V}$  a  $+0,6 \text{ V}$  ( $100\text{ms}$ ) apenas o AA apresenta sinal amperométrico de oxidação e a partir deste potencial, a intensidade de corrente se torna praticamente constante, indicando que a taxa máxima de oxidação foi alcançada. Portanto, pode-se analisar o AA sem a interferência de AU neste intervalo de potencial, sendo que o potencial de  $+0,6 \text{ V} / 100\text{ms}$  foi adotado para a determinação de AA, pois apresentou maior intensidade de corrente dentre os que poderiam ser utilizados para este fim.

Seguindo o mesmo raciocínio, observa-se que a partir do potencial de +0,7V / 100ms, tanto o AA quanto o AU apresentam sinal amperométrico de oxidação e a partir do potencial de +0,8V / 100ms, a intensidade de corrente se torna praticamente constante. Portanto, o potencial de +0,8 V / 100ms foi adotado para oxidação simultânea de AA e AU.

### 3.3.3 Identificação do potencial de redução do produto de oxidação do AU

Observando os amperogramas da Figura 3.30 percebe-se que não há a possibilidade de determinar o AU diretamente através do processo de oxidação. Para tanto, os estudos foram direcionados para identificação de um pulso de potencial que permitisse a quantificação indireta de AU sem a interferência do AA. Neste estudo, soluções contendo 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AU ou 200,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AA foram injetadas em sistema FIA com detecção AMP. Aplicou-se o pulso de +0,8V / 100ms para oxidação de AU e AA e uma série de pulsos de E de redução foram avaliados: +0,1 V; +0,2 V; +0,3 V; +0,4 V e +0,5 V, uma vez que em pulsos rápidos de potenciais é possível visualizar processo de redução do produto de oxidação do ácido úrico. O tempo de aplicação de cada pulso foi de 30ms para que o sinal de coleta (redução do produto da oxidação do AU) fosse máximo. Os valores de intensidade de corrente estão apresentados na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5:** Intensidade das correntes amperométricas para redução do produto da oxidação do AU e oxidação do AA em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20 mol  $\text{L}^{-1}$ .

| $E_{\text{red AU}}$ | $I_{\text{red AU}} / \mu\text{A}$ | $I_{\text{ox AA}} / \mu\text{A}$ |
|---------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| +0,1 V / 30ms       | 0,82                              | -                                |
| +0,2 V / 30ms       | 0,80                              | -                                |
| +0,3 V / 30ms       | 0,71                              | -                                |
| +0,4 V / 30ms       | 0,70                              | 0,15                             |
| +0,5V / 30ms        | 0,60                              | 1,0                              |

Observando os dados da Tabela 3.5, observa-se que o produto de oxidação do AU pode ser detectado na faixa de potencial entre +0,1 V e +0,3 V. No potencial de +0,4 V e +0,5V, o AA apresenta sinal anódico, não sendo possível optar por nenhum desses potenciais para a análise de AU. Portanto, optou-se pelo potencial de +0,1 V / 30ms para análise indireta de AU, uma vez que nos potenciais +0,2 V e +0,3 V a intensidade de corrente é menor.

### 3.3.4 Investigação do sinal amperométrico obtido por FIA com detecção AMP para AA e AU em função da vazão e do volume de amostra injetado

Estudos do efeito da vazão da solução carregadora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ) sobre os sinais amperométricos foram investigados. Neste estudo, os pulsos de potenciais aplicados foram os otimizados anteriormente, ou seja,  $+0,6 \text{ V} / 100\text{ms}$ ;  $+0,8 \text{ V} / 100\text{ms}$  e  $+0,1 \text{ V} / 30\text{ms}$  e  $0,0\text{V} / 1 \text{ s}$  (potencial de limpeza e regeneração do eletrodo). A Figura 3.31 mostra os respectivos sinais amperométricos de oxidação do AA ( $+0,6 \text{ V} / 100\text{ms}$ ) e redução do produto de oxidação do AU ( $+0,1\text{V} / 30\text{ms}$ ) obtidos pelo sistema FIA.

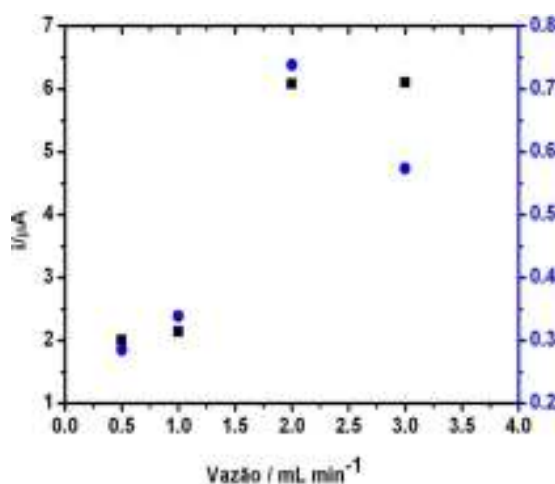


**Figura 3.31:** Intensidade de corrente em função da vazão da solução carregadora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ) obtida nos seguintes pulsos de potenciais: (■)  $+0,6 \text{ V} / 100\text{ms}$  (oxidação do AA),  $+0,8 \text{ V} / 100\text{ms}$  (não apresentado) e (●)  $+0,1\text{V} / 30\text{ms}$  (redução do produto da oxidação do AU),  $0,0 \text{ V} / 1 \text{ s}$  (não apresentado). Solução de AA=  $200,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e AU =  $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Os resultados apresentados na Figura 3.31 indicam que na medida que a vazão da solução carregadora vai aumentando, maior é a intensidade dos sinais, tanto de oxidação do AA, quanto para a redução do produto de oxidação do AU. Na vazão de  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ , o sinal no potencial de redução (coleta) para o produto da oxidação do AU alcança um valor máximo, sofrendo um pequeno decréscimo em vazões superiores, fenômeno já abordado no item 3.1.3.4. A sensibilidade para análise de AA seria maior para vazões maiores, mas o inverso é verdadeiro para o produto coletado no potencial de redução. Considerando, portanto, os sinais amperométricos dos processos eletroquímicos envolvidos, a vazão de  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$  foi o que apresentou a melhor condição para a detecção simultânea de AA e AU em sistema FIA com

detecção por AMP.

Estudos da dependência dos sinais amperométricos com o volume da amostra injetada também foram realizados. Os resultados para injeção de uma solução de AA = 200,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e AU = 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em função do volume injetado estão apresentados na Figura 3.32. Conforme pode ser observado, as intensidades dos sinais amperométricos, em +0,6 V e em +0,1V, aumentam para alíquotas de até 300 $\mu\text{L}$ . Após este volume, ambos os sinais amperométricos mantêm-se constantes. Isto pode ser explicado pelo efeito da dispersão da amostra, desde o ponto de injeção até o detector eletroquímico, que a partir deste volume faz mais efeito no centro da zona de amostra. Se o volume da amostra for menor, a dispersão se estende por toda a zona de amostragem, diminuindo assim a intensidade do sinal amperométrico. Assim, a opção foi de trabalhar com um volume de amostra injetado de 300  $\mu\text{L}$ .

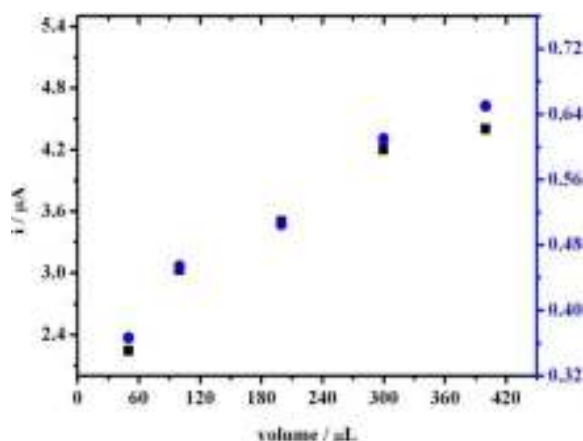


**Figura 3.32:** Intensidade dos sinais amperométricos em função da alíquota de amostra injetada no sistema FIA. (■) +0,6 V / 100ms (oxidação do AA) e (●) +0,1V / 30ms (redução do produto de oxidação do AU). Solução de AA= 200,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e AU = 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Vazão: 2,0  $\text{mL min}^{-1}$ .

### 3.3.5 Uso da técnica AMP acoplada ao sistema FIA para análise simultânea de AA e AU

Após a identificação dos melhores potenciais para análise de AA e AU e otimização dos parâmetros hidrodinâmicos, o desempenho do método foi avaliado com uma série de injeções em duplicata das seguintes soluções: 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AU (a), 200,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AA (b) e (c) AU e AA nas mesmas concentrações das soluções anteriores (Figura 3.33). De acordo com os amperogramas apresentados, pode-se observar que os pulsos aplicados permitem boa

seletividade para análise simultânea de AA e AU. No pulso de potencial de +0,6 V / 100ms (Fig. 3.33 a), apenas o AA apresenta sinal amperométrico anódico e em +0,1 V / 30ms (Fig. 3.33 b), apenas o produto de oxidação eletroquímica do AU apresenta sinal amperométrico catódico. Quando a solução contendo as duas espécies na mesma concentração das soluções anteriores é injetada (Fig. 3.33 c), os sinais (anódico e catódico) apresentam a mesma intensidade, sendo, portanto, possível analisar simultaneamente AU e AA usando a metodologia proposta.

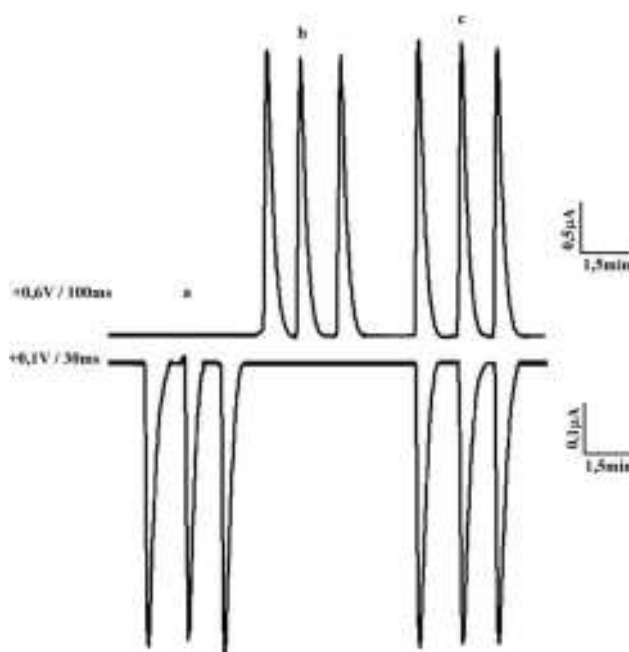


**Figura 3.33:** Amperograma de múltiplos pulsos com injeção em fluxo ( $n = 3$ ) de soluções contendo  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AU (a),  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA (b) ou AU e AA nas mesmas concentrações das soluções anteriores (c). Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ . Vazão:  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Volume injetado:  $300 \mu\text{L}$ . ET: CV. Sequência dos pulsos de potenciais aplicados: +0,6V / 100ms oxidação e quantificação do AA; +0,8 V / 100ms oxidação do AA e AU; +0,1 V / 30ms redução do produto da oxidação do AU e conseqüente quantificação; 0,0 V / 1s limpeza do eletrodo.

Investigações foram realizadas sobre a repetibilidade dos sinais amperométricos obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo simultaneamente AA e AU usando FIA com detecção AMP, nas condições definidas anteriormente. A Figura 3.34 indica uma boa estabilidade da técnica com desvio padrão relativo calculado em 0,3% para o AA e em 0,6% para análise indireta de AU.

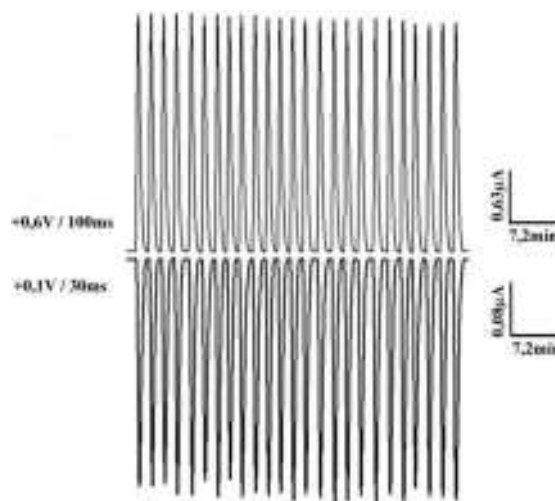


**Figura 3.34:** Amperograma de múltiplos pulsos obtidos para 25 injeções consecutivas de alíquotas de 300 $\mu$ L de solução contendo simultaneamente 100,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de AU e 200,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de AA. Condições experimentais conforme Figura 3.33.

Ciente de que tanto AA como o AU estão presentes em amostras biológicas, como urina, por exemplo, e considerando os níveis normais presentes nesta amostra, estudos foram realizados para determinar até que concentração (AA e AU) presente na amostra, a análise não seria mais viável, seja por contaminação do eletrodo, devido à grande quantidade presente ou por reação química entre os compostos como no caso entre *o*-DQ e AA ou ainda interferência de sinal no potencial aplicado. Para este estudo fixou-se a concentração de AA em 200,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> e aumentou-se gradativamente a concentração de AU partindo de uma concentração inicial de 100,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> (Figura 3.35). O sinal obtido para uma solução de 200,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de AA (Fig. 3.35 a) se mantém constante na presença de até 200,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de AU (Fig. 3.35 c). A partir de soluções contendo 400,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de AU (Fig. 3.35 d) ou mais, a análise não pode mais ser realizada, uma vez que há um decréscimo do sinal de intensidade de corrente para o AA. Provavelmente (não estudado), com o aumento de concentração de AU, um sinal de oxidação passou a existir para AU em 0,60 V.

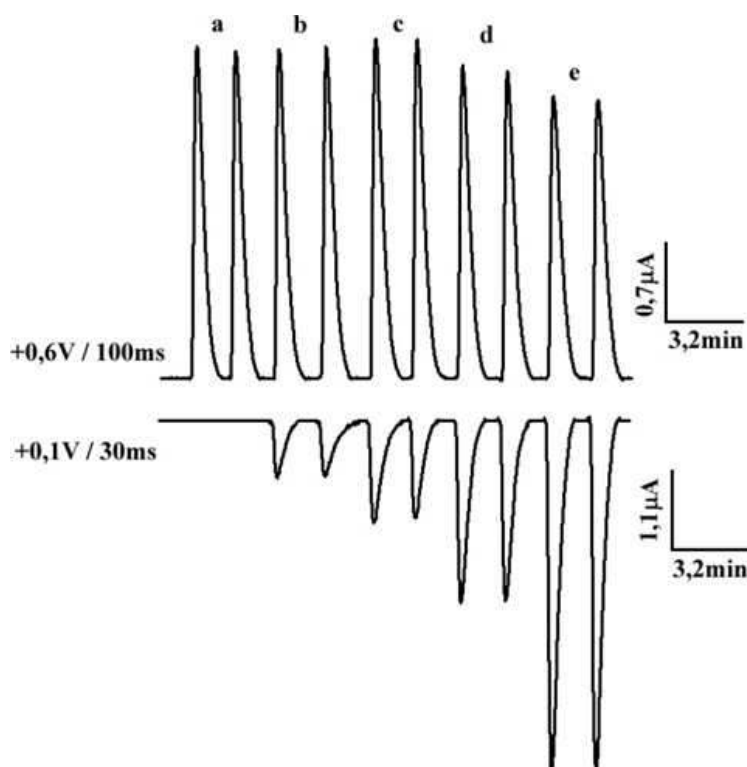


**Figura 3.35:** Respostas amperométricas em fluxo para injeções em duplicata de soluções contendo  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em função do aumento da concentração de AU (a = somente AA): b=  $100,0$ ; c=  $200,0$ ; d=  $400,0$ ; e=  $800,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ . Condições experimentais conforme Fig. 3.34.

O mesmo estudo foi repetido mantendo a concentração de AU fixa com um aumento gradativo da concentração de AA (Figura 3.36). Podemos observar que a análise de  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AU pode ser realizada sem interferência do AA até uma concentração de  $400,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA. No entanto, na presença de concentrações superiores de AA, a intensidade de corrente para AU passa a diminuir consideravelmente, inviabilizando a análise. A partir dos resultados apresentados nas Figuras 3.35 e 3.36 podemos concluir que a análise simultaneamente AA e AU somente é possível numa faixa de concentração relativamente pequena.

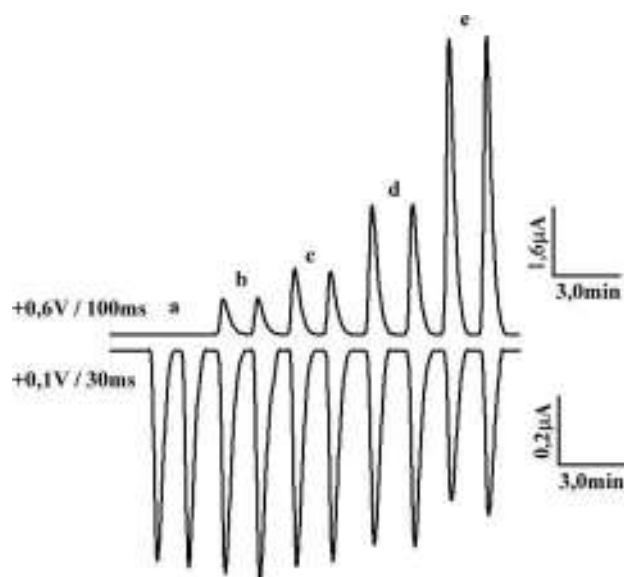


**Figura 3.36:** Respostas amperométricas em fluxo para injeções em duplicata de soluções contendo  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AU em função do aumento da concentração de AA (a = somente AU; b=  $100,0$ ; c=  $200,0$ ; d=  $400,0$ ; e=  $800,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ . Condições experimentais conforme Figura 3.34.

### 3.3.6 Curva de Calibração para AA e AU, limite de detecção e limite de quantificação e recuperação da amostra analisada

Considerando os resultados obtidos nas Figuras 3.35 e 3.36, uma curva de calibração para análise simultânea de AA e AU foi implementada através de injeções, em triplicatas, de soluções com concentrações crescentes de ambas as espécies analíticas. O valor médio das três medidas de intensidade de corrente para cada concentração foi utilizado para construir a curva de calibração. O amperograma para estas medidas é apresentado na Figura 3.37. A curva proporcionou uma relação linear entre corrente medida e concentração na faixa de  $100,0$  a  $300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o AA e de  $50,0$  a  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o AU. Dados como coeficientes de correlação, limites de detecção e quantificação calculados para o método proposto são apresentados na Tabela 3.6.

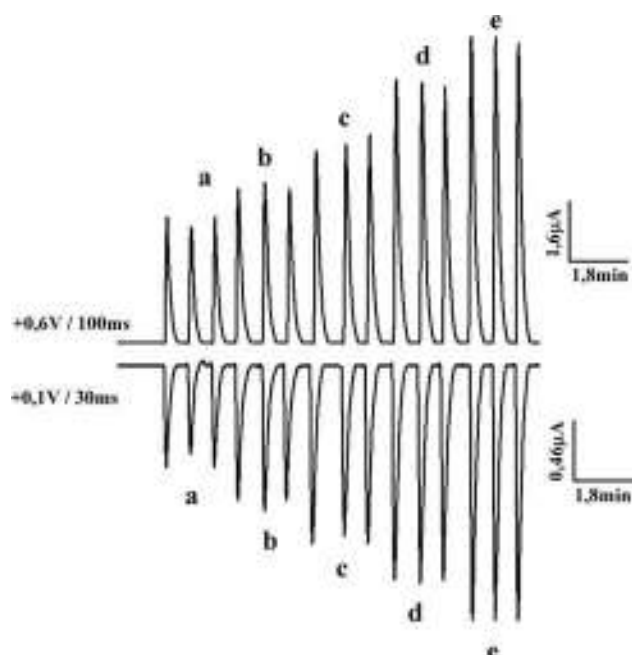


**Figura 3.37:** Amperograma para oxidação do AA (+0,6V / 100ms) e redução do produto da oxidação do AU (+0,1V / 30ms) para injeções ( $n = 3$ ) de soluções com concentrações crescentes de AA e AU (a=100/50; b=150/75; c=200/100; d=250/125; e=300/150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Condições experimentais conforme Figura 3.34.

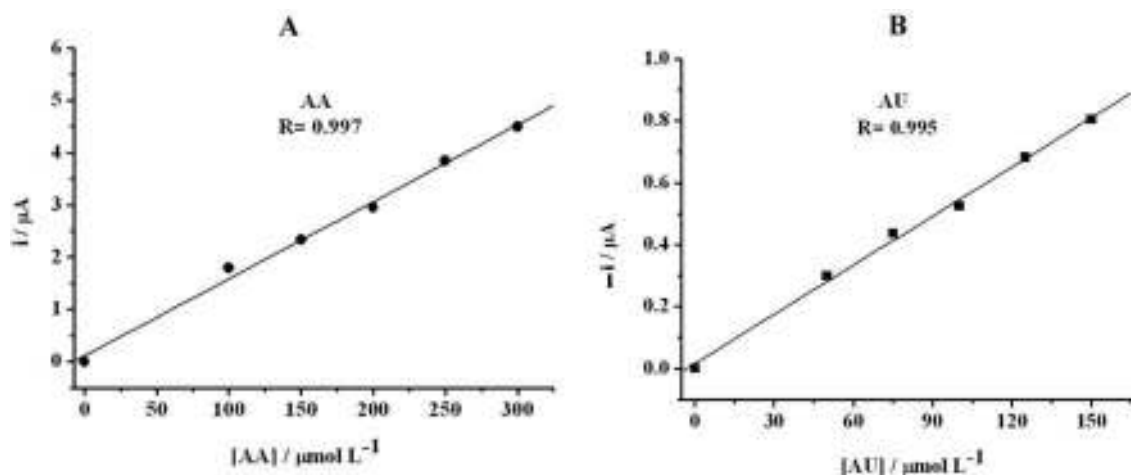


**Figura 3.38:** (A) Curva de calibração obtida na análise de AA no pulso de potencial +0,60V / 100ms. (B) Curva de calibração obtida na análise do AU no pulso de potencial +0,1V / 30ms.

**Tabela 3.6:** Coeficientes de Correlação, limites de detecção e de quantificação do AA e AU.

| Espécies analíticas | R     | LD                       | LQ                       |
|---------------------|-------|--------------------------|--------------------------|
| AA                  | 0,997 | 82 $\text{nmol L}^{-1}$  | 273 $\text{nmol L}^{-1}$ |
| AU                  | 0,995 | 169 $\text{nmol L}^{-1}$ | 563 $\text{nmol L}^{-1}$ |

Três amostras padrões contendo simultaneamente AA e AU foram analisadas usando o método proposto. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3.7

**Tabela 3.7:** Resultados obtidos na determinação de AA e AU em amostra padrões.

| Amostra | Conc. adicionada<br>AA / AU ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | Conc. analisada<br>AA / AU ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | Recuperação<br>% |
|---------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------|
| 1       | 110 / 110                                              | 104,2 / 127,4                                         | 95 / 127         |
| 2       | 110 / 55                                               | 105,4 / 61,1                                          | 96 / 111         |
| 3       | 220 / 55                                               | 200,6 / 61,1                                          | 91 / 111         |

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a metodologia baseada em FIA com detecção AMP pode ser utilizada para determinação simultânea de AA e AU em amostras padrões com boa probabilidade de obtenção de sucesso na análise de amostras reais (urina, por exemplo).

---

## PARTE 4

# CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

## 4.1 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que a técnica de Amperometria de Múltiplos Pulsos acoplada a sistema FIA é uma metodologia eficiente na determinação de dopamina na presença de altas concentrações de ácido ascórbico ou de ácido úrico, como para determinação simultânea de ácido ascórbico e ácido úrico. Estes resultados foram atingidos usando  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito suporte e eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho.

A quantificação de dopamina na presença de altas concentrações de ácido ascórbico ( $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ ) é possível com a aplicação de pulsos de potenciais rápidos e sequenciais sobre um eletrodo de trabalho com a aquisição de corrente em cada potencial em função do tempo. A dopamina é quantificada através da redução do produto gerado numa etapa prévia de oxidação. O método consiste na aplicação dos seguintes pulsos de potenciais:

- $+0,80\text{V} / 700\text{ms}$ : oxidação da dopamina e ácido ascórbico gerando *o*-dopaminoquinona (*o*-DQ) e ácido dehidroascórbico;
- $+0,35 / 30\text{ms}$ : redução da *o*-DQ e quantificação da dopamina;
- $0,0\text{V} / 500\text{ms}$ : limpeza e regeneração do eletrodo de trabalho. Este pulso de potencial é importante para obtenção de resultados reproduzíveis com o tempo.

Em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  há uma diminuição significativa na velocidade de reação entre o ácido ascórbico e a *o*-DQ, o que possibilitou a quantificação da dopamina pela redução da *o*-DQ utilizando a técnica AMP acoplada a sistema FIA.

A dopamina também foi determinada na presença de ácido ascórbico ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e ácido úrico ( $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com aplicação de pulsos de potencial sequenciais. A sequência de pulsos aplicados foi a seguinte:

- $+0,65\text{V} / 700\text{ms}$ : oxidação da dopamina e do ácido ascórbico;
- $+0,35\text{V} / 30\text{ms}$ : redução da *o*-DQ e quantificação da dopamina;
- $0,00\text{V} / 800\text{ms}$ : limpeza e regeneração do eletrodo de trabalho;

O método também foi aplicado para a análise simultânea de ácido úrico e ácido ascórbico com a aplicação dos seguintes pulsos de potenciais:

- $+0,60 \text{ V} / 100\text{ms}$ : o ácido ascórbico é detectado e quantificado seletivamente pela reação de oxidação;
- $+0,80\text{V} / 100\text{ms}$ : oxidação simultânea de ácido ascórbico e ácido úrico;

- +0,10V / 30ms: determinação de ácido úrico através da redução do produto gerado no pulso de potencial anterior;
- 0,00V / 1s: limpeza e regeneração do eletrodo de trabalho.

Em todas as análises, a técnica AMP acoplado a FIA apresentou bons resultados em relação a repetibilidade de sinal em função do tempo, indicando que o potencial aplicado para limpeza da superfície do eletrodo, assim como o tempo de sua aplicação foram eficientes.

Variáveis relacionadas com o método, tais como: volume de amostra injetado, vazão da solução carregadora, pulsos de potenciais de oxidação e redução, assim como os tempos de aplicação destes pulsos foram estudados e otimizados com a obtenção de condições adequadas, considerando os seguintes parâmetros analíticos: sensibilidade, coeficiente de correlação, desvio padrão relativo, faixa linear de concentração e limites de detecção e quantificação.

A metodologia proposta é simples e apresenta alta frequência analítica. Não há a necessidade de etapas de pré-concentração e pré-tratamento das amostras ou ainda etapas de modificação química ou eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho utilizado.

## **4.2 PROPOSTAS DE CONTINUIDADE**

Completar a validação da metodologia para determinação de dopamina na presença de altas concentrações de ácido ascórbico e na presença de ácido úrico assim como a determinação simultânea de ácido ascórbico e ácido úrico, utilizando a técnica CLAE com detecção UV.

Utilizar a metodologia utilizada para analisar dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico em amostras biológicas tais como urina e fluido cefalorraquidiano.

Verificar possíveis interferências causadas pelo efeito de matriz de amostras biológicas assim como aumento da força iônica provenientes dos sais dissolvidos nestas amostras.

---

## **PARTE 5:**

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Toledo R.A., *Estudo Eletroquímico e desenvolvimento de novas metodologias eletroanalíticas para a determinação de antidepressivos tricíclicos e neurotransmissores*, Tese de Doutorado; Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, **2006**.
- [2] Junior L.C.R., *Metodologia cinética em fluxo não interrompido - determinação de dopamina em fármacos*, Dissertação de Mestrado; Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, **2004**.
- [3] Shervedani R.K., Bagherzadeh M., Mozaffari S.A., *Determination of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid by using gold cysteamine self-assembled monolayers as a nanosensor*, Sensors and Actuators B-Chemical, 115, **2006**, 614-621.
- [4] <http://www.baraodemaua.br/jornal/2004/setembro/alzheimer.htm>, acessado em **14/03/09**
- [5] Cutler N.R., Sramek J.J., *Review of the next generation of Alzheimer's disease therapeutics: Challenges for drug development*, Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 25, **2001**, 27-57.
- [6] Wang J.K.T., *Cu<sup>2+</sup> induces Ca<sup>2+</sup> dependent neurotransmitter release from brain catecholaminergic nerve terminals*, European Journal of Pharmacology, 373, **1999**, 163.
- [7] Linert W., Jameson G.N.L., *Redox reaction of neurotransmitters possibly involved in the progression of Parkinson's disease*, Journal of Inorganic Biochemistry 79, **2000**, 319-326.
- [8] Liu I.S.C., George S.R., Seeman P., *The human dopamine D2(longer) receptor has a high-affinity state and inhibits adenylyl cyclase*, Molecular Brain Research, 77, **2000**, 281-284.
- [9] [www.parkinson.pt](http://www.parkinson.pt); acessado em **14/03/09**
- [10] [http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido\\_asc%C3%B3rbico](http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_asc%C3%B3rbico); acessado em **28/04/09**
- [11] Siva R.P., *Aplicações Analíticas de Eletrodos Quimicamente Modificados por Espécies de Interesse Biológico*, Dissertação de Mestrado; Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2007**.
- [12] Terpstra M., Tkac I., Rao R.L., Gruetter R., *Quantification of vitamin C in the rat brain in vivo using short echo-time H-1 MRS*, Magnetic Resonance in Medicine, 55, **2006**, 979-983.
- [13] Toledo R.A., Santos M.C., Cavalheiro E.T.G., Mazo L.H., *Determination of dopamine in synthetic cerebrospinal fluid by SWV with a graphite-polyurethane composite electrode*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 381, **2005**, 1161-1166.
- [14] Bezerra V.S., De Lima J.L., Montenegro M., Araujo A.N., Da Silva V.L., *Flow-injection amperometric determination of dopamine in pharmaceuticals using a polyphenol oxidase biosensor obtained from soursop pulp*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 33, **2003**, 1025-1031.
- [15] Jing F.C., Chen H., Li C.L., *Rapid determination of dopamine and its metabolites during in vivo cerebral microdialysis by routine high performance liquid chromatography with electrochemical detection*, Biomedical and Environmental Sciences, 20, **2007**, 317-320.
- [16] Chen F.N., Zhang Y.X., Zhang Z.J., *Simultaneous determination of epinephrine, noradrenaline and dopamine in human serum samples by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection*, Chinese Journal of Chemistry, 25, **2007**, 942-946.
- [17] Tong C.L., Zhu Y., Liu W.P., *Simultaneous determination of dopa, dopamine, epinephrine and norepinephrine with ion chromatography and fluorescence detector*, Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 227, **2004**, U102.
- [18] Djozan D., Farajzadeh M.A., *The use of fluorescamine (Fluram) in fluorometric trace analysis of primary amines of pharmaceutical and biological interest*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 10, **1992**, 1063-1067.
- [19] Hu Y.F., Zhang Z.J., *A novel chemiluminescence method for determination of unbound dopamine in serum by using potato tissue as an enzyme supply*, Acta Chimica Sinica, 66, **2008**, 783-787.

- [20] Liu Y.H., Song Z.H., *Flow injection chemiluminescence for determination of dopamine with immobilized reagents technology*, Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy, 51, **2006**, 59-66.
- [21] Wang S.H., Du L.Y., Wei X.T., Wang L.Y., Zhuang H.S., *Determination of dopamine hydrochloride by a reverse flow injection chemiluminescence method*, Spectroscopy and Spectral Analysis, 25, **2005**, 678-680.
- [22] Junior L.R., Fernandes J.C.B., Neto G.D., Kubota L.T., *Development of a new FIA-potentiometric sensor for dopamine based on EVA-copper(II) ions*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 481, **2000**, 34-41.
- [23] Lima J., Montenegro M., *Dopamine ion-selective electrode for potentiometry in pharmaceutical preparations*, Mikrochimica Acta, 131, **1999**, 187-190.
- [24] Yeh W.L., Kuo Y.R., Cheng S.H., *Voltammetry and flow-injection amperometry for indirect determination of dopamine*, Electrochemistry Communications, 10, **2008**, 66-70.
- [25] Matos R.C., Augelli M.A., Lago C.L., Angnes L., *Flow injection analysis-amperometric determination of ascorbic and uric acids in urine using arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium*, Analytica Chimica Acta, 404, **2000**, 151-157.
- [26] Vieira I.D., Fatibello O., *Spectrophotometric determination of methyl dopa and dopamine in pharmaceutical formulations using a crude extract of sweet potato root (Ipomoea batatas (L.) Lam.) as enzymatic source*, Talanta, 46, **1998**, 559-564.
- [27] Chamsaz M., Safavi A., Fadaee J., *Simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of carbidopa, levodopa and methyl dopa in the presence of citrate with the aid of multivariate calibration and artificial neural networks*, Analytica Chimica Acta, 603, **2007**, 140-146.
- [28] Chen M.A., Li H.L., *Separation of anodic peaks of ascorbic acid and dopamine at 4-hydroxy-2-mercapto-6-methylpyrimidine modified gold electrode*, Electroanalysis, 10, **1998**, 477-479.
- [29] Selvaraju T., Ramaraj R., *Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and serotonin at poly(phenosafranin) modified electrode*, Electrochemistry Communications, 5, **2003**, 667-672.
- [30] Zhang Y.Z., Jin G.Y., Wang Y.L., Yang Z.S., *Determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using poly (acridine red) modified glassy carbon electrode*, Sensors, 3, **2003**, 443-450.
- [31] Wen X.L., Jia Y.H., Liu Z.L., *Micellar effects on the electrochemistry of dopamine and its selective detection in the presence of ascorbic acid*, Talanta, 50, **1999**, 1027-1033.
- [32] Alarcon-Angeles G., Corona-Avendano S., Palomar-Pardave M., Rojas-Hernandez A., Romero-Romo M., Ramirez-Silva M., *Selective electrochemical determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using sodium dodecyl sulfate micelles as masking agent*, Electrochimica Acta, 53, **2008**, 3013-3020.
- [33] Reis A.P., Tarley C.R.T., Maniasso N., Kubota L.T., *Exploiting micellar environment for simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid and dopamine*, Talanta, 67, **2005**, 829-835.
- [34] Renato C. Matos, Lúcio Angnes, Araújo M.C.U., Saldanha T.C.B., *Modified microelectrodes and multivariate calibration for flow injection amperometric simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, epinephrine and dipyrone*, Analyst, 125, **2000**, 2011-2015.
- [35] Kachoosangi R.T., Compton R.G., *A simple electroanalytical methodology for the simultaneous determination of dopamine, serotonin and ascorbic acid using an unmodified edge plane pyrolytic graphite electrode*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387, **2007**, 2793-2800.
- [36] Silva R.P.d., Lima A.W.O., Serrano S.H.P., *Simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a pyrolytic graphite electrode modified into dopamine solution*, Analytica Chimica Acta, 612, **2008**, 89-98.

- [37] Matos R.C., Augelli M.A., Lago C.L., Angnes L., *Flow injection analysis-amperometric determination of ascorbic acids in urine arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium.*, Analytica Chimica Acta, 404, **2000**, 151-157.
- [38] Liu A.L., Chen W., Huang L.Y., Lin X.H., *A Polymer Film Modified Sensor for Voltammetric Determination of Uric Acid in the Presence of Ascorbic Acid and Its Application in Urine*, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 56, **2008**, 1665-1669.
- [39] Zhang L., Lin X.Q., *Covalent modification of glassy carbon electrode with glutamic acid for simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid*, Analyst, 126, **2001**, 367-370.
- [40] Roy P.R., Okajima T., Ohsaka T., *Simultaneous electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid at a poly(N,N-dimethylaniline) film-coated GC electrode*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 561, **2004**, 75-82.
- [41] Gao Z.Q., Siow K.S., Ng A., Zhang Y.M., *Determination of ascorbic acid in a mixture of ascorbic acid and uric acid at a chemically modified electrode*, Analytica Chimica Acta, 343, **1997**, 49-57.
- [42] Chailapakul O., Ngmukot P., Yoosamran A., Siangproh W., Wangfuengkanagul N., *Review: Recent electrochemical and optical sensors in flow-based analysis*, Sensors, 6, **2006**, 1383-1410.
- [43] Junior L.H.M., *Eletrodos voltamétricos e amperométricos para a determinação de espécie de interesse farmacêutico*, Tese de Doutorado; Departamento de Química, universidade Federal de São Carlos, São Carlos, **2007**.
- [44] Matos R.C., Gutz I.G.R., Angnes L., *Propulsor pneumático versátil e isento de pulsação para sistemas de análise em fluxo*, Química Nova, 24, **2001**, 795-798.
- [45] Kubiak W.W., Strozik M.M., *Study of the flow dependence of microelectrode and semi-microelectrode voltammetric signals*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 417, **1996**, 95-103.
- [46] Chaniotakis N.A., Tsagatakis J.K., Moschou E.A., West S.J., Wen X.W., *Magnesium ion-selective electrode: optimization and flow injection analysis application*, Analytica Chimica Acta, 356, **1997**, 105-111.
- [47] Huang Y.Z., Du W.B., Pan J.Z., Fang Q., *Microfluidic chip-based valveless flow injection analysis system with gravity-driven flows*, Analyst, 133, **2008**, 1237-1241.
- [48] Du W.B., Fang Q., He Q.H., Fang Z.L., *High-throughput nanoliter sample introduction microfluidic chip-based flow injection analysis system with gravity-driven flows*, Analytical Chemistry, 77, **2005**, 1330-1337.
- [49] Richter E.M., Jesus D.P., Neves C.A., Lago C.L., Angnes L., *Aplicações eletroanalíticas com eletrodos de prata confeccionados a partir de CDs graváveis*, Química Nova, 26, **2003**, 839-843.
- [50] Ruzicka J., Hansen E.H., *Flow injection analysis*, John Wiley, New York, **1988**.
- [51] Bergamin H., Reis B.F., Zagatto E.A.G., *New device for improving sensitivity and stabilization in flow-injection analysis*, Analytica Chimica Acta, 97, **1978**, 427-431.
- [52] Elci L., Arslan Z., Tyson J.F., *Determination of lead in wine and rum samples by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry*, Journal of Hazardous Materials, 162 **2009**, 880-885.
- [53] Adam I.S.I., Anthemidis A.N., *Flow injection wetting-film extraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of cadmium in environmental waters*, Talanta, 77, **2009**, 1160-1164.
- [54] Takayanagi T., Yamashita H., Motomizu S., Musijowski J., Trojanowicz M., *Preconcentration and decomposition of perfluorinated carboxylic acids on an activated charcoal cartridge with sodium biphenyl reagent and its determination at  $\mu\text{g L}^{-1}$  level on the basis of flow injection-fluorimetric detection of fluoride ion*, Talanta, 74, **2008**, 1224-1230.

- [55] Waseem A., Yaqoob M., Nabi A., *Photodegradation and flow-injection determination of simetryn herbicide by luminol chemiluminescence detection*, Analytical Sciences, 24, **2008**, 979-983.
- [56] Waseem A., Yaqoob M., Nabi A., *Flow-injection method for the determination of iodide/iodine using Ru(bpy)(3)(3+)-NADH chemiluminescence detection*, Luminescence, 23, **2008**, 316-320.
- [57] Ensafi A.A., Khayamian T., Hasanpour F., *Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte by flow injection analysis with chemiluminescence detection*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 48, **2008**, 140-144.
- [58] Yashin A.Y., *A flow-injection system with amperometric detection for selective determination of antioxidants in foodstuffs and drinks*, Russian Journal of General Chemistry, 78, **2008**, 2566-2571.
- [59] Mikelova R., Prokop Z., Stejskal K., Adam V., Beklova M., Trnkova L., Kulichova B., Horna A., Chaloupkova R., Damborsky J., Kizek R., *Enzymatic reaction coupled with flow-injection analysis with charged aerosol, coulometric, or amperometric detection for estimation of contamination of the environment by pesticides*, Chromatographia, 67, **2008**, S47-S53.
- [60] Fung Y.S., Mo S.Y., *Determination of ethanol in beer by flow injection dual-pulse staircase voltammetric detection*, Analyst, 121, **1996**, 369-372.
- [61] Budnikov G.K., *Voltammetric detection in flow-injection analysis using electrocatalytic systems*, Journal of Analytical Chemistry, 51, **1996**, 143-148.
- [62] Ticianelli E.A., Gonzalez E.R., *Eletroquímica: Princípios e Aplicações*, EDUSP, São Paulo, **1998**.
- [63] Grosser D.K., *Cyclic Voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms*, VHC, New York, **1993**.
- [64] Mabbott G.A., *An introduction to cyclic voltammetry*, Journal of Chemical Education, 60, **1983**, 697-702.
- [65] Crow D.R., *Principles and applications of electrochemistry*, Blackie Academic & Professional, London, **1994**.
- [66] Brett A. M. O., Brett C.M.A., *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*, Livraria Almedina, Coimbra, **1996**.
- [67] Zhang W., Wang G.F., Zhang X.J., Fang B., *Amperometric Detection of Hydrogen Peroxide Using Glassy Carbon Electrodes Modified with Chromium Hexacyanoferrate/Single-Walled Carbon Nanotube Nanocomposites*, Electroanalysis, 21, **2009**, 179-183.
- [68] Jia W., Guo M., Zheng Z., Yu T., Wang Y., Rodriguez E.G., Lei Y., *Vertically Aligned CuO Nanowires Based Electrode for Amperometric Detection of Hydrogen Peroxide*, Electroanalysis, 20, **2008**, 2153-2157.
- [69] Gutierrez A., Osegueda S., Gutierrez-Granados S., Alatorre A., Garcia M.G., Godinez L.A., *Amperometric Detection and Quantification of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) Using Dendrimer Modified Electrodes*, Electroanalysis, 20, **2008**, 2294-2300.
- [70] 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, 38, **2008**, 1285-1292.
- [71] Varodi C., Gligor D., Muresan L.M., *Carbon paste electrodes incorporating synthetic zeolites and methylene blue for amperometric detection of ascorbic acid*, Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia, 52, **2007**, 109-117.
- [72] Liu Y., Gu H.Y., *Amperometric detection of nitrite using a nanometer-sized gold colloid modified pretreated glassy carbon electrode*, Microchimica Acta, 162, **2008**, 101-106.

- [73] 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, 76, **2008**, 454-457.
- [74] Richter E.M., da Silva J.A.F., Gutz I.G.R., do Lago C.L., Angnes L., *Disposable twin gold electrodes for amperometric detection in capillary electrophoresis*, Electrophoresis, 25, **2004**, 2965-2969.
- [75] Carvalho R.M., Freire R.S., Rath S.R., Kubota L.T., *Effects of EDTA on signal stability during electrochemical detection of acetaminophen*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 34, **2004**, 871-878.
- [76] Haghighi B., Rahmati-Panah A., Shleev S., Gorton L., *Carbon ceramic electrodes modified with laccase from Trametes hirsuta: Fabrication, characterization and their use for phenolic compounds detection*, Electroanalysis, 19, **2007**, 907-917.
- [77] 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, 18, **2006**, 931-934.
- [78] Catarino R.I.L., Conceicao A.C.L., Garcia M.B.Q., Goncalves M.L.S., Lima J., dos Santos M.M.C., *Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 33, **2003**, 571-580.
- [79] Skoog D.A., Holler F.J., Nieman, T.A., *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª Ed. Porto Alegre, Bookman, **2002**.
- [80] Santos W.T.P., *Estudos para a determinação amperométrica de nitrofosforados totais em águas em sistema de análise por injeção em fluxo*, Dissertação de Mestrado; Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, **2007**.
- [81] Santos W.T.P., ALMEIDA E.G.N., Richter E.M., Gimenes D.T., *Simple flow injection amperometric system for simultaneous determination of dipyrone and paracetamol in pharmaceutical formulations*, Journal of the Brazilian Chemical Society, 00, **2009**, 1-7.
- [82] Santos W.T.P., de Almeida E.G.N., Ferreira H.E.A., Gimenes D.T., Richter E.M., *Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection*, Electroanalysis, 20, **2008**, 1878-1883.
- [83] Lo Coco F., Filippi F.M., Montaldo D., Lanuzza F., *Determination of glucose, fructose, sucrose, and lactose in chocolate based matrices using HPIC with pulsed amperometric detection*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 29, **2006**, 2733-2739.
- [84] Li C.Y., Wang C.F., Ma Y., Bao W., Hu S.H., *A novel amperometric sensor and chromatographic detector for determination of parathion*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 381, **2005**, 1049-1055.
- [85] Gimenes D.T., Dos Santos W.T.P., Tormin T.F., Miranda J.Y., Richter E.M., *Determinação indireta de dopamina na presença de altas concentrações de ácido ascórbico usando FIA com detecção amperométrica*, XVII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA, Fortaleza-CE, **2009**.
- [86] Bard A.J.F.L.R., John Wiley & Sons, *Electrochemical Methods*, New York, **1980**.
- [87] Ribani I. M., Bottoli C.B.G., Collins C.H., Jardim I.C.S.F., Melo L.F.C., *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*, Química Nova, 27, **2004**.
- [88] Instituto Nacional de Metrologia, *Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)*; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, **2003**.
- [89] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Resolução RE nº 899, de 29/05/2003*.
- [90] Skoog, *Fundamentos de Química Analítica* - Tradução da 8ª edição norte-americana, Cengage Learning, São Paulo, **2006**.

- [91] Santos W.T.P., Ceolin M.P., de Albuquerque Y.D.T., Richter E.M., *Uso da pressão gerada por uma coluna de água para controle da vazão em sistemas de análises em fluxo*, Química Nova, 30, **2007**, 1754-1758.
- [92] Eiras S.d.P., *Determinação Catalítica de Molibdênio em Plantas, usando Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado com Detecção Espectrofotométrica*, Tese de Doutorado; Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, **1991**.
- [93] Pedrotti J.J., Angnes L., Gutz I.G.R., *Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions*, Electroanalysis, 8, **1996**, 673-675.
- [94] Mark H.B., Zhang H., Lunsford S.K., Ceylan O., Khaskelis A.I., Atta N., Galal A., Hausner S., Robinson J.F., Russell G.C., Zimmer H., Kreishman G.P., *Synergetic effects in the flow injection analysis determination of catechol in the presence of excess ascorbic acid by series dual-band amperometric detection*, Analytica Chimica Acta, 385, **1999**, 281-285.
- [95] Luczak T., *Electrochemical oxidation of dopamine in the presence of secondary amine. An alternative way for quantitative dopamine determination at a gold electrode*, Electroanalysis, 20, **2008**, 1639-1646.
- [96] Ke N.J., Lu S.-S., Cheng S.-H., *A strategy for the determination of dopamine at a bare glassy carbon electrode: p-Phenylenediamine as a nucleophile*, Electrochemistry Communications, 8, **2006**, 1514-1520.
- [97] Mahan B.M., Myers R.J., *Química um Curso Universitário*, São Paulo, **1995**.
- [98] Paixao T., Richter E.M., Brito-Neto J.G.A., Bertotti M., *The use of a new twin-electrode thin-layer cell to the study of homogeneous processes coupled to electrode reactions*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 596, **2006**, 101-108.
- [99] Mo J.-W., Ogorev B., *Simultaneous Measurement of Dopamine and Ascorbate at Their Physiological Levels Using Voltammetric Microprobe Based on Overoxidized Poly(1,2-phenylenediamine)-Coated Carbon Fiber*, Analytical Chemistry, 73, **2001**, 1196-1202.
- [100] ASLANOGLU M., KUTLUAY A., ABBASOGLU S., KARABULUT S., *A Poly(3-acetylthiophene) Modified Glassy Carbon Electrode for Selective Voltammetric Measurement of Uric Acid in Urine Sample*, Chemical Pharmaceutical Bulletin, 56(3), **2008**, 282-286.
- [101] Xiao L., Chen J., Cha C.-s., *Elimination of the interference of ascorbic acid in the amperometric detection of biomolecules in body fluid samples and the simple detection of uric acid in human serum and urine by using the powder microelectrode technique*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 495, **2000**, 27-35.
- [102] Beitollahi H., Mazloun Ardakani M., Naeimi H., Ganjipour B., *Electrochemical characterization of 2, 2 '-[1, 2-ethanediylbis (nitriloethylidyne)]-bis-hydroquinone-carbon nanotube paste electrode and its application to simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and uric acid*, Journal of Solid State Electrochemistry, 13, **2009**, 353-363.
- [103] Zhang L., Zhang C.H., Lian J.Y., *Electrochemical synthesis of polyaniline nano-networks on p-aminobenzene sulfonic acid functionalized glassy carbon electrode Its use for the simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid*, Biosensors & Bioelectronics, 24, **2008**, 690-695.
- [104] Yao H., Sun Y.Y., Lin X.H., Tang Y.H., Huang L.Y., *Electrochemical characterization of poly(eriochrome black T) modified glassy carbon electrode and its application to simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid*, Electrochimica Acta, 52, **2007**, 6165-6171.
- [105] Gao Z.N., Peng J., Han X.X., *Electrochemical behavior of ascorbic acid and uric acid in the presence of micelles and their selective determination application*, Polish Journal of Chemistry, 81, **2007**, 441-454.
- [106] Peng J., Gao Z.N., *Electrochemical behaviors of ascorbic acid and uric acid in micellar aqueous and their selective determination*, Chinese Journal of Analytical Chemistry, 34, **2006**, 817-820.