



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

**Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos empregando análise por injeção em
batelada para a determinação de nafazolina, zinco, feniramina e clorfeniramina em
formulações farmacêuticas**

THIAGO DA COSTA OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado

UBERLÂNDIA

Julho
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos empregando análise por injeção em batelada para a determinação de nafazolina, zinco, feniramina e clorfeniramina em formulações farmacêuticas

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

Aluno: Thiago da Costa Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Área de concentração: Química Analítica

Julho

2015

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

- O48d
2015 Oliveira, Thiago da Costa, 1989-
Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos empregando análise por injeção em batelada para a determinação de nafazolina, zinco, feniramina e clorfeniramina em formulações farmacêuticas / Thiago da Costa Oliveira. - 2015.
109 f. : il.
- Orientador: Eduardo Mathias Richter.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.
1. Química - Teses. 2. Voltametria - Teses. 3. Análise por injeção em batelada - Teses. I. Richter, Eduardo Mathias. II. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.



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



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 223/PPQUI.

DATA: 24/07/2015

DISCENTE: Thiago da Costa Oliveira

MATRÍCULA: 11322QMI011

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos empregando análise por injeção em batelada para a determinação de nafazolina, zinco, feniramina e clorfeniramina em formulações farmacêuticas.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de métodos de análise com características portáteis envolvendo técnicas eletroanalíticas e eletroforese capilar para aplicações em áreas do agronegócio, alimentícia, ambiental, biocombustíveis e farmacêutica.

Às quatorze horas do dia vinte e quatro de julho do ano dois mil e quinze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Marcio Fernando Bergamini, da Universidade Federal do Paraná, Djenaine de Souza, da UFU, Campus de Patos de Minas e Eduardo Mathias Richter, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provoy o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 15 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 00 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Marcio Fernando Bergamini

UFPR

Profª Dra. Djenaine de Souza

UFU

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

Universidade Federal de Uberlândia - Avenida João Naves de Ávila, nº 2121, Bairro Santa Mônica - 38.408-144 - Uberlândia - MG

*Aos meus pais, Luzia e Marcio, pelo incentivo,
dedicação, apoio, carinho e amor incondicionais.
Aos meus irmãos, Nayara e João Vitor, pelo carinho.
Ao meu orientador, Eduardo, pelo conhecimento
compartilhado e paciência.
Aos meus amigos Jhonys, Pâmela, Marco Túlio e Alysson,
pelos dias deliciosos.*

AGRADECIMENTOS

- ✚ À Deus, por tudo.
- ✚ À minha família, Luzia, Marcio, Nayara e João Vítor, por acreditarem em mim, e por serem minha base.
- ✚ Ao meu orientador, Prof. Eduardo Richter, pela confiança, paciência, orientação e pelo conhecimento.
- ✚ Ao Prof. Rodrigo Muñoz, pelo apoio durante o trabalho.
- ✚ Ao meu amigo, Jhonys (Xonys, Shiryu Amigo!), pela amizade sólida desde a graduação, pela presença e incentivos constantes e pelos ensinamentos.
- ✚ À Pâmela (Tushy, Pandora), pela amizade, por acreditar em mim, pelos risos e pelas longas, porém revigorantes, conversas diárias.
- ✚ Aos Extraordinários (Cláudio, Marcelo, Marco Túlio, Dominike e Flávio), pela companhia descontraída, pelas risadas e palavras de apoio.
- ✚ Às minhas amigas: Polliana, Nath, Renatinha, Ana Paula, Tobi, Dri (Japa), Let, Ju, Samantha, Fabi, Adriana (Milagre), pelas risadas, apoio e carinho.
- ✚ Aos amigos do NUPE, pela amizade e momentos de descontração, ajuda e discussões: André Luis, Rodrigo (Banana), David, Denise, Gracy, Jéssica, Laiz, Mariana, Michelle, Rafael Melo, Rafael (Pisquilha), Thiago Tormin, Weberson, Almir, Denise Sales, Luiz André, Dalyelli, Eduardo, Polyana, Danielle, Ana Paula, Poliana Freire, Jian, Clarice, Helieder, Alexandre e a todos que não estão citados aqui.
- ✚ Aos Tops (Laiz, Juh, Kel, Breno, Samuka, Dri e Lê) pelo incentivo, carinho e apoio.
- ✚ Aos professores do IQ-UFU que contribuíram para a minha formação.
- ✚ Aos técnicos e secretários do IQ-UFU e das coordenações pela ajuda sempre que necessário.
- ✚ Aos membros da banca pela aceitação e contribuições a serem concedidas para o aprimoramento deste trabalho.
- ✚ À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.
- ✚ Ao IQ-UFU pelo espaço físico concedido.

We'll see how brave you are...

We'll see how fast you've been running...

We'll see how brave you are...

Yes, Anastasia.

(Tori Amos)

RESUMO

No presente trabalho investigou-se a potencialidade do sistema de análise por injeção em batelada com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV) para determinação simultânea de Zn e nafazolina (NAF) e do sistema análise por injeção em batelada com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (BIA-MPA) para determinação simultânea de NAF e feniramina (FEN) ou NAF e clorfeniramina (CLO). Em ambos os métodos, diamante dopado com boro (BDD) foi usado como eletrodo de trabalho.

Para determinação simultânea de Zn e NAF empregando BIA-SWV, as seguintes condições foram otimizadas: eletrólito de suporte: tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,7$), volume de injeção: $100 \text{ }\mu\text{L}$, tempo de deposição (Zn): 5 s, potencial de deposição (Zn): $-1,5 \text{ V}$, f : 100 s^{-1} , α : 60 mV , ΔE_s : 6 mV . Nestas condições, o método apresentou faixa linear de resposta entre 10 e $60 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ para Zn ($r = 0,992$) e entre $3,0$ e $21 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ para NAF ($r = 0,999$), frequência analítica de $70 \text{ injeções h}^{-1}$ e limites de detecção de $0,126 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,04 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ para Zn e NAF, respectivamente. No estudo de repetibilidade ($n = 20$), os DPRs foram calculados $0,98\%$ e $0,97\%$ para Zn e NAF, respectivamente.

A determinação simultânea de NAF e FEN ou NAF e CLO por BIA-MPA foi realizada através da aplicação de dois pulsos de potenciais em função do tempo ao eletrodo de BDD usando tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 10$) como eletrólito suporte. Em $+1,1 \text{ V}/50 \text{ ms}$, FEN ou CLO foram oxidadas livre da interferência de NAF. Em $+1,3 \text{ V}/50\text{ms}$, ambos os compostos (NAF + FEN ou NAF + CLO) foram oxidados. A corrente proveniente da oxidação da NAF foi obtida pela subtração entre as correntes detectadas em ambos os pulsos de potenciais com auxílio de um fator de correção (FC). O método proposto apresentou boa estabilidade (DPR = $1,7$ e $3,95\%$ para FEN e NAF; $2,1$ e $3,6\%$ para CLO e NAF, respectivamente; $n=20$), alta frequência analítica ($110 \text{ injeções h}^{-1}$), faixa linear de resposta entre 16 e $100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ para FEN e CLO ($r > 0,996$) e entre 2 e $15 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ para NAF ($r > 0,997$). Os limites de detecção foram de $0,367$, $0,361$ e $0,148 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ para FEN, CLO e NAF, respectivamente.

Os métodos propostos foram usados na determinação destes compostos em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos com os métodos propostos foram estatisticamente similares aos obtidos por HPLC (NAF, FEN e CLO) ou absorção atômica (Zn).

Palavras-chave: Voltametria de onda quadrada (SWV). Análise por injeção em batelada (BIA). Amperometria de múltiplos pulsos (MPA). Diamante dopado com boro (BDD). Nafazolina. Zinco. Feniramina. Clorfeniramina.

ABSTRACT

In this work we investigated the potentiality of batch injection analysis with square-wave voltammetry (BIA-SWV) detection for simultaneous determination of Zn and naphazoline (NAF) and batch injection analysis with multiple pulse amperometric (BIA-MPA) detection for simultaneous determination of NAF and pheniramine (FEN) or NAF and chlorpheniramine (CLO). In both methods, boron-doped diamond (BDD) was used as working electrode.

For the simultaneous determination of Zn and NAF by BIA-SWV, the following conditions have been optimized: supporting electrolyte: acetate buffer 0.05 mol L⁻¹ (pH = 4.7), injection volume: 100 µL, deposition time (Zn): 5 s, deposition potential (Zn) -1.5 V, f : 100 s⁻¹, a : 60 mV, ΔE_s : 6 mV. Under these conditions, the method showed linear response range between 10 and 60 µmol L⁻¹ for Zn ($r = 0.992$) and between 3.0 e 21 µmol L⁻¹ for NAF ($r = 0.999$), high analytical frequency (70 injections h⁻¹) and LOD of 0.126 µmol L⁻¹ and 0.04 µmol L⁻¹ for Zn and NAF, respectively. In the study of repeatability ($n = 20$), the calculated RSD were 0.98% and 0.97% for Zn and NAF, respectively.

The simultaneous determination of NAF and FEN or NAF and CLO by BIA-MPA was performed with the application of three sequential pulses in function of time to the BDD electrode using Britton-Robinson Buffer solution 0.12 mol L⁻¹ (pH = 10.0) as supporting electrolyte. At +1.1 V/50 ms, FEN or CLO was detected (oxidation) without interference of NAF. At +1.3 V/50 ms, both compounds (FEN + NAF or CLO + NAF) were oxidized. The current of NAF can then be obtained by subtraction of the currents detected during application of both potential pulses using a correction factor. The proposed method presented good ability (RSD = 1.7 and 4.0% for FEN and NAF; 2.1% and 3.6% for CLO and NAF, respectively; $n=20$); high analytical frequency (110 injections h⁻¹), linear concentration range between 16 e 100 µmol L⁻¹ for FEN and CLO ($r > 0.996$) and between 2 e 15 µmol L⁻¹ for NAF ($r > 0.997$). The LOD calculated were 0.367, 0.361 e 0.148 µmol L⁻¹, for FEN, CLO and NAF, respectively.

The proposed methods were used for determination of these compounds in pharmaceutical samples. The obtained results were statistically similar to that obtained by HPLC (NAF, FEN and CLO) and atomic spectroscopy (Zn).

Keywords: Square-wave voltammetry (SWV). Batch injection analysis (BIA). Multiple pulse amperometry (MPA). Boron-doped diamond (BDD). Naphazoline. Zinc. Pheniramine. Chlorpheniramine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da nafazolina (NAF).....	22
Figura 2. Fórmula estrutural do sulfato de zinco.....	23
Figura 3. Fórmula estrutural da feniramina (FEN).....	25
Figura 4. Fórmula estrutural da clorfeniramina (CLO).....	25
Figura 5. Fórmula estrutural da histamina.....	26
Figura 6. Imagens de MEV de um diamante microcristalino dopado com boro (esquerda) e um diamante nanocristalino dopado com boro, ambos obtidos sobre Si.....	28
Figura 7. Diagrama de energia para o diamante, com os níveis dos dopantes adicionados ao bandgap.....	30
Figura 8. Representação de um dos planos de crescimento do filme de diamante CVD, com terminações em átomos de hidrogênio, evoluindo de uma estrutura com alta energia estérica devida aos átomos de hidrogênio vizinhos (a), passando pelo intermediário (b), até chegar a estrutura mais estável (c).	31
Figura 9. Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica, adaptada para o uso com eletrodo de diamante dopado com boro.....	32
Figura 10. Etapas de operação de um sistema BIA e resultado obtido.	33
Figura 11. Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.	36
Figura 12. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada. (A) Componentes de corrente de um processo redox reversível e (B) de um processo irreversível.	37
Figura 13. Etapas na voltametria de redissolução anódica.....	39
Figura 14. Voltamograma de redissolução para mistura contendo 1×10^{-8} mol L ⁻¹ de Zn, Cd, Pb e Cu.	40
Figura 15. Esquema de aplicação de 9 pulsos de potenciais e respectivos amperogramas obtidos.	42
Figura 16. Célula de polipropileno utilizada nos experimentos estacionários com eletrodo de BDD posicionado no fundo da mesma.	49
Figura 17. (A) Esquema da célula BIA utilizada no trabalho; (B) Imagem da célula BIA.....	50

Figura 18. (A) Sistema de agitação para célula BIA; (B) Pipeta motorizada utilizada para as injeções no sistema BIA.	51
Figura 19. Voltamogramas cíclicos obtidos para 1,0 mmol L ⁻¹ de NAF em diferentes eletrólitos de suporte usando BDD como eletrodo de trabalho. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . Incremento de potencial: 5 mV.	57
Figura 20. Voltamogramas de onda quadrada com redissolução anódica obtidos para solução contendo 30 µmol L ⁻¹ de Zn. Eletrólito de suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ (—) ou HAc/NaAc 0,05 mol L ⁻¹ (—). Eletrodo de trabalho: BDD; Tempo e potencial de deposição: 20 s e -1,5 V; $f = 50 \text{ s}^{-1}$; $a = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$	58
Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos para oxidação de NAF 100 µmol L ⁻¹ sobre eletrodo de BDD em função de diferentes velocidades de varredura. Eletrólito de suporte: HAc/NaAc 0,05 mol L ⁻¹ (pH = 4,7).	59
Figura 22. Relação entre corrente de pico e velocidade de varredura para voltamogramas cíclicos para NAF 100 µmol L ⁻¹ sobre BDD em tampão acetato 0,05 mol L ⁻¹ pH 4,7. (A): I_p vs. $v^{1/2}$. (B): $\log I_p$ vs. $\log v$	60
Figura 23. Relação entre E_p e $\log v$ para os voltamogramas exibidos na Figura 21	61
Figura 24. Comparação entre os voltamogramas de onda quadrada com redissolução anódica obtidos para solução contendo 50 µmol L ⁻¹ de Zn e 20 µmol L ⁻¹ de NAF após a realização da ativação catódica (—) e anódica (—) do eletrodo de BDD. Eletrólito: HAc/NaAc (pH 4,7) 0,05 mol L ⁻¹ ; $f = 100 \text{ s}^{-1}$; $a = 60 \text{ mV}$; incremento de potencial = 6 mV.	62
Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada com redissolução anódica obtidos para 30 µmol L ⁻¹ de Zn em função do potencial de deposição. Eletrodo de trabalho: BDD; Eletrólito suporte: HAc/NaAc 0,05 mol L ⁻¹ (pH 4,7). Velocidade de agitação: 1250 rpm; Tempo de deposição: 20 s; $f = 50 \text{ s}^{-1}$; $a = 25 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$	63
Figura 26. Voltamogramas de onda quadrada com redissolução anódica obtidos para solução contendo 30 e 10 µmol L ⁻¹ de Zn e NAF, respectivamente, em função do tempo de deposição. Eletrodo de trabalho: BDD; $E_{\text{dep}} = -1,5 \text{ V}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$	64
Figura 27. Relação entre as áreas dos picos de Zn (30 µmol L ⁻¹) e NAF (10 µmol L ⁻¹) versus o tempo de deposição (t_{dep}). Dados da Figura 26	64
Figura 28. Voltamogramas obtidos para 30 µmol L ⁻¹ de Zn sobre BDD em diferentes velocidades de injeção. Demais condições experimentais: idem Figura 25	65

Figura 29. Voltamogramas obtidos para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de Zn (10 - 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito: HAc/NaAc (pH 4,7) 0,05 mol L^{-1} T_{dep} : 30 s; E_{dep} : -1,5 V; volume de injeção: 100 μL ; velocidade de injeção: 28,3 $\mu\text{L s}^{-1}$	66
Figura 30. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para NAF 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potencial (B) Relação entre potencial de pico e a frequência de aplicação de pulso. Eletrólito: tampão HAc/NaAc 0,05 mol L^{-1} ; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	67
Figura 31. Relações entre corrente de pico e frequência aplicação dos pulsos para NAF 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtidas a partir dos voltamogramas da Figura 30 (A): I_p vs. f , (B): I_p vs. $f^{1/2}$	68
Figura 32. Relações entre I_p/f vs f para caracterização do máximo quase-reversível para NAF 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtidas a partir dos voltamogramas da Figura 30.	69
Figura 33. (A): Voltamogramas de onda quadrada obtidos para 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em função da variação nos valores de amplitude de pulso de potencial aplicados. (B): Relação entre corrente de pico e amplitude de pulsos. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	70
Figura 34. (A): Voltamogramas de onda quadrada obtidos para NAF 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes incrementos de potencial. (B) Relação entre a corrente de pico e a variação do incremento de varredura. Eletrólito: HAc/NaAc (pH 4,7) 0,05 mol L^{-1} . $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$	71
Figura 35. Voltamogramas de onda quadrada obtidos com solução contendo NAF 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com a separação das componentes de corrente. Eletrodo de trabalho: BDD Eletrólito: HAc/NaAc (pH 4,7) 0,05 mol L^{-1} ; $f = 100 \text{ s}^{-1}$; $a = 60 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$	72
Figura 36. Resultados obtidos por BIA-SWV para injeções sucessivas de soluções contendo 30 + 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (A) e 60 + 20 (B) $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e NAF, respectivamente ($n = 20$). t_{dep} : 5 s; E_{dep} : -1,5 V; volume de injeção: 100 μL ; velocidade de injeção: 28,3 $\mu\text{L s}^{-1}$	73
Figura 37. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para soluções contendo concentrações crescentes de NAF (5 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e constante de Zn (60 $\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Variação das áreas do pico de NAF (●) e Zn (■).	74
Figura 38. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para soluções contendo concentrações crescentes de Zn (10 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e constante de NAF (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Variação das áreas do pico de NAF (●) e Zn (■).	74
Figura 39. Voltamogramas de onda quadrada obtidas para injeções do soluções contendo concentrações crescentes de Zn e NAF. Condições experimentais: idem Figura 36.	75

Figura 40. Curvas de calibração obtidas para Zn (A; $r = 0,992$) e NAF (B; $r = 0,999$) a partir dos dados analíticos da Figura 39	76
Figura 41. Voltamogramas cíclicos obtidos para solução contendo $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de NAF em tampão BR com diferentes valores de pH (2 a 8) e 1 mmol L^{-1} (pH 10). Eletrodo de trabalho: BDD; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; ΔE_s : 5 mV	78
Figura 42. Voltamogramas cíclicos obtidos para solução contendo de 1 mmol L^{-1} de FEN em tampão BR com diferentes valores de pH (2 a 10). Eletrodo de trabalho: BDD; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; ΔE_s : 5 mV	79
Figura 43. Voltamogramas cíclicos para oxidação de 1 mmol L^{-1} de CLO em tampão BR com diferentes valores de pH (2 a 10). Eletrodo de trabalho: BDD; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; ΔE_s : 5 mV	79
Figura 44. (A) Relação entre potencial de oxidação (E_{ox}) versus pH e, (B) Relação entre corrente de pico (I_p) versus pH para NAF, FEN e CLO, em tampão BR.....	80
Figura 45. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos soluções contendo 1 mmol L^{-1} de NAF e FEN; (B) Voltamogramas cíclicos obtidos soluções contendo 1 mmol L^{-1} de NAF e CLO. Eletrólito suporte: tampão BR pH 10, velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	81
Figura 46. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos com o sistema BIA-MPA para (A) NAF (■; $12 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e FEN (▲; $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), e (B) NAF (■; $12 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e CLO (●; $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms . Eletrólito de suporte: tampão BR pH 10. Velocidade de injeção: $75 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado: $150 \text{ } \mu\text{L}$	82
Figura 47. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD. (B) Amperogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo $12 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF, $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de FEN e mistura dos dois compostos (NAF + FEN) nas mesmas concentrações anteriores. Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms ; Demais condições experimentais iguais a Figura 46	83
Figura 48. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD. (B) Amperogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo $12 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF, e $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de CLO e mistura dos dois compostos (NAF + CLO) nas mesmas concentrações anteriores. Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms . Demais condições experimentais iguais a Figura 46	84

- Figura 49.** Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA sem (a), e com aumento gradativo da velocidade de agitação da solução contida na célula BIA: 700 rpm (b), 1000 rpm (c), 1200 rpm (d), 1400 rpm (e) e 1800 rpm (f). Concentração de FEN: $80 \mu\text{mol L}^{-1}$; volume e velocidade de injeção: $100 \mu\text{L}$ e $75 \mu\text{L s}^{-1}$, respectivamente.....86
- Figura 50.** Variação da corrente de oxidação da FEN e do FC em função do volume injetado **(A)** e da velocidade de injeção **(B)**. Condições: Velocidade de injeção: $75 \mu\text{L s}^{-1}$ em (A); Volume injetado: $100 \mu\text{L}$ em (B); Concentração de FEN: $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ 87
- Figura 51.** FC ($I_{+1,3V} / I_{+1,1V}$) calculados para injeções de soluções contendo concentrações crescentes ($10,0$ a $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ para ambos) de FEN **(A)** e de CLO **(B)**. Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms ; Eletrólito suporte: BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10 ; Vazão: $75 \mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado: $150 \mu\text{L}$ 89
- Figura 52.** Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de solução contendo $16 + 2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) e $120 + 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b) de FEN e NAF, respectivamente ($n=10$). Eletrólito suporte: BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10 ; Vazão: $75 \mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado: $150 \mu\text{L}$ 90
- Figura 53. (A)** Escada de potencial aplicada ao eletrodo BDD em função do tempo. **(B)** Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo $16 + 2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) e $120 + 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b) de FEN e NAF, respectivamente ($n = 20$). 92
- Figura 54. (A)** Escada de potencial aplicada ao eletrodo BDD em função do tempo. **(B)** Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo $16 + 2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) e $120 + 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b) de CLO e NAF, respectivamente ($n = 20$). 93
- Figura 55.** Amperogramas obtidos para injeções de uma solução contendo somente FEN ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$), seis soluções (a-f; $f^{\circ}-a^{\circ}$) contendo simultaneamente FEN ($16 - 120 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF ($2 - 15 \mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras adequadamente diluídas (g e h). (A e B), respectivas curvas de calibração obtidas para FEN e NAF.. 94
- Figura 56.** Amperogramas obtidos para injeções de uma solução contendo somente CLO ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$), seis soluções (a-f; $f^{\circ}-a^{\circ}$) contendo simultaneamente CLO ($16 - 120 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF ($2 - 15 \mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras adequadamente diluídas (g e h). (A e B), respectivas curvas de calibração obtidas para CLO e NAF.....95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros instrumentais para determinação de zinco por FAAS.	52
Tabela 2. Lista de reagentes usados no presente trabalho e sua respectiva procedência.....	52
Tabela 3. Características analíticas do método proposto.....	77
Tabela 4. Comparação dos resultados (média $\pm$ DP; n = 3) obtidos para a determinação de Zn e NAF em amostras farmacêuticas usando o método proposto versus FAAS e HPLC.	77
Tabela 5. Comparação dos RSD obtidos em diferentes potenciais de limpeza.....	91
Tabela 6. Características analíticas do método proposto para determinação de FEN + NAF.	96
Tabela 7. Características analíticas do método proposto para determinação de CLO + NAF.	97
Tabela 8. Resultados (média $\pm$ DP; n = 3) obtidos para a determinação de FEN e NAF em amostras farmacêuticas usando o método proposto.	97
Tabela 9. Resultados (média $\pm$ DP; n = 3) obtidos para a determinação de CLO e NAF em amostras farmacêuticas usando o método proposto.	97

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α – Amplitude de aplicação do pulso de potencial

ASV – Voltametria de redissolução anódica, do inglês “*Anodic Stripping Voltammetry*”

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

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

BR – Tampão Britton-Robbinson

CE – Eletroforese capilar, do inglês, “*Capillary electrophoresis*”

CLO – Clorfeniramina

CV – Voltametria cíclica, do inglês “*Cyclic voltammetry*”

CVD – Deposição química em fase vapor, do inglês, “*Chemical vapour deposition*”

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

DPV – Voltametria de pulso diferencial, do inglês, “*Differential pulse voltammetry*”

E_{dep} – Potencial de deposição

E_p – Potencial de pico

ET – Eletrodo de trabalho

f – Frequência de aplicação do pulso de potencial

FAAS – Espectroscopia de absorção atômica, do inglês, “*Flame atomic absorption*”

FC – Fator de correção

FEN- Feniramina

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

GC – Cromatografia gasosa, do inglês, “*Gas chromatography*” ou carbono vítreo, do inglês “*Glassy carbon*”

HAc / NaAc – Tampão acetato

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, “*High performance liquid chromatography*”

I_c – Corrente capacitiva

I_F – Corrente faraica

I_p – Corrente de pico

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

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

NAF – Nafazolina

Ø – Diâmetro

PCR – Regressão em componentes principais, do inglês “*Principal component regression*”

PLS – Mínimos quadrados parciais, do inglês “*Partial least squares*”

ppm – partes por milhão

rpm – Rotação por minuto

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês, “*Relative standard deviation*”

SCE – Eletrodo de calomelano saturado, do inglês “*Saturated calomel electrode*”

SPE – Eletrodos impressos, do inglês, “*Screen printed electrodes*”

SWASV – Voltametria de onda quadrada com redissolução anódica, do inglês “*Square Wave Anodic Stripping Voltammetry*”

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

t_{dep} – Tempo de deposição

UV-VIS – Ultravioleta / Visível

v – Velocidade de varredura

α – Coeficiente de transferência de elétrons

ΔE_s – Incremento de potencial

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Considerações iniciais.....	21
1.2 Espécies químicas estudadas.....	21
1.2.1 Nafazolina	21
1.2.2 Sulfato de zinco como agente adstringente oftálmico.....	23
1.2.3 Feniramina e clorfeniramina	24
1.3 Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)	27
1.4 Análise por injeção em batelada (BIA).....	32
1.5 Voltametria de onda quadrada (SWV).....	35
1.6 Voltametria de redissolução anódica (ASV).....	38
1.7 Amperometria	40
1.8 Determinações simultâneas com detecção eletroquímica.....	45
2 OBJETIVOS	47
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	48
3.1 Instrumentação	48
3.1.1 Detecção eletroquímica	48
3.1.2 Eletrodo de trabalho	48
3.1.3 Eletrodo de referência e eletrodo auxiliar	48
3.1.4 Célula eletroquímica para medidas estacionárias.....	49
3.1.5 Sistema BIA	49
3.1.6 Análises comparativas por cromatografia líquida	51
3.1.7 Análises comparativas por absorção atômica.....	52
3.2 Soluções, reagentes e preparação das amostras	52
3.3 Parâmetros analíticos utilizados nos métodos propostos	53
3.3.1 Limite de detecção	53
3.3.2 Limite de quantificação	54
3.3.3 Repetibilidade.....	54
3.3.4 Adição e recuperação	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1 Considerações gerais.....	56
4.2 Parte I - Determinação simultânea de Zn e NAF em BIA empregando voltametria de onda quadrada	56

4.2.1 Estudos do comportamento eletroquímico da NAF por voltametria cíclica	56
4.2.2 Escolha do eletrólito de suporte	57
4.2.3 Efeito da ativação do eletrodo de BDD no sinal voltamétrico de Zn e NAF	61
4.2.4 Seleção do potencial de deposição	62
4.2.5 Tempo de deposição	63
4.2.6 Velocidade de injeção	65
4.2.7 Linearidade	65
4.2.8 Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada	66
4.2.8.1 Frequência de aplicação de pulsos de potenciais	67
4.2.8.2 Amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais	69
4.2.8.3 Incremento de varredura	70
4.2.8.4 Componentes de correntes	71
4.2.9 Repetibilidade	72
4.2.10 Estudo de interferência entre Zn e NAF	73
4.2.11 Aplicação do sistema BIA-SWV na análise simultânea de Zn e NAF em formulações farmacêuticas	75
4.3 Parte II - Estudos para a determinação simultânea de NAF e FEN ou NAF e CLO por BIA-MPA	78
4.3.1 Comportamento eletroquímico de NAF, FEN e CLO	78
4.3.2 Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de NAF e FEN ou CLO por BIA-MPA	82
4.3.3 Otimização de parâmetros hidrodinâmicos do sistema BIA-AMP	85
4.3.3.1 Velocidade de agitação	86
4.3.3.2 Volume e velocidade de injeção	87
4.3.4 Influência da concentração da FEN e CLO no FC	88
4.3.5 Estudo de repetibilidade do método	89
4.3.6 Aplicação do sistema BIA-MPA na análise simultânea de NAF e FEN ou NAF e CLO em formulações farmacêuticas	93
5 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

As indústrias farmacêuticas e os órgãos governamentais de regulamentação têm procurado garantir a qualidade dos medicamentos comercializados no país. Com este objetivo são usados métodos normatizados, tais como os descritos nas Farmacopéias. A técnica mais empregada no controle de qualidade de formulações farmacêuticas é a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (HPLC-UV). Contudo, a implementação de tais métodos requer instrumentação com elevado custo de aquisição e manutenção (grande consumo de solventes com elevado grau de pureza gerando considerável quantidade de resíduos). Além disto, tais métodos frequentemente requerem longas etapas de preparo de amostras. Dessa forma há uma demanda constante por métodos de controle de qualidade que, além de seguros e confiáveis, sejam simples, rápidos, de baixo custo, com geração do mínimo de resíduos químicos e que possam ser aplicados a um grande número de princípios ativos presentes em diferentes medicamentos. Nesse contexto, o sistema de análise por injeção em batelada (BIA, do inglês *“Batch Injection Analysis”*) (WANG; TAHA, 1991) tem sido explorado por apresentar várias destas características.

1.2 Espécies químicas estudadas

No presente trabalho foram estudados quatro compostos (nafazolina, zinco, feniramina e clorfeniramina) empregados como princípios ativos em formulações farmacêuticas comercializadas sem receita médica. Considerando estes princípios ativos, três combinações são comercializadas: (i) nafazolina + zinco: encontrados em colírios; (ii) feniramina + nafazolina: encontrados em combinação em colírios ou descongestionantes nasais; (iii) clorfeniramina + nafazolina: encontrados em descongestionantes nasais.

1.2.1 Nafazolina

Nafazolina (**Figura 1**), nome usual do 2-(1-naftilmetil)-4,5-dihidro-1H-imidazol, comumente encontrado na forma de cloridrato, com fórmula molecular $C_{14}H_{14}N_2.HCl$, é um derivado imidazólico frequentemente utilizado como descongestionante tópico de ação rápida e prolongada, nas vias nasal e ocular (BUCARETCHI; DRAGOSAVAC; VIEIRA, 2003). Atua

como vasoconstritor nos receptores α nas arteríolas do tecido conjuntivo, o que promove alívio sintomático da congestão nasal, auxilia na drenagem das secreções, facilita a rinoscopia e controla a hiperemia (vermelhidão) em pacientes com vascularidade superficial na córnea. Também é utilizada em irritações oculares superficiais e inchaço local da membrana da mucosa nasal. A ação descongestionante da nafazolina inicia-se em torno de 10 minutos após a administração tópica, podendo durar até seis horas (HERBERTS et al., 2006)

Os sintomas característicos da intoxicação por nafazolina, provocada pela administração tópica excessiva ou ingestão oral, são sonolência, sudorese, hipotensão ou choque, bradicardia, depressão respiratória e coma (BUCARETCHI; DRAGOSAVAC; VIEIRA, 2003). Em função dos sintomas ocasionados pela superdosagem, a ANVISA, agência nacional de vigilância sanitária, recomenda a utilização de fármacos que contenham NAF somente por adultos (ANVISA, 2013).

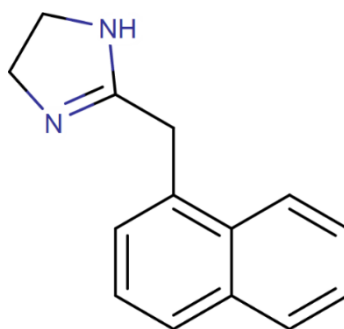


Figura 1. Fórmula estrutural da nafazolina (NAF). Fonte: Chemicalize.org.

Na literatura são relatados diversos métodos para a determinação de NAF em formulações farmacêuticas, incluindo espectrofotometria (GOICOECHEA; OLIVIERI, 2002), HPLC-UV (SÀSÁ; AL-MOMANI; JALAL, 1990), eletroforese capilar (MARCHESINI et al., 2003), fluorescência (CASADO-TERRONES et al., 2005), fosforescência (DÍAZ et al., 2004).

Nos trabalhos de (EL-DIEN et al., 2012), eletrodos impressos (SPEs, do inglês “*screen printed electrodes*”) e eletrodos de pasta de carbono foram modificados com diferentes agentes de pareamento iônico e utilizados para a determinação de NAF em sua forma pura e em formulações farmacêuticas. Os SPEs exibiram comportamento nernstiano (slope = $55,4 \pm 2,2$ mV década⁻¹) na faixa de concentração entre $5,0 \times 10^{-7}$ e $3,5 \times 10^{-2}$, com limite de detecção de $2,51 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de NAF. Já os eletrodos de pasta de carbono também apresentaram comportamento nernstiano (slope = $59,6 \pm 1,3$ mV década⁻¹) na faixa de concentração entre $3,0 \times 10^{-7}$ e $2,5 \times 10^{-2}$, com limite de detecção de $3,16 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de NAF.

Nos trabalhos de (CHINIFOROSHAN; TABRIZI; POURRAHIM, 2014), a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV) empregando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de prata (I) com o ligante 4-nitrofenilciamida foi utilizada para determinação de NAF e dibucaína. Estudos realizados empregando voltametria cíclica apresentaram pico de oxidação irreversível em +0,5 V (vs eletrodo de calomelano saturado, SCE) para NAF. Já o limite de detecção encontrado para NAF empregando DPV foi de 0,009 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Em relação às determinações simultâneas envolvendo os analitos estudados nesse trabalho (NAF + Zn, NAF + FEN e NAF + CLO), trabalhos foram localizados na literatura empregando HPLC com detecção por UV-VIS (HUANG et al., 2014; SAYED et al., 2013) para determinação simultânea de NAF + FEN ou NAF + CLO. No entanto, não existe trabalho publicado que relate a determinação simultânea de NAF e Zn.

1.2.2 Sulfato de zinco como agente adstringente oftálmico

Os adstringentes oftálmicos são considerados agentes de ação moderada, uma vez que, ao contrário dos adstringentes tópicos para a pele, não se destinam a precipitar proteínas a fim de facilitar a sua remoção, mas simplesmente proporcionar um efeito calmante e de lavagem da superfície ocular. A sua forma de ação pode ser considerada como removedora da camada superficial de muco ocular, promovendo efeito calmante (DOUGHTY, 1997).

O sulfato de zinco (**Figura 2**) não é considerado um vasoconstritor, ainda que possa ocasionar alívio em irritações oculares leves e seja considerado como um agente bacteriostático de potencial moderado (SHIMAZAKI; SAKATA; TSUBOTA, 1995).

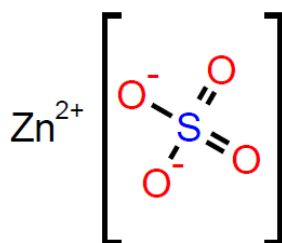


Figura 2. Fórmula estrutural do sulfato de zinco. Fonte: Chemicalize.org.

Os vasos da conjuntiva ocular respondem a qualquer forma de estresse através da dilatação. A vasodilatação pode ser geral e envolver apenas os vasos mais finos (hiperemia) ou

ser mais localizada e afetar os grandes vasos (vermelhidão e inchaço); em alguns casos, a natureza do estímulo irritante pode ser tal que todos os vasos estão envolvidos, ocasionando um estado intensificado de conjuntivite. (SCHMID; SCHMID, 2000). Os descongestionantes oculares contêm fármacos com atividade alfa adrenérgica (fenilefrina, nafazolina, xilometazolina), que atuam como vasoconstritores, clareando os olhos (BIELORY; FRIEDLAENDER, 2008).

O sulfato de zinco é amplamente empregado como componente essencial em diversas formulações oftálmicas, quer como único princípio ativo, quer combinado com NAF ou FEN (MANOURI et al., 1998). A eficácia de vasoconstritores e/ou anti-histamínicos de ação direta pode ser aumentada quando utilizado em combinação com sulfato de zinco (ação adstringente) (DOUGHTY, 1997).

Na literatura são relatadas diversas técnicas que permitem a determinação de Zn em formulações oftálmicas, dentre as quais podemos destacar a espectrofotometria (MANOURI et al., 1998), a voltametria de redissolução (LUTKA; BUKOWSKA, 2009), a polarografia (WAROWNA-GRZEŚKIEWICZ; FIJĄLEK, 1998) e espectroscopia de absorção atômica (MOODY; TAYLOR, 1972).

1.2.3 Feniramina e clorfeniramina

A Feniramina (FEN), nome usual da *N,N*-dimetil-3-fenil-3-piridin-2-il-propan-1-amina (**Figura 3**) e a clorfeniramina (CLO), nome usual da 3-(4-clorofenil)-*N,N*-dimetil-3-piridin-2-il-propan-1-amina (**Figura 4**) são anti-histamínicos clássicos que bloqueiam reversível, seletiva e competitivamente os receptores H₁, por apresentarem semelhança estrutural com a histamina. Estes compostos são utilizados em preparações para o tratamento de alergias e infecções respiratórias, rinite, erupções cutâneas e prurido (CRIADO et al., 2010).

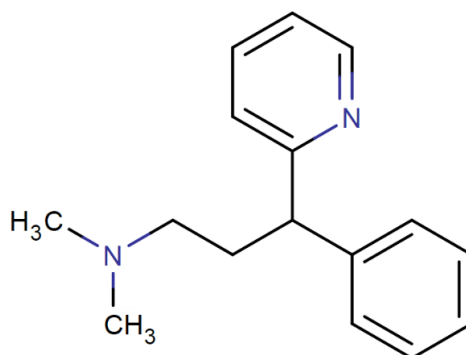


Figura 3. Fórmula estrutural da feniramina (FEN). Fonte: Chemicalize.org.

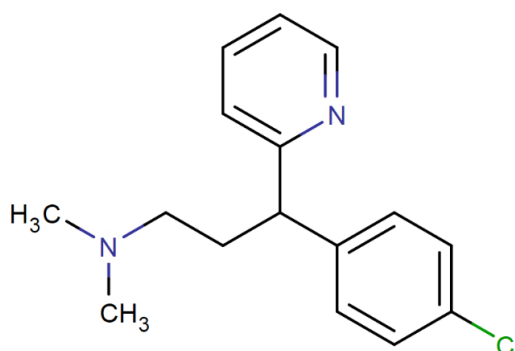


Figura 4. Fórmula estrutural da clorfeniramina (CLO). Fonte: Chemicalize.org.

A histamina (**Figura 5**) é uma amina de baixo peso molecular sintetizada a partir da L-histidina pela enzima histidina decarboxilase, que está presente em várias células incluindo neurônios, células parietais da mucosa gástrica, mastócitos e basófilos, e exerce seus efeitos nas doenças alérgicas através da ação em quatro tipos de receptores: H₁ (presente nos neutrófilos, eosinófilos, hepatócitos, células epiteliais, no músculo liso vascular, entre outros tecidos); H₂, (monócitos, células neurais, músculo liso vascular e vias aéreas, entre outros); H₃ (neurônios histaminérgicos) e H₄ (medula óssea, fibroblastos, no baço, pulmão, entre outros) em variados (CRIADO et al., 2010; PASTORINO, 2010).

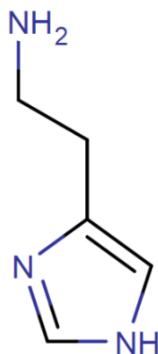


Figura 5. Fórmula estrutural da histamina. Fonte: Chemicalize.org.

No nariz, a histamina estimula as terminações nervosas sensoriais ocasionando prurido e espirros, aumenta a permeabilidade vascular, iniciando a formação de edema e de secreções glandulares (coriza). Na pele, provoca vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular (eritema e edema) e estimulação das terminações nervosas sensoriais (prurido). Nos pulmões pode causar, principalmente, a broncoconstrição (SIMONS, 2003). Além disto, as histaminas também estão envolvidas na multiplicação e diferenciação celular, hematopoiese (processo de formação, diferenciação e maturação dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas), desenvolvimento embrionário, regeneração e cicatrização de tecidos lesionados e na regulação do sistema imune pela ação nos receptores H₄ (CRIADO et al., 2010).

Os anti-histamínicos são classificados segundo o receptor com o qual interagem, sendo aqueles que atuam preferencialmente no receptor H₁ chamados anti-H₁. Os anti-H₁ estão entre os fármacos mais prescritos no mundo e, embora apresentem eficácia semelhante no tratamento de pacientes com rinoconjuntivite alérgica, urticária e outras doenças alérgicas, diferem de forma importante quanto à sua estrutura química, farmacologia clínica, potencial de toxicidade, e vem apresentando uma dramática evolução desde sua descoberta em 1937 (SIMONS, 2002).

Os primeiros anti-histamínicos, conhecidos como clássicos ou de primeira geração, foram produzidos na pesquisa de neurofarmacologia e possuíam grandes efeitos neuropsicológicos devido à sua habilidade em penetrar a barreira hemato-encefálica e pela sua não seletividade como antagonista de receptor da histamina, resultando em sonolência e efeitos adversos anticolinérgicos, antidopaminérgicos e antisserotoninérgicos. Na fase inicial de seu desenvolvimento, a pesquisa para novos anti-histamínicos levou à descoberta de antidepressivos tricíclicos e fenotiazídicos (BALBANI et al., 2001). Entre os primeiros anti-histamínicos destacam-se a difenidramina, tripelenamina, clorfeniramina e prometazina. Estas moléculas possuem efeitos colaterais comuns, como sonolência, sedação e fadiga que

promovem a redução das funções cognitivas, de memória e no desempenho psicomotor. Os efeitos anti-histamínicos no sistema nervoso central são primariamente os responsáveis pela toxicidade com potencial risco de vida desses agentes de primeira geração quando de superdosagem, os quais já eram descritos logo após sua introdução no uso clínico (PASTORINO, 2010)..

Vários métodos analíticos foram relatados para a determinação quantitativa de feniramina e clorfeniramina, incluindo espectrofotometria (ONUR, 2000), HPLC (DEWANI et al., 2012; PALABIYIK; ONUR, 2007), GC (MARTENS, 1995) e CE (MIKUŠ; VALÁŠKOVÁ; HAVRÁNEK, 2005; PHATTHIYAPHAIBUN et al., 2010).

Os trabalhos de (LAMANI et al., 2011) relatam a determinação de CLO empregando a técnica de DPV usando eletrodo de carbono vítreo modificado com dodecil sulfato de sódio. Estudos realizados com a técnica de voltametria cíclica apresentaram pico de oxidação irreversível em +0,85 V (vs SCE). Utilizando a técnica de DPV, o método proposto apresentou resposta linear entre $8,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $1,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Contudo, a determinação simultânea de NAF e FEN é relatada apenas por HPLC (HUANG et al., 2014), enquanto que a determinação simultânea de NAF e CLO já foi demonstrada ser possível por HPLC e por métodos espectrofotométricos (ALI et al., 2013; SAYED et al., 2013).

1.3 Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

Diamante dopado com boro (BDD, do inglês “*boron doped diamond*”) é um material a base de carbono que vem sendo usado com sucesso no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos de análise (CODOGNOTO; MACHADO; AVACA, 2002; DEROCO et al., 2014; FREITAS et al., 2015; HONÓRIO et al., 2014; KAPALKA; FÓTI; COMNINELLIS, 2007; LAWRENCE et al., 2006; LOURENÇÃO et al., 2009; SARTORI; MEDEIROS; FATIBELLO-FILHO, 2007). O material possui propriedades superiores a outras formas de carbono, que incluem (i) pequena e estável corrente de fundo ao longo de um amplo intervalo de potencial, (ii) ampla faixa de potencial de trabalho em meio aquoso, (iii) cinética relativamente rápida de transferência de elétrons para vários sistemas redox sem pré-tratamento convencional (polimento), (iv) baixa adsorção molecular, (v) estabilidade dimensional e resistência à corrosão, e (vi) transparência óptica. (RAO; FUJISHIMA, 2000)

O BDD pode ser obtido como uma película fina sobre diferentes substratos condutores, como silício, molibdênio, tungstênio ou titânio, usando um dos seguintes métodos: deposição química em fase de vapor (CVD, do inglês “*chemical vapor deposition*”) por plasma de microondas, filamento quente ou assistida por chama. O método mais comum é deposição química em fase de vapor por plasma de microondas. Uma razão para isto é a disponibilidade comercial de tais sistemas de reatores. Embora o mecanismo de formação do filme seja um pouco diferente para cada método, todos servem para ativar uma fonte de gás rico em carbono, produzindo um precursor de crescimento em estreita proximidade com a superfície do substrato (PLESKOV, 2002). Os reagentes gasosos utilizados são metano altamente diluído em hidrogênio. No entanto, podem ser empregadas outras substâncias orgânicas como fonte de carbono, ou juntamente com o metano, tais como metanol, acetona e etanol. Pequenas frações de oxigênio, ou ainda compostos halogenados também podem ser usados com o objetivo de aumentar a taxa de crescimento e/ou aumentar a qualidade final dos filmes crescidos (BARROS et al., 2005; PLESKOV, 2000).

Existem dois tipos de filme fino de diamante sintetizados rotineiramente: micro e nanocristalino. A classificação destes dois tipos de filmes é baseada no seu tamanho e morfologia. A **Figura 6** mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos dois tipos de BDD depositados como filmes finos sobre substratos de Si.

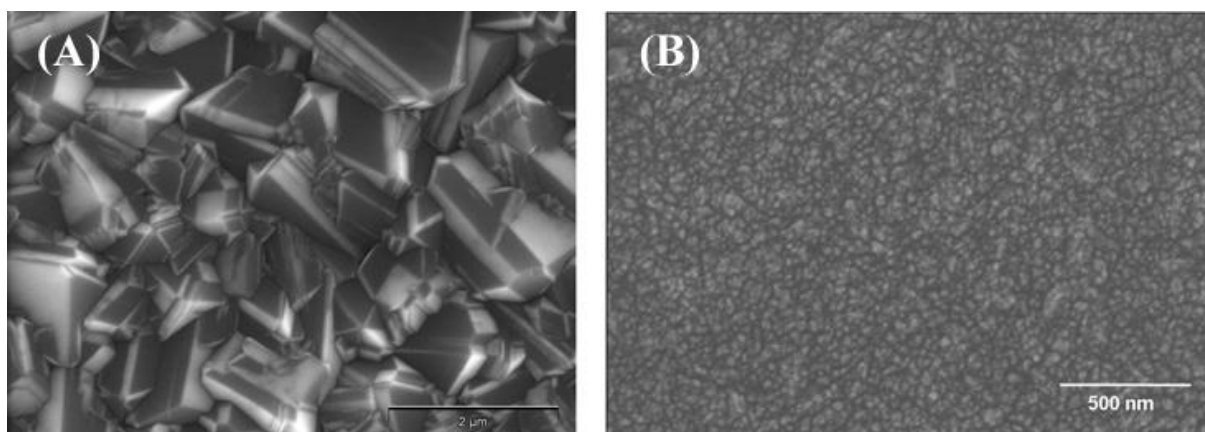


Figura 6. Imagens de MEV de um diamante microcristalino (A, escala : 2 μm) e um diamante nanocristalino (B, escala: 500 nm), ambos dopados com boro, obtidos sobre Si. Fonte: (SWAIN, 2007).

O diamante é um material isolante, com resistividade da ordem de $10^{16} \Omega \text{ cm}$. Os filmes de diamante terminados em hidrogênio, ou o próprio diamante natural tratado em plasma de

hidrogênio, têm sua resistividade reduzida para algo em torno de $10^6 \Omega \text{ cm}$, mas do ponto de vista de obtenção de materiais semicondutores, este valor de resistividade ainda é muito alto. Quando um filme de diamante é apropriadamente dopado, ele adquire boa condutividade e pode se tornar um material promissor para ser empregado como eletrodo (SWAIN, 2007).

O boro é o dopante mais utilizado para produzir eletrodos de diamante (semicondutor do tipo p). Isto é devido ao fato do boro possuir baixa energia de ativação como transportador de carga (0,37 eV). Para introduzir boro no filme de diamante durante o crescimento, um reagente contendo boro tem de ser adicionado à mistura dos gases de deposição (KRAFT, 2007). Os dopantes mais empregados são os seguintes: diborano (B_2H_6), trimetilborato ($\text{C}_3\text{H}_9\text{BO}_3$) e o óxido de boro (B_2O_3). O B_2H_6 não contém carbono ou oxigênio na molécula, o que evita a inclusão de elementos extras no reator, é facilmente encontrado e possibilita controle de concentração de boro, mas é altamente tóxico, explosivo e reativo. O trimetilborato não é tóxico, mas deve ser diluído em acetona ou metanol para ser usado, o que implica em fonte adicional de carbono e oxigênio. O B_2O_3 é o mais comum deles (grande disponibilidade), mas também deve ser solubilizado em acetona ou metanol (BARROS et al., 2005)

Outros dopantes também são utilizados e fornecem condutividade do tipo n: nitrogênio (energia de ativação como transportador de carga de 1,6 - 1,7 eV) e fósforo (energia de ativação como transportador de carga 0,6 eV). A **Figura 7** mostra um diagrama de energia para o diamante, com alguns níveis de energia inclusos no bandgap. Em caso de dopagem com nitrogênio, são utilizados NH_3 ou N_2 , para fósforo PH_3 e para dopagem com enxofre, H_2S . (KRAFT, 2007).

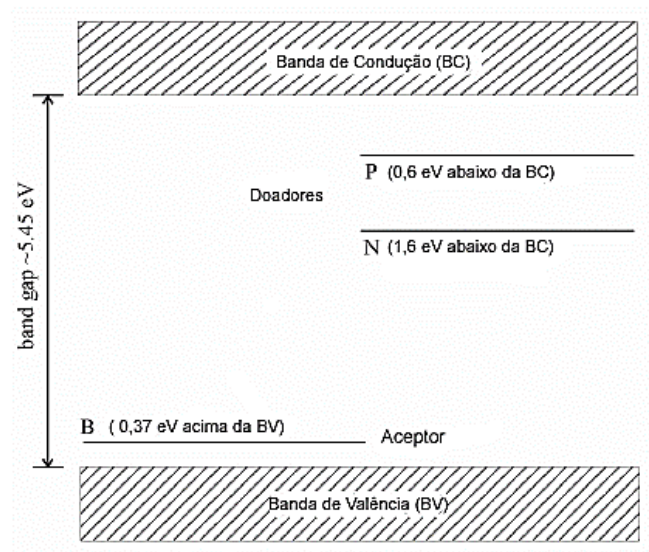


Figura 7. Diagrama de energia para o diamante, com os níveis dos dopantes adicionados ao bandgap. Adaptado de (KRAFT, 2007)

No caso do boro, os filmes de diamante devem ser dopados com uma concentração de $1 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$ átomos ou mais. A resistividade do diamante assim obtido depende da concentração de boro no filme, variando desde $10^4 \Omega \text{ cm}$ (para uma concentração de boro próxima a 10^{18} cm^{-3} átomos) até décimos e mesmo milésimos de $\Omega \text{ cm}$ (para uma concentração de boro próxima a 10^{21} cm^{-3} átomos). Assim, as propriedades dos filmes de diamante variam sucessivamente desde as de material dielétrico às de semiconductor, semiconductor degenerado e, finalmente, semimetal, à medida que essa concentração aumenta (PLESKOV, 2000)

A superfície do diamante tem uma camada terminal de átomos de hidrogênio, em estágios diferentes de estruturação superficial. A evolução desta estruturação superficial, para um dos planos de crescimento, está representada na **Figura 8**. Observa-se a passagem de uma estrutura com alta energia superficial, portanto menos estável (a), na forma de di-hidreto (2 átomos de hidrogênio ligados ao mesmo átomo de carbono, com alta energia estérica), à forma mais estável (c), a de mono-hidreto, com menor energia superficial, na qual apenas 1 átomo de hidrogênio está ligado a cada átomo de carbono, em toda a extensão da estrutura cristalina (BARROS et al., 2005).

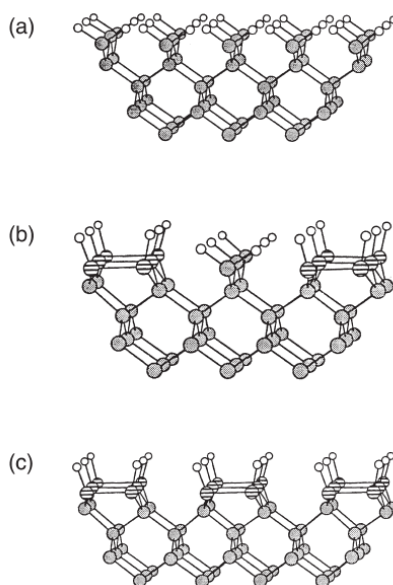


Figura 8. Representação de um dos planos de crescimento do filme de diamante CVD, com terminações em átomos de hidrogênio, evoluindo de uma estrutura com alta energia estérica devida aos átomos de hidrogênio vizinhos (a), passando pelo intermediário (b), até chegar a estrutura mais estável (c). Fonte: (BARROS et al., 2005)

O trabalho de (PLESKOV et al., 1987) descrevendo o comportamento fotoeletroquímico de filmes de diamante demonstrou que os mesmos não são tão eletroquimicamente inertes quanto se supunha, e que as propriedades superficiais podem ser sensivelmente alteradas via pré-tratamento superficial. A partir deste trabalho muito esforço tem sido direcionado para a caracterização do comportamento eletroquímico, em função de alterações impostas à sua superfície, via tratamentos anódicos e catódicos (BALDAN et al., 2013; CHEN; CHANG; CHANG, 2008; GIRARD et al., 2007; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2010; SALAZAR-BANDA et al., 2006; SUFFREDINI et al., 2004).

Sob esse aspecto, o trabalho de (YAGI, 1999) foi importante, principalmente por demonstrar que se pode oxidar a superfície de filmes de diamante por meio de pré-tratamento anódico ou por plasma de oxigênio. Porém a superfície só é eletroquimicamente recuperada, quando a oxidação superficial também foi obtida via eletroquímica. Atenção deve ser dada ao fato de que tratamentos anódicos e tratamentos por plasma de oxigênio aumentam a relação O/C na superfície do filme, tornando mais lenta a cinética de transferência de carga de alguns pares redox como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e $[\text{IrCl}_6]^{2-/3-}$ (BARROS et al., 2005). A reversibilidade da reação de transferência de carga para estas espécies aumenta com o abaixamento do pH,

indicativo de que grupos carboxila, negativamente carregados podem estar presentes na superfície do filme, diminuindo a reversibilidade da reação de transferência eletrônica por exclusão de carga (GRANGER; SWAIN, 1999).

1.4 Análise por injeção em batelada (BIA)

Análise por injeção em batelada (BIA, do inglês “*batch injection analysis*”) é uma técnica analítica apresentada na literatura por WANG e TAHA no início da década de 90 (WANG; TAHA, 1991). O procedimento BIA pode ser considerado uma alternativa em relação aos métodos baseados em Análise por Injeção em Fluxo (FIA, do inglês “*flow injection analysis*”) para aumentar a frequência analítica (RAMSING; RŮŽIČKA; HANSEN, 1981). Nesta técnica, volumes reduzidos (geralmente de 50 a 150 μL) da solução amostra ou padrão são injetados, com o auxílio de uma micropipeta (normalmente eletrônica), diretamente sobre um detector imerso em um grande volume de solução inerte.

A Figura 9 apresenta o esquema de uma célula BIA, adaptada para o uso com eletrodo de BDD diamante dopado com boro. O sistema pode ser operado com ou sem agitação da solução no interior da célula (PEREIRA et al., 2012). A posição do eletrodo de trabalho é oposta à ponteira do sistema de injeção. A injeção da solução em análise (geralmente de 100 a 150 μL) é feita em configuração “wall-jet”, diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho (detecção eletroquímica).

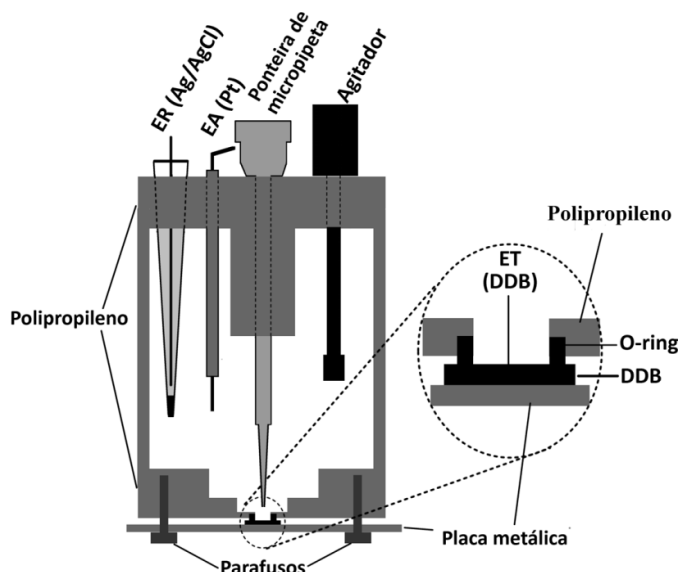


Figura 9. Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica, adaptada para o uso com eletrodo de diamante dopado com boro. Fonte: (FREITAS, 2015; TORMIN et al., 2011) .

A passagem da espécie em análise sobre a superfície do sensor resulta em sinais transientes (picos), similar ao observado em sistemas FIA, conforme demonstrado na **Figura 10**.

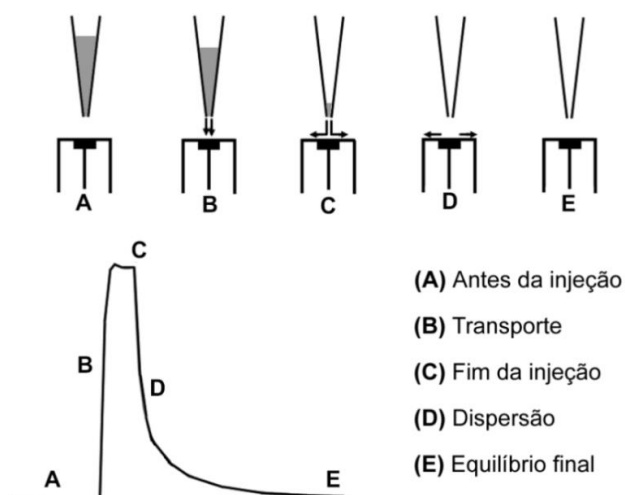


Figura 10. Etapas de operação de um sistema BIA e resultado obtido. Fonte: (QUINTINO, 2003)

Antes da injeção da solução contendo uma espécie eletroativa observa-se uma corrente constante, que se atribui a corrente residual gerada a partir do eletrólito inerte, indicando que não existe reação de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução (**Figura 10A**). Quando a solução padrão ou amostra é injetada, há um rápido aumento da corrente (**Figura 10B**), devido ao processo redox relacionado ao analito de interesse transportado até a superfície do eletrodo de trabalho por convecção. Durante o procedimento de injeção, a corrente atinge um valor máximo permanecendo constante até o final da injeção (**Figura 10C**). Após o fim do procedimento de injeção há uma queda acentuada do sinal analítico referente à mudança do transporte (convectivo para difusional; **Figura 10D**), atingindo, portanto, o equilíbrio existente antes da injeção (corrente residual; **Figura 10E**). O retorno da corrente ao patamar de antes da injeção pode ser acelerada através de uso de agitação mecânica da solução presente no interior da célula (PEREIRA et al., 2013). O procedimento BIA possui diversas características similares às aquelas apresentadas por sistemas FIA, como: rapidez, simplicidade, boa repetibilidade e sensibilidade e possibilidade de trabalhar com baixos volumes de amostras e reagentes. Além disso, como em sistemas FIA, o fenômeno da passivação ou contaminação da superfície do eletrodo de trabalho também é menor em relação aos sistemas estacionários devido ao menor tempo de contato entre o analito e o eletrodo de trabalho durante a análise (QUINTINO;

ANGNES, 2004). Apesar disso, os sistemas BIA têm sido pouco explorados até hoje, se comparados aos sistemas FIA (QUINTINO, 2003).

Os sistemas BIA também apresentam algumas desvantagens quando comparados a sistemas FIA. Devido à pequena distância existente entre a ponteira da micropipeta e o eletrodo de trabalho, os sistemas BIA apresentam restrições em procedimentos de derivatização e pré-tratamentos ou diluições online de amostras. Além disto, as possibilidades de automação são limitadas (DA SILVA, 2012; WANG; TAHA, 1991).

Como vantagens dos sistemas BIA em relação a FIA, podemos citar a menor lixiviação do material usado em eletrodos modificados (ausência de soluções carregadoras em tempo integral) (QUINTINO, 2003), melhor sensibilidade (menor efeito de dispersão ou diluição da amostra) (BRETT; OLIVEIRA BRETT; MITOSERIU, 1994; WANG, 1992), possibilidade de injeção da amostra sem prévia diluição no eletrólito suporte, devido à força iônica se manter praticamente inalterada, pois um pequeno volume de amostra é injetado em um volume muito grande de eletrólito (WANG; CHEN, 1994), menor geração de resíduos; não há necessidade do uso de válvulas, bombas e tubos de conexão eliminando problemas relacionados a vazamento e presença de bolhas de ar (WANG; LU; CHEN, 1992).

As potencialidades, bem como os conceitos e princípios do procedimento têm sido explorados e ilustrados, considerando a associação de sistemas BIA com várias técnicas de detecção (calorimetria, fluorescência, amperometria, potenciometria e voltametria) (DORNELLAS et al., 2014; EL GOHARY; EL NASHAR; ABOUL-ENIEN, 2011; SIMÕES; VAZ; BRETT, 2007; THAVARUNGKUL et al., 1999; TORMIN et al., 2014; WANG; RAYSON; TAHA, 1992). Alguns parâmetros que influenciam a resposta do sistema podem ser encontrados na literatura (BRETT; BRETT; MITOSERIU, 1995; BRETT; OLIVEIRA BRETT; MITOSERIU, 1994; DA SILVA et al., 2011).

Apesar das características interessantes que os sistemas BIA apresentam, um pequeno número de trabalhos empregando estes sistemas foram descritos na literatura até hoje (QUINTINO, 2003), provavelmente, devido à necessidade do uso de pipetas eletrônicas para obtenção de reprodutibilidade no processo de injeção. Estas pipetas geralmente não estão disponíveis nos laboratórios comuns de pesquisa, e no uso de pipetas manuais, a repetibilidade do sistema é diretamente dependente da habilidade do operador (WANG et al., 1992). Recentemente, porém, estudos mostraram que através do uso de um padrão interno, a utilização de pipetas manuais na injeção em sistemas BIA é possível (GIMENES et al., 2010a). Além disto, problemas relacionados com os fenômenos de adsorção irreversíveis (contaminação)

quando eletrodos sólidos são usados também podem ser contornados mediante uso de padrão interno (DA SILVA, 2012).

O problema de contaminação/adsorção do analito ou demais componentes da amostra no eletrodo de trabalho também pode ser evitado em sistemas em fluxo pela aplicação repetitiva e alternada de pulsos de potenciais de limpeza (detecção amperométrica pulsada) (BEZERRA DA SILVA et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2008; GIMENES et al., 2010b; KARUWAN et al., 2006). No entanto, até hoje, a amperometria pulsada foi pouco utilizada como modo de detecção em sistemas BIA (PEREIRA et al., 2012; SCHIAVON et al., 1996), provavelmente porque a maioria dos estudos empregando BIA com detecção amperométrica foram realizados com a solução no interior da célula no estado estacionário, sendo que a limpeza eletroquímica é mais eficaz com o meio (solução) sob movimento.

Recentemente, sistemas BIA com detecção por amperometria de múltiplos pulsos vêm sendo explorados com sucesso para executar determinações simultâneas usando somente um eletrodo de trabalho (DA SILVA et al., 2011). A determinação seletiva dos compostos foi possível mediante a aplicação de pelo menos dois pulsos de potenciais em função do tempo. Neste estudo, uma espécie foi oxidada e seletivamente quantificada em um pulso de potencial (E_1 ; menor energia) e em um segundo pulso de potencial (E_2 ; maior energia), ambas as espécies foram oxidadas. A quantificação seletiva da segunda espécie foi possível mediante subtração das correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais ($I_{E_2} - I_{E_1}$). Esta estratégia somente foi possível mediante o uso de um fator de correção (FC). A técnica permite ainda a aplicação de um terceiro pulso de potencial para evitar a contaminação ou promover a constante limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho empregado.

1.5 Voltametria de onda quadrada (SWV)

A voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês “*square-wave voltammetry*”), é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas espectroscópicas. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo eletródico em estudo (BARD et al., 2003).

No final da década de 1970, Christie, Turner e Osteryoung desenvolveram o modelo atual da SWV, onde a medida de corrente é realizada a velocidades de varredura maiores que 100 mV s^{-1} . Neste caso, as medidas de corrente são realizadas apenas ao final do tempo de

aplicação do pulso de potencial, onde a magnitude da corrente capacitiva está minimizada. Esta estratégia possibilitou notável melhora na sensibilidade da técnica, ampliando consideravelmente seu campo de aplicação (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Na SWV, a forma da curva de corrente-potencial é proveniente da aplicação de potenciais de amplitude a (amplitude do pulso de potencial), que variam de acordo com uma escada de potencial com altura ΔE_s (incremento do pulso de potencial) e duração τ (período), conforme detalhado na **Figura 11**. Na curva de potencial-tempo, a largura do pulso ($\tau/2$) é chamada t e a frequência de aplicação dos pulsos é chamada de f e é dada por $(1/t)$. A corrente é medida ao final dos pulsos diretos e reversos e o sinal é obtido como uma intensidade da corrente resultante (ΔI) de forma diferencial, como demonstrado na **Figura 12**. A forma de aquisição da corrente diminui consideravelmente a detecção da corrente capacitiva e, portanto, melhora o limite de detecção da técnica (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

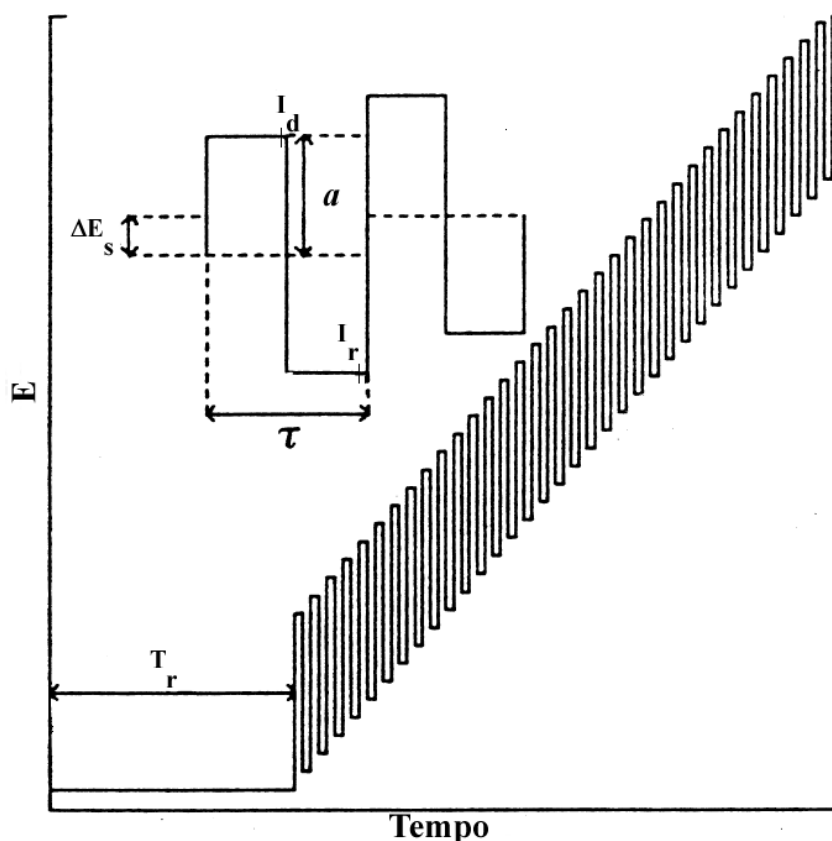


Figura 11. Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada. Adaptado de (WANG, 2006).

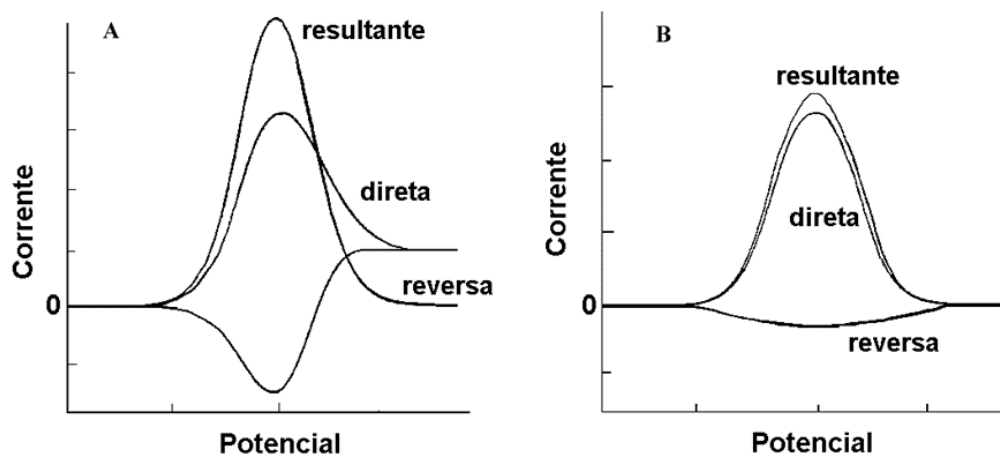


Figura 12. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada. (A) Componentes de corrente de um processo redox reversível e (B) de um processo irreversível. Fonte: (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003)

No pequeno intervalo de potencial entre o pulso direto e o reverso, a corrente capacitiva é relativamente constante, e assim, o cálculo da diferença entre as respostas dos pulsos direto e o reverso anula efetivamente as contribuições capacitivas. Não é necessário esperar até que a corrente capacitiva se torne nula, o que é uma vantagem se comparado com voltametria cíclica de varredura rápida. Consequentemente, velocidades de varreduras mais elevadas podem ser utilizadas em SWV devido remoção eficaz da corrente de fundo a partir da forma de aquisição da corrente. Isto significa que existe a possibilidade de se investigar processos cinéticos, em particular com reações rápidas. A contribuição das três correntes pode ser sobreposta, como mostrado na **Figura 12** (ZACHOWSKI; OSTERYOUNG, 1986).

Uma vantagem importante da SWV para muitas aplicações eletroanalíticas é que na região de potencial negativo, o oxigênio dissolvido não precisa ser removido da solução, a menos que interfira diretamente com a reação eletródica em estudo, por duas razões. Primeiro, na região de corrente limitante para a redução do oxigênio, a contribuição dos pulsos direto e reverso são iguais levando a uma corrente líquida igual a zero. Em segundo lugar, durante uma varredura de potenciais negativos no sentido positivo, a elevada velocidade de varredura limita o tempo para que espécies eletroativas de oxigênio difundam para a superfície do eletrodo. Dessa forma, o tempo experimental é reduzido e o procedimento é simplificado porque a remoção prévia do O_2 dissolvido mediante borbulhamento com argônio ou nitrogênio não será necessária (BARD et al., 2003). Esse procedimento é utilizado com bons resultados em voltametria de redissolução anódica, em particular em combinação com técnicas em fluxo

(BRETT; BRETT; TUGULEA, 1996; BRETT; OLIVEIRA BRETT; MITOSERIU, 1994) em que a simplificação de protocolos é útil.

1.6 Voltametria de Redissolução Anódica (ASV)

A voltametria de redissolução anódica (ASV, do inglês “*anodic stripping voltammetry*”) é uma técnica eletroanalítica poderosa para a determinação de metais em nível de concentração de traços. Sua sensibilidade característica é atribuída à etapa de pré-concentração inerente à técnica, durante a qual os metais de interesse são acumulados sobre a superfície do eletrodo de trabalho. A combinação da etapa de pré-concentração eficiente com medições eletroquímicas avançadas dos analitos acumulados resulta em limites de detecção extremamente baixos, podendo chegar ao nível de picomolar em alguns casos (MIRCESKI; KOMORSKY-LOVRIC; LOVRIC, 2007).

Outras vantagens da análise por redissolução incluem a possibilidade de especiação, determinação multielementar, baixo custo e possibilidade de uso em campo (“*on site analysis*”). Diferentes versões de análise por redissolução, que diferem principalmente na natureza da etapa de pré-concentração (adsortiva ou eletrolítica) e no método de detecção (voltamétrico vs potenciométrico), estão disponíveis na literatura (SCHOLZ, 2009).

A voltametria por redissolução anódica é a versão mais antiga e a mais empregada nas análises por redissolução. A técnica é aplicável à cátions metálicos que se depositam sobre o eletrodo de trabalho, e principalmente àqueles que formam amálgamas com o eletrodo de mercúrio. Nessa técnica, os metais são depositados à potencial constante, com a solução mantida sob agitação, por um período de tempo controlado (BARD et al., 2003). As etapas envolvidas na análise por ASV são demonstradas na Figura 13.

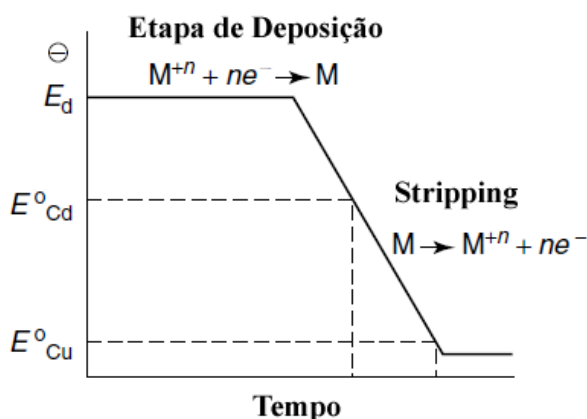


Figura 13. Etapas envolvidas na voltametria de redissolução anódica. Adaptado de (BARD et al., 2003)

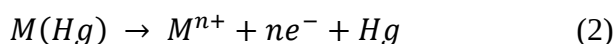
A etapa de formação da amálgama é representada pela equação 1:



Na qual M^{n+} representa o cátion metálico e $M(Hg)$ representa a amálgama formada.

O potencial de deposição empregado deve ser aproximadamente 0,4 V mais negativo do que o potencial de redução do metal de interesse. Uma vez que o tempo de deposição está relacionado à sensibilidade da técnica, o mesmo deve ser selecionado de acordo com a faixa de concentração dos analitos. A etapa de deposição é geralmente favorecida pela convecção das espécies de interesse até a superfície do eletrodo de trabalho, o que pode ser feito mediante a agitação, fluxo da solução diretamente sobre a superfície do eletrodo ou pela utilização de eletrodos do tipo disco rotatório (BARD et al., 2003).

Uma fração pequena, porém, reproduzível, do metal presente na solução é depositada. Após um tempo pré-definido e constante de deposição, a eletrólise é interrompida, e a convecção forçada, descontinuada. Nessa segunda etapa, o analito é redissolvido (oxidado) ou retirado do eletrodo, mediante a varredura de potencial para valores mais positivos, como descrito pela equação 2:



O sinal de excitação usado durante a etapa de redissolução é geralmente voltamétrico pulsado (que minimiza a interferência da corrente capacitiva) ou uma rampa linear de potencial. O voltamograma obtido (Figura 14) consiste em múltiplos picos de corrente, correspondentes à reoxidação dos metais que estavam solubilizados na amálgama e pode ser utilizado para a

obtenção de informações qualitativas (em função dos valores de potencial de pico) e quantitativas (em função dos valores de corrente de pico medidas) (FOGG; WANG, 1999).

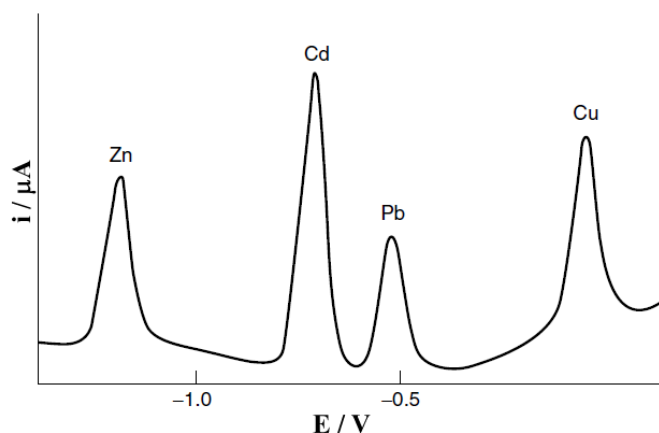


Figura 14. Voltamograma de redissolução para mistura contendo $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de Zn, Cd, Pb e Cu. Adaptado de (BARD et al., 2003)

A técnica de ASV permite, assim, a determinação simultânea de metais. A corrente de pico depende de vários parâmetros das etapas de pré-concentração e redissolução. O comportamento exato que regula a forma do voltamograma obtido depende do tipo de eletrodo de trabalho e da forma de voltametria empregada, mas em todos os casos, a corrente de pico é proporcional ao tempo de deposição e à concentração do metal, de acordo com a equação 3:

$$I_p = K C t_{dep} \quad (3)$$

Onde K é uma constante que inclui a área do eletrodo (A), a velocidade de varredura (v), o número de elétrons envolvidos (n), o coeficiente de difusão (D) e a taxa de convecção (BARD et al., 2003).

1.7 Amperometria

Um sensor voltamétrico registra vários pontos em uma região selecionada do perfil corrente-potencial. Um sensor amperométrico, por sua vez, mede uma corrente a um potencial aplicado fixo, isto é, para um determinado ponto na curva de corrente-potencial (voltamograma). Portanto, um sensor amperométrico é um sensor voltamétrico para um potencial fixo (BRETT; BRETT, 1996).

Quando um potencial é aplicado no eletrodo de trabalho e, uma reação de oxidação ou de redução de uma espécie analítica em solução ocorre, podemos chamar o monitoramento desse sinal de detecção amperométrica a potencial constante. Este tipo de detecção é amplamente utilizado, conforme relatado na literatura (GUTIERREZ et al., 2008; JIA et al., 2008; RICHTER et al., 2004; VARODI; GLIGOR; MURESAN, 2007; ZHANG et al., 2009). Porém, devido à adsorção de alguns subprodutos e/ou impurezas na superfície do eletrodo, pode haver contaminação ou passivação do eletrodo (variação na área do eletrodo), e consequentemente, falta de repetibilidade em análises sucessivas. Como por exemplo, na determinação eletroquímica de fenóis e de derivados fenólicos (DE CARVALHO et al., 2004), 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, subprodutos de reações que ocorrem no eletrodo podem gerar interferências nas análises. Para a obtenção de resultados reprodutíveis durante a análise, deve-se realizar a limpeza frequente da superfície do eletrodo, quer pelo polimento mecânico ou por um procedimento de limpeza eletroquímica (CHAILAPAKUL et al., 2006).

Existem diversas estratégias para promover a limpeza da superfície do eletrodo de trabalho ou impedir sua contaminação ou passivação, tais como, adição de EDTA ao eletrólito suporte (DE CARVALHO et al., 2004), o uso de eletrodos modificados (HAGHIGHI et al., 2007; PEDROSA; LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006) ou regeneração da superfície do eletrodo realizada constantemente (*“on line”*) (CATARINO et al., 2003). Os sistemas BIA ou FIA acoplados à detecção amperométrica, em muitos casos, podem minimizar o problema da contaminação da superfície do eletrodo. Nestes sistemas, pequenos volumes da amostra ou solução padrão são injetados (alguns microlitros) e, portanto, o contato com o eletrodo ocorre por curtos períodos de tempo (sinais transientes), o que contribui para que o eletrodo permaneça limpo por um período de tempo maior (GIMENES, 2009).

Uma grande vantagem da amperometria a potencial constante é que, uma vez que o potencial do eletrodo é mantido constante, a corrente capacitiva torna-se igual a zero logo após a aplicação do potencial. Isso confere à técnica maior sensibilidade, em relação às técnicas voltamétricas baseadas na varredura de potenciais. Normalmente, aconselha-se utilizar uma concentração relativamente alta de eletrólito inerte, que deverá ter concentração similar na solução carregadora (FIA) ou na solução contida no interior da célula (BIA), e na solução amostra ou padrão a serem injetadas nos sistemas. Desta forma, a força iônica será mantida constante, minimizando variações na região da dupla camada elétrica e garantindo que o sinal

transiente registrado possa ser atribuído somente ao processo faradaico (BARD; FAULKNER, 2001). Vale ressaltar que nas técnicas voltamétricas, o eletrólito também é necessário.

Determinações simultâneas de compostos eletroativos em potenciais redox distintos ($\Delta E > 0,1 \text{ V}$) (HAGHIGHI et al., 2007) somente são possíveis empregando a técnica de amperometria a potencial constante quando mais de um eletrodo de trabalho são usados na detecção (MATOS et al., 2000; PAIXÃO; MATOS; BERTOTTI, 2003; THANGARAJ et al., 2014). Quando somente um eletrodo de trabalho é usado, determinações simultâneas somente são possíveis se a técnica de amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês “*multiple pulse amperometry*”) (DOS SANTOS et al., 2011) for empregada.

Esta técnica é disponibilizada no software GPES, que controla os potenciostatos comercializados pela empresa Metrohm - Autolab. Este software permite aplicar de 2 até 10 pulsos de potencial de forma sequencial e repetitiva no mesmo eletrodo de trabalho, sendo possível a aquisição da corrente em cada pulso de potencial, o que corresponde à aquisição de até 10 amperogramas distintos “simultaneamente”. O programa permite o controle da quantidade, sequência e do tempo (mínimo de 30 ms) dos pulsos de potenciais aplicados ao ET. Na **Figura 15** é apresentado um exemplo de aplicação da técnica de MPA. O esquema de aplicação dos 9 pulsos de potenciais e os respectivos amperogramas obtidos foram extraídos do software GPES 4.9 (Metrohm – Autolab).

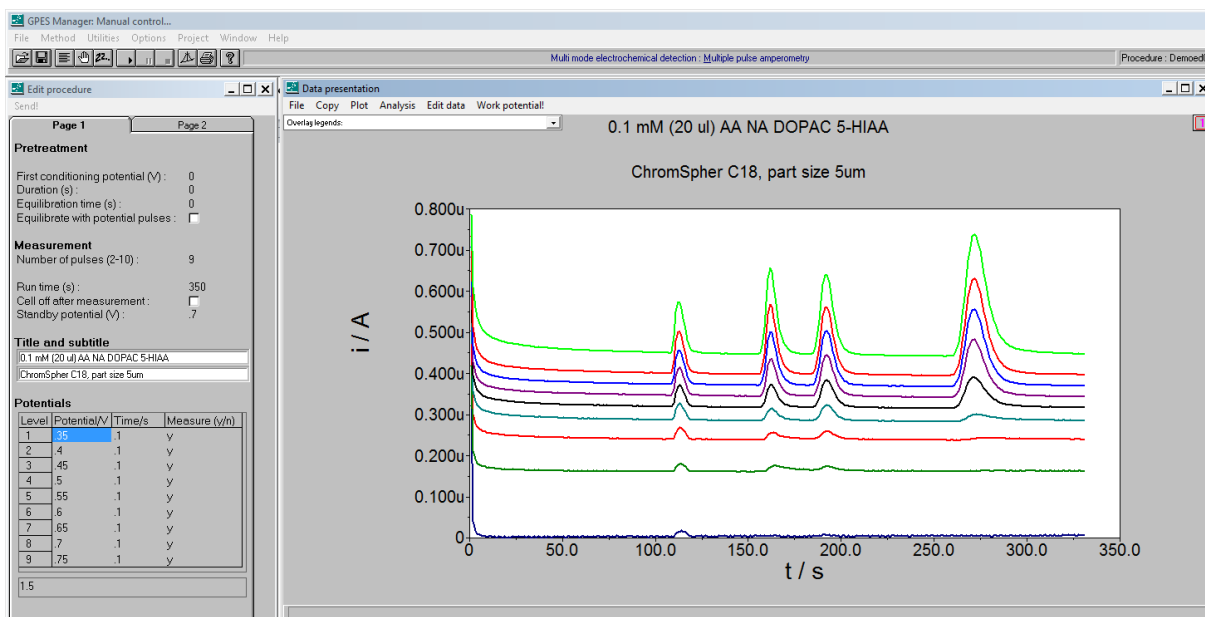


Figura 15. Esquema de aplicação de 9 pulsos de potenciais e respectivos amperogramas obtidos.

Diferentes estratégias (esquemas) de aplicação dos pulsos de potenciais podem ser adotadas dependendo da natureza das espécies oxidadas e/ou reduzidas no ET (DA SILVA, 2012) para determinação simultânea de duas espécies empregando a técnica de MPA acoplada a sistemas FIA ou BIA. A estratégia mais comum é a aplicação de dois pulsos de potenciais (E_1 e E_2) e aquisição de dois amperogramas distintos simultaneamente:

- em E_1 , somente uma das espécies é reduzida ou oxidada, sendo o sinal de corrente proporcional à concentração desta espécie (não há interferência da outra espécie).

- em E_2 , ambas as espécies são oxidadas ou reduzidas.

A corrente proveniente da espécie que somente é oxidada no potencial E_2 pode ser obtida mediante subtração da corrente detectada em E_1 sem (MEDEIROS et al., 2010; SURAREUNGCHAI; DEEPUNYA; TASAKORN, 2001) e com (SILVA et al., 2011; TORMIN et al., 2012) o uso de um fator de correção (FC). O uso do FC é mais comum, pois a corrente da espécie detectada nos dois pulsos de potenciais, muitas vezes, não é igual em ambos os pulsos de potenciais. Este procedimento pode ser usado em sistemas FIA (SILVA et al., 2011) ou BIA (DA SILVA et al., 2011). Outra estratégia possível é a aplicação de três pulsos de potenciais (E_1 , E_2 e E_3). Os potenciais E_1 e E_2 têm a mesma função anterior, no entanto, somente o produto de oxidação de uma das espécies oxidadas em E_2 é eletroquimicamente reversível e é seletivamente detectada em E_3 por redução (DOS SANTOS et al., 2008, 2009).

A técnica de MPA acoplada a sistemas FIA ou BIA também permite a aplicação de um pulso de potencial adicional para prevenir a contaminação do ET (possibilidade de constante limpeza eletroquímica). Neste caso, a forma de funcionamento da MPA é similar à detecção amperométrica pulsada (PAD, do inglês “*pulsed amperometric detection*”). A técnica PAD geralmente também permite a aplicação de vários pulsos de potenciais, no entanto, a aquisição de corrente se restringe a um único pulso de potencial (limitação de software).

Informações a respeito dos aspectos teóricos da detecção empregando a MPA são pouco divulgadas na literatura, o que obviamente contribui para a baixa quantidade de trabalhos publicados empregando esta técnica. Dos Santos et al, em um artigo de revisão (DOS SANTOS et al., 2011), abordam alguns aspectos teóricos, potencialidades (determinação simultânea, análises indiretas, limpeza eletroquímica, inserção de padrão interno para correção de variáveis do sistema em fluxo, etc.) e revisão bibliográfica sobre o tema FIA-MPA. A seguir, alguns pontos sobre a teoria da técnica MPA serão discutidos.

Quando pulsos de potenciais são aplicados alternadamente, a corrente monitorada é governada por dois componentes de corrente, a corrente capacitiva, I_C (referente ao carregamento da dupla camada elétrica quando um potencial é aplicado e não envolve a ocorrência de reação química) e a corrente faradaica, I_F (referente a transferências de elétrons que ocorrem na interface eletrodo-solução) (BARD; FAULKNER, 2001). Quando há na solução espécies que podem ser oxidadas ou reduzidas no eletrodo há a geração da I_F . Assim, na detecção amperométrica pulsada acoplada a um sistema em fluxo ou batelada (BIA), quando apenas a solução carregadora inerte estiver passando sobre o eletrodo de trabalho, a magnitude de I_F dependerá da concentração de impurezas eletroativas presentes na solução, que em geral são baixas. A magnitude da I_C depende da amplitude do pulso de potencial e do tempo de aplicação (a corrente é detectada próximo ao final do tempo de aplicação do pulso). A I_C será diretamente proporcional a amplitude do pulso e inversamente proporcional ao tempo de aplicação do pulso de potencial. Quando a zona da amostra contendo uma espécie eletroativa passar através da célula eletroquímica, a magnitude de I_F será governada pela concentração da espécie analítica que chega a superfície do eletrodo de trabalho.

A dependência da I_F e de I_C com o tempo de aplicação do pulso de potencial são diferentes. A I_C é alta no início da aplicação do pulso de potencial, mas diminui exponencialmente com o tempo de aplicação do pulso. Em uma solução que contém uma espécie analítica eletroativa, a dependência da corrente faradaica com o tempo de aplicação do pulso depende das condições do transporte de massa da espécie analítica em direção ao eletrodo. Em condições estacionárias, a corrente faradaica diminui mais lentamente com o tempo de aplicação do pulso quando comparada com a corrente capacitiva. Já em fluxo 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. Como a contribuição de I_C é constante

(antes, durante e após a passagem da zona da amostra), que contém a espécie analítica de interesse (considerando a força iônica constante). Assim, durante a passagem da zona da amostra, monitora-se somente a contribuição da I_F (proporcional à concentração da 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 potencial governará a quantidade da espécie analítica que reagirá no eletrodo.

Levando em consideração o potencial na MPA acoplada a sistemas FIA ou BIA, o desenvolvimento de novas metodologias de análise se torna vantajosa, uma vez que apresenta custo reduzido, boa reprodutibilidade, seletividade e sensibilidade, tempo reduzido de análise e simplicidade de execução.

1.8 Determinações simultâneas com detecção eletroquímica

Uma das perspectivas presentes no desenvolvimento de novos métodos analíticos se refere à possibilidade de determinações simultâneas, ou seja, a determinação de mais de um componente na amostra na mesma operação experimental. Desse modo, os métodos de separação, tal como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou a cromatografia gasosa (GC) são amplamente utilizadas. No entanto, são técnicas relativamente caras, seja em relação à aquisição dos equipamentos ou em relação aos custos de manutenção. Separações por eletroforese capilar (CE) apresentam vantagens em relação às separações cromatográficas em relação aos custos de operação e manutenção, no entanto, o custo de aquisição do equipamento é similar. Além disso, determinações simultâneas sem etapa prévia de separação em coluna também podem ser encontradas, por exemplo, trabalhos baseados em detecção espectrofotométrica com tratamento dos dados por técnicas quimiométricas (PCR, PLS ou calibração multivariada) (ELKADY, 2011; KHOSHAYAND et al., 2008, 2010) ou técnicas eletroquímicas, que geralmente apresentam maior simplicidade, possibilidade de automação, baixo custo e fácil tratamento dos resultados.

Na literatura podem ser encontrados trabalhos de determinação simultânea empregando diferentes técnicas eletroquímicas. Dentre estes podemos citar a potenciometria (DIAMOND et al., 1993; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2011), as voltametrias de pulso (SWV e DPV) (BABAEI; GARRETT; DOWNARD, 2011; LOURENÇÃO et al., 2009, 2010; MEDEIROS; ROCHA-FILHO; FATIBELLO-FILHO, 2010; ZEN; TING, 1997), voltametria de redissolução

(FIGURA; MCDUFFIE, 1980; RISO; LE CORRE; CHAUMERY, 1997; UHLIG et al., 1995), amperometria de múltiplos pulsos acoplada a sistemas FIA (FIA-MPA) (DOS SANTOS et al., 2008, 2009; MEDEIROS et al., 2010; MIRANDA et al., 2012; SILVA et al., 2011)] e acoplada a sistemas BIA (BIA-MPA) (GIMENES et al., 2013, 2014; PEREIRA et al., 2013, 2014; TORMIN et al., 2012).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver dois métodos simples, rápidas e de baixo custo, empregando análise por injeção em batelada com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV) e análise por injeção em batelada com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (BIA-MPA). O objetivo específico foi a determinação simultânea de espécies em amostras farmacêuticas sem a necessidade de etapas complexas para a preparação da amostra ou modificação química/eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho. Os seguintes compostos foram objeto de estudo no presente trabalho:

- Determinação simultânea de zinco e nafazolina por BIA-SWV;
- Determinação simultânea de nafazolina e feniramina por BIA-MPA;
- Determinação simultânea de nafazolina e clorfeniramina por BIA-MPA;
- Aplicação dos métodos desenvolvidos na análise de formulações farmacêuticas contendo os princípios ativos listados acima.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

3.1.1 Detecção eletroquímica

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

3.1.2 Eletrodo de trabalho

Neste trabalho foi utilizado diamante dopado com boro (BDD; área geométrica = 22,9 mm²), adquirido da empresa Adamant Technologies SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça (atualmente chamada NeoCoat SA - La Chaux-de-Fonds, Suíça). Trata-se de placas a base de silício (0,7 x 0,7 cm) com espessura de aproximadamente 1,0 mm e cobertas com um fino filme de diamante (~1,2 μ m) com nível de dopagem de boro de 7000 a 8000 ppm. Antes do início das medidas eletroquímicas, o eletrodo de BDD foi submetido a um processo de limpeza/ativação, uma vez que não seria possível a limpeza manual por polimento. Dois modos de ativação eletroquímica foram empregados, uma anódica (aplicando uma corrente de +0,01 A) em meio de tampão Britton-Robinson 0,12 mol L⁻¹ (pH 2,0) (TERASHIMA et al., 2003) e uma catódica (aplicando-se uma corrente de -0,01 A) em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ (SALAZAR-BANDA et al., 2006). Os tempos de ativação variavam de 15 minutos, quando apenas a ativação catódica era realizada, a 30 minutos, quando ambas ativações eram empregadas. O tratamento catódico foi feito diariamente, previamente ao uso, sendo a única ativação empregada durante a primeira parte desse trabalho.

3.1.3 Eletrodo de referência e eletrodo auxiliar

Em todos os experimentos utilizou-se um mini eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl sat.) (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996) preparado no próprio laboratório pela eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag através da aplicação de +0,3 V em meio de uma solução de HCl 0,10 mol L⁻¹ durante 1,0 hora. Como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina.

3.1.4 Célula Eletroquímica para medidas estacionárias

Nas medidas voltamétricas estacionárias com o eletrodo de BDD, uma célula de polipropileno com volume total de 10 mL foi utilizada. Nesta célula, o eletrodo de BDD (0,7 x 0,7 cm) foi posicionado no fundo da mesma com auxílio de um anel (“o-ring”) de borracha, e fixado (pressionado) sobre o anel com auxílio de parafusos, similar ao apresentado na **Figura 16**. Todos os experimentos foram realizados sem a remoção do O₂ dissolvido e a temperatura ambiente.

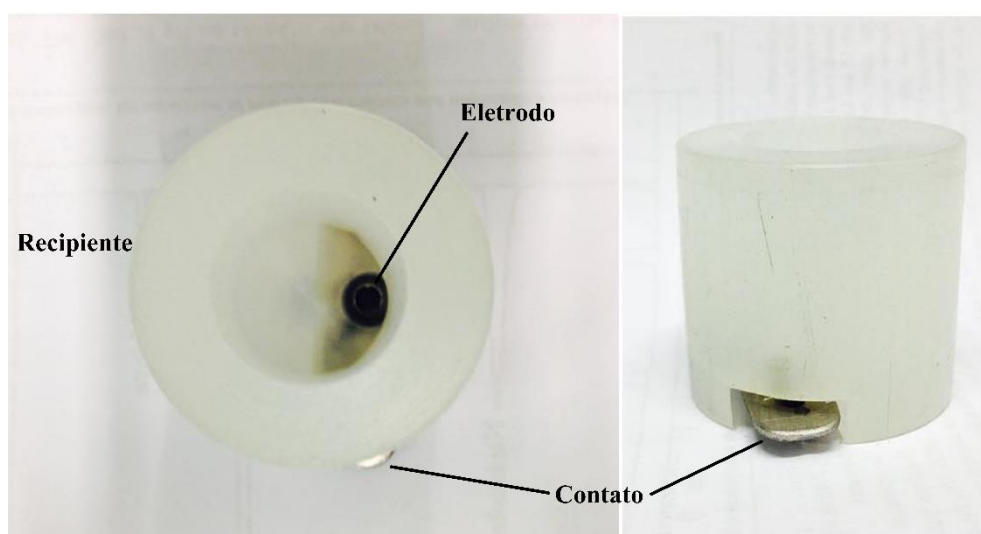


Figura 16. Célula de polipropileno utilizada nos experimentos estacionários com eletrodo de BDD posicionado no fundo da mesma.

3.1.5 Sistema BIA

Nos estudos com o sistema BIA, utilizou-se uma célula construída no próprio laboratório (TORMIN et al., 2011). A célula foi constituída a partir de um tarugo de polipropileno com as seguintes dimensões: $\varnothing = 7,5$ cm; comprimento: 6 cm. Com auxílio de um torno (oficina da Faculdade de Mecânica – UFU), um orifício com as seguintes dimensões foi efetuado a partir de um lado do tarugo: $\varnothing_{\text{interno}} = 6$ cm; profundidade = 5 cm; volume total ≈ 150 mL. A **Figura 17** ilustra um diagrama esquemático da célula BIA utilizada no trabalho com o posicionamento do micro-motor DC para agitação (PEREIRA et al., 2012), sendo este de uso opcional.

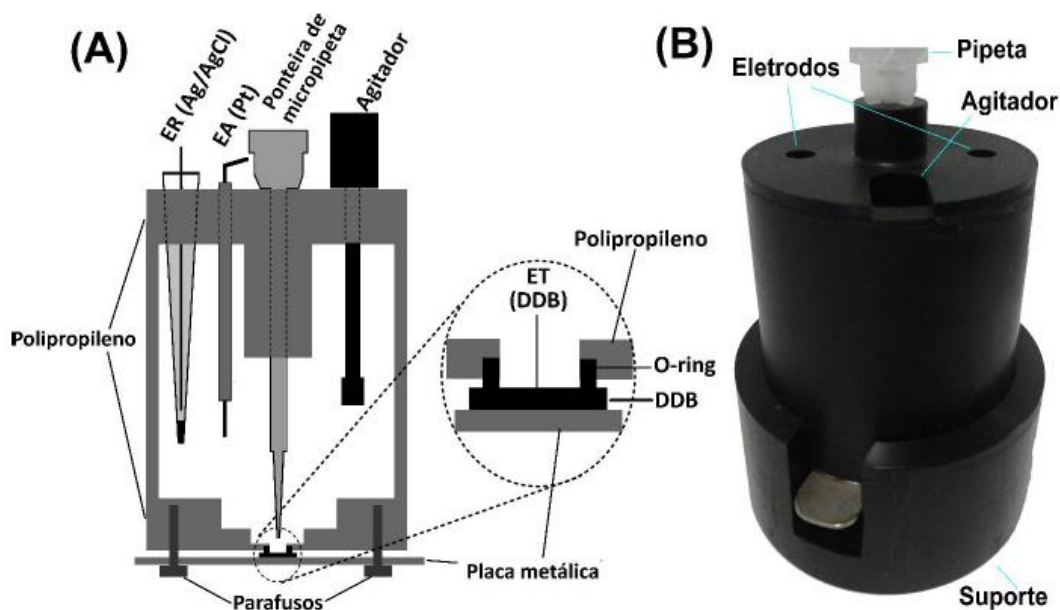


Figura 17. (A) Esquema da célula BIA utilizada no trabalho; (B) Imagem da célula BIA.

Uma tampa de polipropileno foi fixada no lado aberto do tarugo. Um orifício central foi feito tanto na tampa e na base do tubo. Além do orifício central (para o posicionamento da ponteira do sistema de injeção), a tampa superior contém mais três orifícios: dois para fixação dos eletrodos auxiliar e referência e um para a inserção do agitador mecânico. O sistema de agitação é composto por um micro-motor DC de 12 V usado originalmente em secadores de cabelo ou brinquedos elétricos. Ao eixo deste micro motor foi adaptado com uma haste de teflon (PEREIRA et al., 2012) e a velocidade de agitação é controlada com uma fonte universal de tensão variável (3 a 12 V - 700 a 4000 rpm). Quanto maior a voltagem selecionada, maior é a rotação do motor.

No orifício efetuado no centro da base (5,0 mm de diâmetro) foi posicionado um anel de borracha (O-ring) e sobre este anel, a placa de silício coberta com um filme de BDD (0,7 x 0,7 cm). A área útil do eletrodo de BDD é definida pelo diâmetro interno deste anel (5 mm; área = 22,9 mm²). Para fixação da peça de BDD e manter o contato elétrico, uma placa metálica foi pressionada sobre a placa de BDD através de dois parafusos colados nas extremidades da parte inferior da célula. A célula foi construída de forma que durante a injeção, ponta da ponteira fique posicionada a aproximadamente 2 mm (QUINTINO; ANGNES, 2004) do eletrodo de BDD. Para a injeção neste sistema utilizou-se uma pipeta eletrônica (Eppendorf® Multipette stream) que permite injeções de 10 a 1000 µL, usando um combitip® (ponteira) de 1 mL, com

velocidades de injeção de 28 a 350 $\mu\text{L s}^{-1}$. Na Figura 18 são apresentadas imagens do micro-motor, da fonte universal de tensão variável e da pipeta eletrônica usados no trabalho

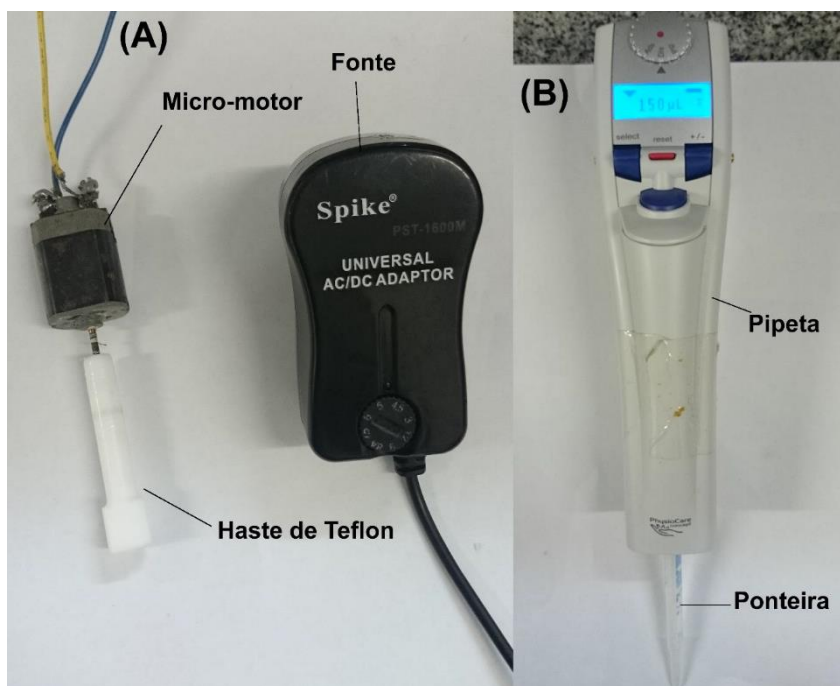


Figura 18. (A) Sistema de agitação para célula BIA; **(B)** Pipeta motorizada utilizada para as injeções no sistema BIA.

3.1.6 Análises comparativas por cromatografia líquida

Os resultados obtidos na determinação de NAF com os métodos propostos foram comparados aos obtidos por HPLC. Nestas análises, foi utilizado o equipamento Shimadzu LC-10 VP equipado com um detector UV-VIS (SPD-10AV), coluna cromatográfica com fase estacionária C_{18} (Phenomenex 110A° Gemini- C_{18} , 250 mm x 4.6 mm, 5 μm), uma bomba de duplo pistão LC-10AD-VP e injetor manual com alça de amostragem de 20 μL . A fase móvel foi composta por tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 2,8, corrigido com trietilamina) e metanol, na proporção 68:32 (v/v). A trietilamina é utilizada para minimizar o efeito de grupos silanóis presentes na coluna, ou nas fases estacionárias a base de sílica, promovendo diminuição no tempo de retenção (PEDROSO et al., 2011). O comprimento de onda fixado para detecção foi 280 nm e o fluxo da fase móvel empregado foi de 1,0 mL min^{-1} , de acordo com os trabalhos de (HUANG et al., 2014)

3.1.7 Análises comparativas por absorção atômica

Os resultados obtidos na determinação de Zn com o método proposto foram comparados aos obtidos por absorção atômica por chama (FAAS). Neste procedimento foi usado um equipamento modelo Varian® SpectrAA 220 (Victoria, Australia), cujas condições operacionais utilizadas encontram-se listadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Parâmetros instrumentais para determinação de zinco por FAAS. (MANOURI et al., 1998)

Parâmetro	Valor
Linha analítica utilizada	213,9 nm
Largura da fenda	0,7 nm
Corrente da lâmpada	10 mA
Largura do queimador	10 cm
Vazão do fluxo de acetileno	1,25 L min ⁻¹
Vazão do fluxo de ar	5,25 L min ⁻¹

3.2 Soluções, reagentes e preparação das amostras

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade superior a 18 MΩ cm⁻¹) obtida de sistema de purificação Direct-Q (Millipore). Todos os reagentes utilizados apresentavam pureza analítica e foram usados sem purificação prévia. Na **Tabela 2** constam os reagentes usados neste estudo com sua respectiva procedência.

Tabela 2. Lista de reagentes usados no presente trabalho e sua respectiva procedência.

Reagente	Origem	Reagente	Origem
Ácido Acético	Synth	Feniramina (FEN)	Sigma-Aldrich
Ácido Bórico	Sigma	Hidróxido de Sódio	Synth
Ácido Clorídrico	Synth	Nafazolina (NAF)	Sigma-Aldrich
Ácido Sulfúrico	Vetec	Trietilamina	Sigma-Aldrich
Ácido Fosfórico	Synth	Zinco Metálico	Synth
Álcool Metílico	Vetec		
Clorfeniramina (CLO)	Sigma-Aldrich		

As soluções estoque de NAF, CLO e FEN foram preparadas a partir da dissolução do sal em água deionizada, obtendo uma solução com concentração de 10 mmol L^{-1} . Posteriormente, todas estas soluções padrões foram diluídas em eletrólitos de suporte apropriados antes de serem usadas nos estudos [tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7), ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 10,0)] com os sistemas BIA-SWV e BIA-MPA.

A solução tampão acetato foi preparada a partir da dissolução de 5,7 mL de ácido acético em aproximadamente 950 mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado com NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e o volume foi completado com água deionizada para 1000 mL. Já a solução tampão Britton-Robbinson (BR) foi preparada pela mistura dos ácidos bórico, acético e fosfórico, todos com concentração de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Considerando a soma das concentrações dos componentes do tampão BR, foi estimada a concentração total de $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ para esse eletrólito. O pH foi ajustado com solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque de zinco (Zn) foi preparada a partir da dissolução de 100 mg do zinco metálico em 3 mL de uma mistura de ácido clorídrico concentrado e água deionizada (2:1). Após a dissolução total do sólido, o volume foi completado com água deionizada até 100 mL. A concentração da solução obtida foi de $1,000 \text{ mg mL}^{-1}$ (ppm) de Zn.

Todas as amostras analisadas no presente trabalho eram líquidas, as quais foram diluídas para concentração final adequada em eletrólito suporte usado na análise. Para amostras contendo a associação NAF + CLO, devido à ausência do medicamento que contém a formulação no mercado brasileiro, uma amostra manipulada em farmácia local foi adquirida, com proporção e concentração igual ao medicamento encontrado à venda no exterior (1:8 de NAF:CLO, em proporção molar).

3.3 Parâmetros analíticos utilizados nos métodos propostos

A seguir uma breve descrição dos parâmetros de mérito utilizados no presente trabalho (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2003; RIBANI et al., 2004; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2001).

3.3.1 Limite de detecção

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. Para os métodos que empregam uma curva analítica, o limite de detecção pode ser expresso como:

$$LD = \frac{3 \times DP_b}{a} \quad (4)$$

Na qual,

DP_b = desvio padrão relativo do branco;

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

3.3.2 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, que pode ser calculado como:

$$LQ = \frac{10 \times DP_b}{a} \quad (5)$$

3.3.3 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 da seguinte forma:

$$DPR (\%) = \frac{DP_x}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

onde:

DP_x = Desvio padrão da concentração encontrada;

$\bar{x}$ = concentração média encontrada.

3.3.4 Adição e recuperação

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

$$Recuperação (\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (7)$$

Onde:

C_1 = concentração do analito na amostra fortificada,

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada,

C_3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Considerações gerais

Os resultados e discussões abordados neste trabalho serão divididos em duas partes. Na primeira parte, serão apresentados os estudos realizados para desenvolver o método de determinação simultânea de Zn e NAF em BIA com detecção por voltametria de onda quadrada (SWV). Na segunda parte, serão apresentados os estudos relacionados com o desenvolvimento de um método para determinação simultânea de NAF + CLO e NAF + FEN em formulações farmacêuticas usando BIA com detecção amperométrica de múltiplos pulsos (MPA).

4.2 Parte I - Determinação simultânea de Zn e NAF em BIA empregando voltametria de onda quadrada

4.2.1 Estudos do comportamento eletroquímico da NAF por voltametria cíclica

A possibilidade de determinação de Zn por voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial usando eletrodo de BDD já foi demonstrada anteriormente (HONÓRIO et al., 2014). No entanto, em relação à NAF, nenhum trabalho foi localizado na literatura onde a determinação foi realizada empregando eletrodo de BDD. Somente métodos empregando potenciometria (GHOREISHI; BEHPOUR; NABI, 2006) ou voltametria cíclica e de pulso diferencial empregando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de prata (CHINIFOROSHAN; TABRIZI; POURRAHIM, 2014) foram reportados. Por isto, estudos iniciais empregando voltametria cíclica foram realizados para a investigação do comportamento eletroquímico da NAF usando BDD como eletrodo de trabalho. Na Figura 19 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo NAF $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em diferentes meios como eletrólito de suporte (ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ - pH 4,7 e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ - pH 2,0 e 7,0).

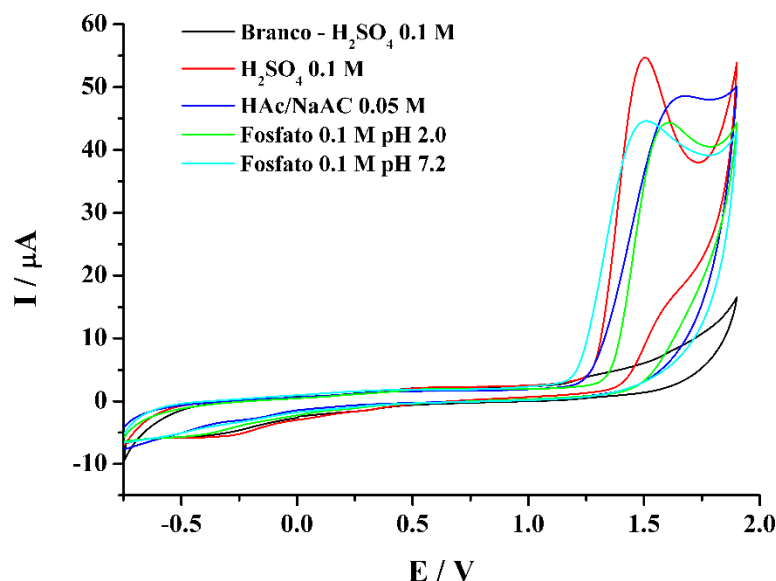


Figura 19. Voltamogramas cíclicos obtidos para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NAF em diferentes eletrólitos de suporte usando BDD como eletrodo de trabalho. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Incremento de potencial: 5 mV .

As respostas voltamétricas demonstraram a presença de um pico de oxidação na região de potencial entre $+1,5$ e $+1,6 \text{ V}$ para os eletrólitos estudados. Não foram observados picos de redução na varredura reversa, o que indica a existência irreversibilidade do processo de oxidação. Na região de potencial entre $-0,5 \text{ V}$ e $+0,2 \text{ V}$ podem ser observadas pequenas variações de corrente em relação ao sinal obtido para o eletrólito suporte sem a presença de NAF. No entanto, estas variações são características dos diferentes eletrólitos de suporte no estudo. Ou seja, o sistema apresenta comportamento irreversível nas condições estudadas.

4.2.2 Escolha do eletrólito de suporte

Uma vez que a determinação simultânea de Zn e NAF era almejada mediante a realização de uma única injeção no sistema BIA, estudos iniciais foram realizados empregando a técnica de amperometria de múltiplos pulsos (MPA). Dois pulsos de potenciais foram selecionados: (i) $-1,4 \text{ V}$: detecção de Zn por redução e, (ii) $+1,65 \text{ V}$: detecção de NAF por oxidação. O procedimento funcionou muito bem para detecção de NAF, no entanto, a detecção de Zn usando MPA não apresentou resultados satisfatórios. Inúmeros testes foram realizados com o intuito de detecção de Zn por MPA (variações no tempo e no pulso de potencial aplicados, número de pulsos aplicados, composição e pH de eletrólitos de suporte, velocidade de injeção, volume de injeção, detecção direta por redução e detecção por oxidação após rápida

pré-concentração), mas os resultados obtidos não foram reprodutíveis, provavelmente devido a elevada corrente capacitiva resultante da aplicação de pulsos de potenciais muito diferentes (-1,4 V para Zn e +1,65 V para NAF).

Assim, optamos pelo uso de uma técnica voltamétrica, uma vez que foi reportado anteriormente que a determinação de Zn é possível empregando voltametria de pulso diferencial e BDD como eletrodo de trabalho. No entanto, como a técnica de voltametria de pulso diferencial é uma técnica relativamente lenta, optamos por sua substituição por voltametria anódica de onda quadrada (ASW), a qual é uma técnica muito mais rápida (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; SOUZA et al., 2004) e, portanto, apresenta maior potencialidade para ser usada em sistemas BIA.

Inicialmente, o efeito dos eletrólitos de suporte nos quais foram observadas as maiores correntes de oxidação para a NAF (H_2SO_4 e HAc/NaAc) foram investigados para a determinação de Zn por voltametria de onda quadrada com redissolução anódica (SWASV). Estudos iniciais de investigação dos parâmetros envolvidos na etapa de voltametria de redissolução anódica (ASV) foram realizados em sistema estacionário, conforme descrito na seção 3.1.5. Os voltamogramas obtidos para uma solução contendo $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn usando H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ou Ac/NaAc $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólitos de suporte são exibidos na Figura 20.

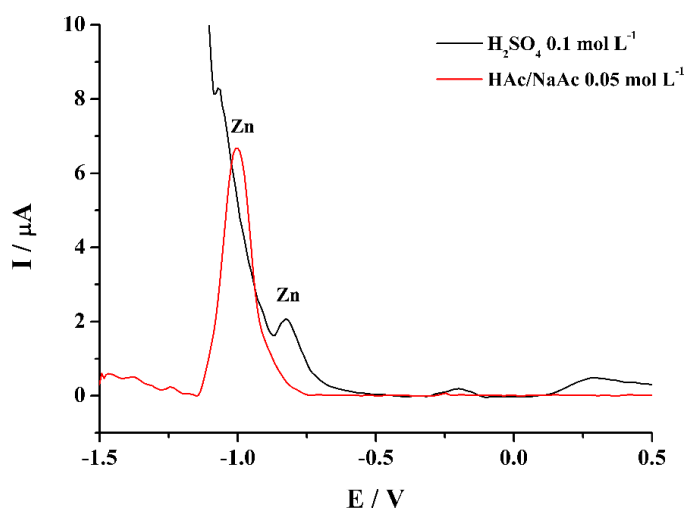


Figura 20. Voltamogramas de onda quadrada com redissolução anódica obtidos para solução contendo $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. Eletrólito de suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (—) ou HAc/NaAc $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (—). Eletrodo de trabalho: BDD; Tempo e potencial de deposição: 20 s e -1,5 V; $f = 50 \text{ s}^{-1}$; $a = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$.

Os resultados exibidos na **Figura 20** mostram que a eletrodeposição de Zn foi insatisfatória em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com corrente de pico inferior a $2 \mu\text{A}$. A evolução de hidrogênio durante a etapa de eletrodeposição e de redissolução pode ser responsável pelo pico deformado e baixa corrente de oxidação detectada. Por sua vez, o pico de oxidação do Zn obtido empregando tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,7$) apresentou perfil gaussiano, com corrente de pico de $7 \mu\text{A}$. Com base nos resultados obtidos, o tampão acetato foi selecionado para a realização das etapas posteriores do trabalho.

Após a definição do eletrólito suporte a ser usado, estudos foram realizados para obter informações adicionais sobre o processo eletroquímico existente entre o eletrodo de BDD e a NAF. A influência da velocidade de varredura foi avaliada no intervalo de 10 mV s^{-1} a 220 mV s^{-1} com o objetivo identificar se o transporte de massa da reação de oxidação é controlado por difusão ou adsorção das moléculas de NAF na interface eletrodo solução. Na **Figura 21** são apresentados os voltamogramas cíclicos referentes a este estudo.

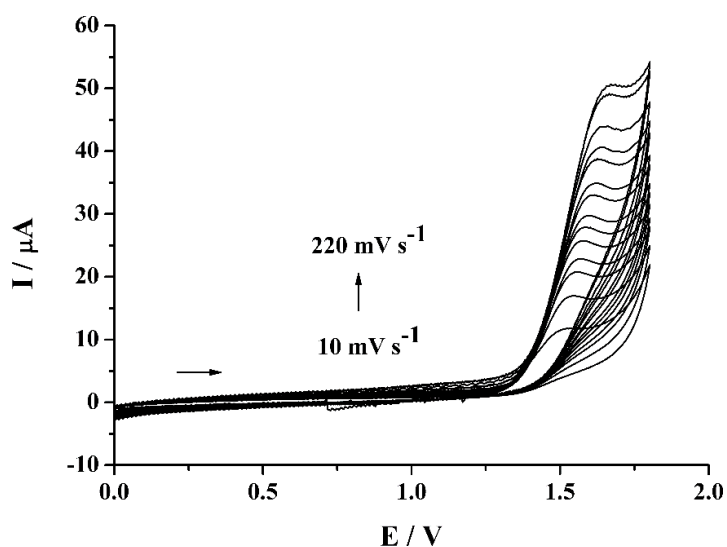


Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos para oxidação de NAF $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre eletrodo de BDD em diferentes velocidades de varredura. Eletrólito de suporte: HAc/NaAc $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,7$).

A relação entre corrente de pico (I_p) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) apresentou uma relação linear em todo intervalo de velocidade de varredura estudado, ($r = 0,998$). Este comportamento indica que o transporte de massa é controlado preferencialmente por difusão das espécies na superfície do eletrodo de BDD. Este resultado é confirmado na

Figura 22 (B), onde pode ser observado boa linearidade entre $\log I_p$ e $\log v$ para oxidação de NAF. Além disso, o valor do coeficiente angular do gráfico $\log I_p$ vs. $\log v$ apresentou um valor igual a 0,51, o que também confirma a natureza do transporte de massa, pois segundo a literatura (DAVID K. GOSSER, 1994), valores próximos a 0,50 indicam a existência de processos difusionais e valores próximos a 1,0, processos controlados por adsorção.

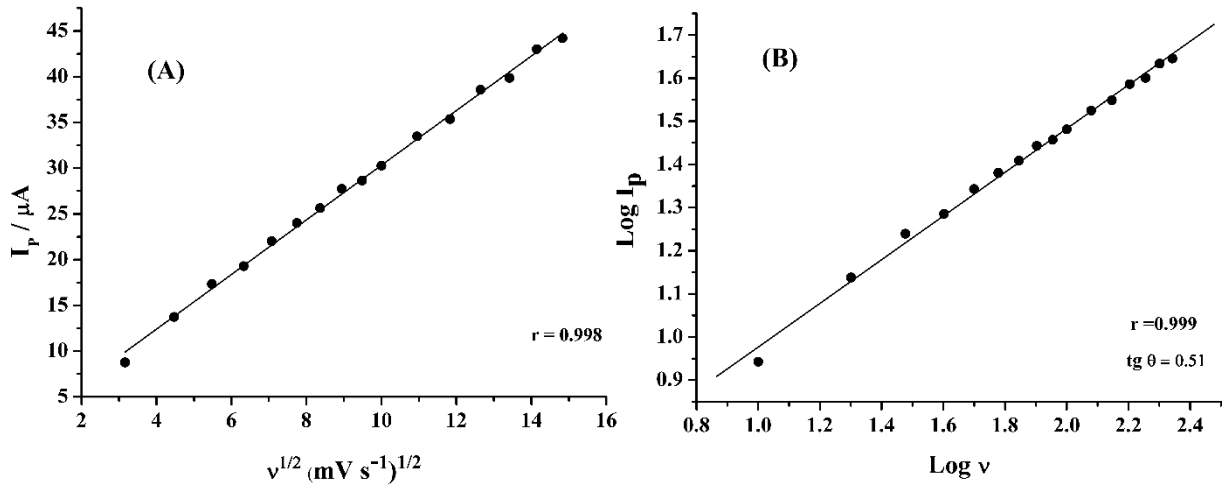


Figura 22. Relação entre corrente de pico e velocidade de varredura para voltamogramas cíclicos para NAF 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre BDD em tampão acetato 0,05 mol L^{-1} pH 4,7. **(A):** I_p vs. $v^{1/2}$. **(B):** $\log I_p$ vs. $\log v$.

Para processos redox totalmente irreversíveis, a relação entre o potencial de pico e a velocidade de varredura é dada pela equação abaixo (LAVIRON, 1979):

$$E_p = E^{0'} + \left(\frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right) \log \left(\frac{RT K^0}{\alpha n F} \right) - \left(\frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right) \log v \quad (8)$$

Onde: R é a constante dos gases, T, a temperatura, F, a constante de Faraday, K^0 , a constante de velocidade heterogênea, v , a velocidade de varredura, α , o coeficiente de transferência de carga, n , o número de elétrons e $E^{0'}$ é o potencial formal. A dependência entre potencial de pico (E_p) e logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$) é apresentada na **Figura 23**, em que se observou uma relação linear, com um coeficiente de correlação igual a 0,987 com equação da reta igual apresentada abaixo:

$$E_p = 0,1057(\log v) + 1,395 \quad (9)$$

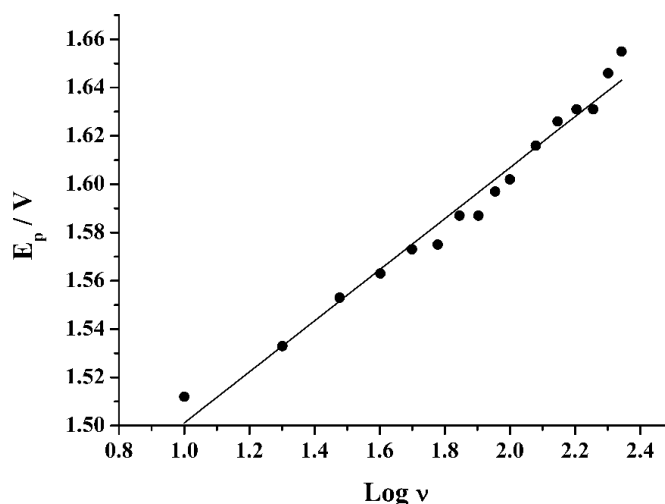


Figura 23. Relação entre potencial de pico (E_p) e $\log v$ para os voltamogramas exibidos na Figura 21.

A partir desta relação, foi possível calcular o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação da NAF, aplicando-se a inclinação da Equação (8) na Equação (9), com $T = 298$ K, $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ e $F = 96485,3 \text{ C mol}^{-1}$. Primeiramente, calculou-se o valor de αn como sendo igual a 0,559. Para moléculas orgânicas em soluções aquosas, o coeficiente de transferência eletrônica pode ser considerado igual a 0,5 (BARD; FAULKNER, 2001). Este resultado ($n = 1$) indica que o número de elétrons envolvido na oxidação da NAF é igual a 1.

4.2.3 Efeito da ativação do eletrodo de BDD no sinal voltamétrico de Zn e NAF

Conforme citado na seção 1.3, a ativação da superfície do eletrodo de BDD define a polaridade superficial do mesmo, sendo que a ativação anódica aumenta a quantidade de terminações contendo oxigênio e grupos hidroxila, e a ativação catódica favorece terminações contendo hidrogênio, alterando o comportamento eletroquímico do BDD (BARROS et al., 2005; PLESKOV, 2000). Dessa forma, o tipo de ativação da superfície de eletrodo de BDD foi avaliado. A Figura 24 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos após a injeção de solução contendo Zn + NAF no sistema BIA-SW, após a realização de cada um dos modos de ativação do eletrodo de BDD.

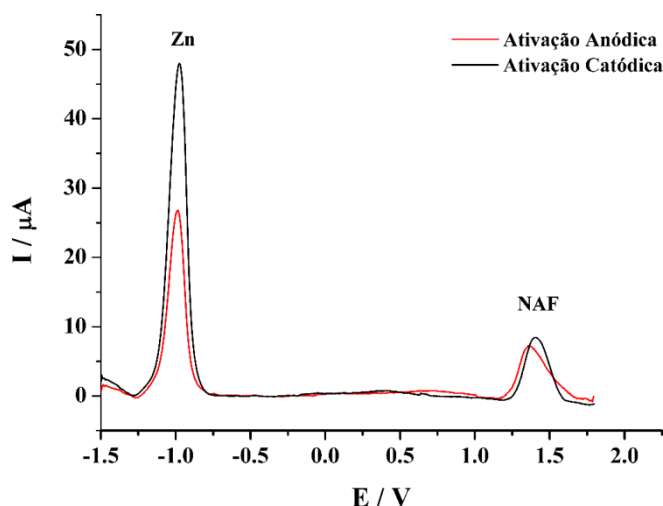


Figura 24. Comparação entre os voltamogramas de onda quadrada com redissolução anódica obtidos para solução contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF após a realização da ativação catódica (—) e anódica (—) do eletrodo de BDD. Eletrólito: HAc/NaAc (pH 4,7) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$; $f = 100 \text{ s}^{-1}$; $a = 60 \text{ mV}$; incremento de potencial = 6 mV .

Analisando a corrente de pico para a redissolução anódica de Zn, pode-se observar acentuada diminuição da corrente obtida após o tratamento anódico da superfície do eletrodo de BDD, possivelmente ocasionada pela mudança de polaridade da superfície do mesmo. Para a oxidação da NAF, é perceptível o deslocamento no potencial de pico, com alargamento do pico. Esse aumento na largura do pico pode estar relacionado à elevada reatividade dos radicais hidroxila adsorvidos na superfície do BDD, com o envolvimento em reações de oxidação do eletrólito de suporte e/ou formação de peróxido (OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2010). Com base nos resultados obtidos, o tratamento catódico foi utilizado para a realização das etapas subsequentes do trabalho, em função do perfil voltamétrico dos picos obtidos tanto para Zn quanto para NAF.

4.2.4 Seleção do potencial de deposição

Uma vez escolhido o eletrólito de suporte no qual a deposição de Zn apresentou maior sensibilidade e estabilidade, o efeito do potencial de deposição foi investigado. A Figura 25 apresenta os voltamogramas de redissolução por onda quadrada obtidos para soluções contendo $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn, em função do potencial de deposição aplicado ao eletrodo de BDD.

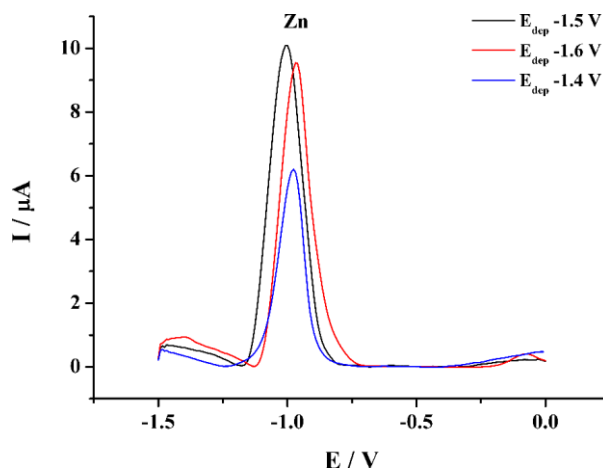


Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada com redissolução anódica obtidos para $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn em função do potencial de deposição. Eletrodo de trabalho: BDD; Eletrólito suporte: HAc/NaAc $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7). Velocidade de agitação: 1250 rpm; Tempo de deposição: 20 s; $f = 50 \text{ s}^{-1}$; $a = 25 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$

Com base nos resultados demonstrados na **Figura 25**, a aplicação do potencial de -1,6 V ocasionou pequena perda de sensibilidade, quando comparado ao sinal voltamétrico obtido mediante a aplicação de -1,5 V, provavelmente devido a maior evolução de hidrogênio no potencial de -1,6 V. A aplicação do potencial de -1,4 V não apresenta resultados satisfatórios, com corrente de pico menor quando comparada com aquela obtida pela aplicação do potencial de -1,5 V. Os resultados obtidos concordam com aqueles definidos por (HONÓRIO et al., 2014) para a quantificação de Zn usando BDD como eletrodo de trabalho. Dessa forma, o potencial de -1,5 V foi escolhido para a realização da deposição de Zn na etapa de ASV.

4.2.5 Tempo de deposição

Uma vez definido o potencial de deposição para a etapa de redissolução anódica, a influência do tempo de deposição no sinal voltamétrico obtido para o Zn foi investigado. Os voltamogramas obtidos para soluções contendo 30 e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e NAF, respectivamente, em função do tempo de deposição são exibidos na **Figura 26**.

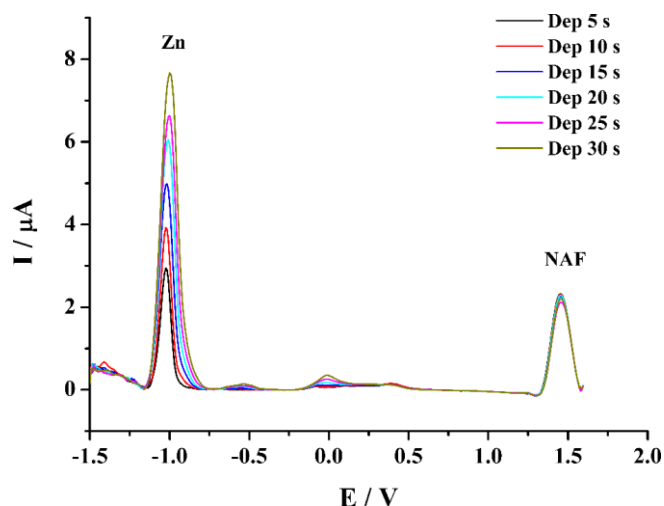


Figura 26. Voltamogramas de onda quadrada com redissolução anódica obtidos para solução contendo 30 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e NAF, respectivamente, em diferentes tempos de deposição. Eletrodo de trabalho: BDD; $E_{\text{dep}} = -1,5 \text{ V}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$.

Com base nos voltamogramas da **Figura 26**, é perceptível que o aumento no tempo de deposição ocasiona aumento significativo na área do pico obtido para a redissolução de Zn. A relação entre as áreas dos picos obtidos para Zn e NAF em função do tempo de deposição são exibidos na **Figura 27**.

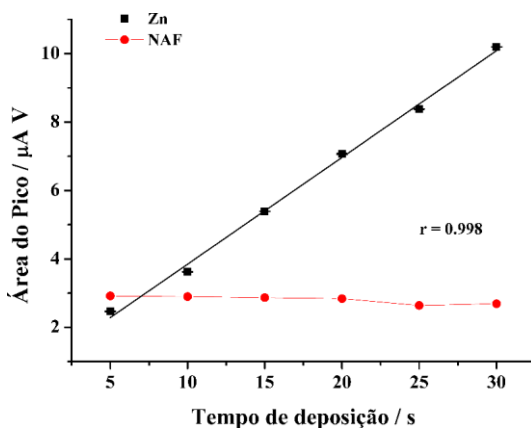


Figura 27. Relação entre as áreas dos picos de Zn ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) versus o tempo de deposição (t_{dep}). Dados da **Figura 26**.

Com base nos resultados demonstrados na **Figura 27**, é notável que o aumento no tempo de deposição para a etapa de redissolução anódica de Zn proporciona aumento linear na área do pico ($r = 0,998$). Além disso, é possível perceber que o aumento no tempo de deposição não

ocasiona variação significativa na área do pico obtido para NAF (RSD = 1,7%), apontando para a ausência de interação entre Zn e NAF.

Visando realizar análises rápidas, com elevada frequência analítica, o tempo de deposição de 5 segundos foi escolhido para a etapa analítica.

4.2.6 Velocidade de injeção

Outro parâmetro investigado na etapa de deposição de Zn foi a velocidade da injeção realizada durante a etapa de pré-concentração. Os voltamogramas obtidos para injeções sucessivas em diferentes velocidades são demonstrados na **Figura 28 (A)**.

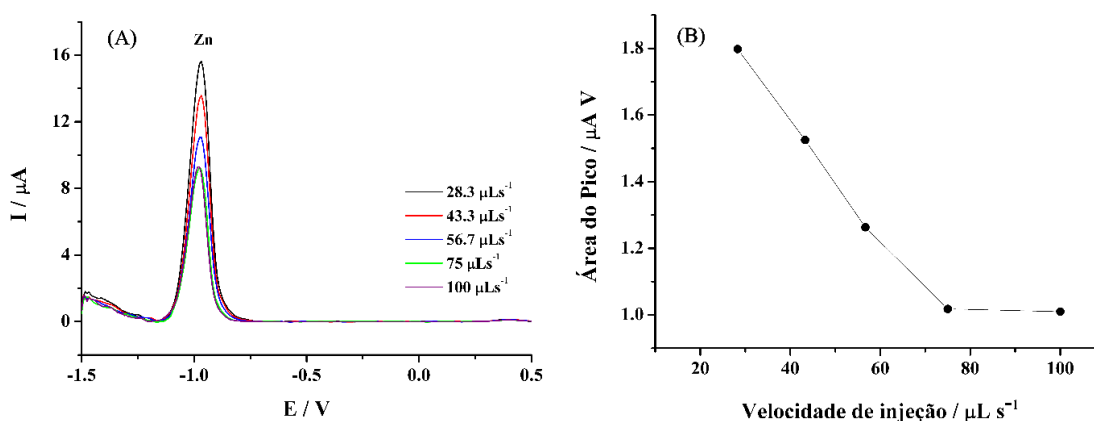


Figura 28. Voltamogramas obtidos para 30 $\mu mol L^{-1}$ de Zn sobre BDD em diferentes velocidades de injeção. Demais condições experimentais: idem **Figura 25**.

Analisando os resultados exibidos na **Figura 28 (B)** podemos perceber que o aumento na velocidade de injeção proporciona diminuição progressiva na área do pico obtido para a etapa de redissolução anódica de Zn. Isso ocorre porque a alíquota de solução injetada em velocidades mais elevadas não permanece em contato direto com o eletrodo, localizado no orifício em corte no fundo da célula BIA, prejudicando a deposição. Portanto, a velocidade de injeção mais lenta (28,3 $\mu L s^{-1}$) empregada nas etapas posteriores de estudo.

4.2.7 Linearidade

Uma vez que o objetivo do método proposto é a determinação simultânea de Zn e NAF a faixa linear de trabalho foi definida em termos da concentração de Zn, uma vez que essa

espécie apresenta a concentração mais elevada nas formulações farmacêuticas contendo ambos os analitos. A **Figura 29** apresenta os voltamogramas de redissolução anódica obtidos para injeções no sistema BIA de soluções com concentrações crescentes de Zn ($10 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$).

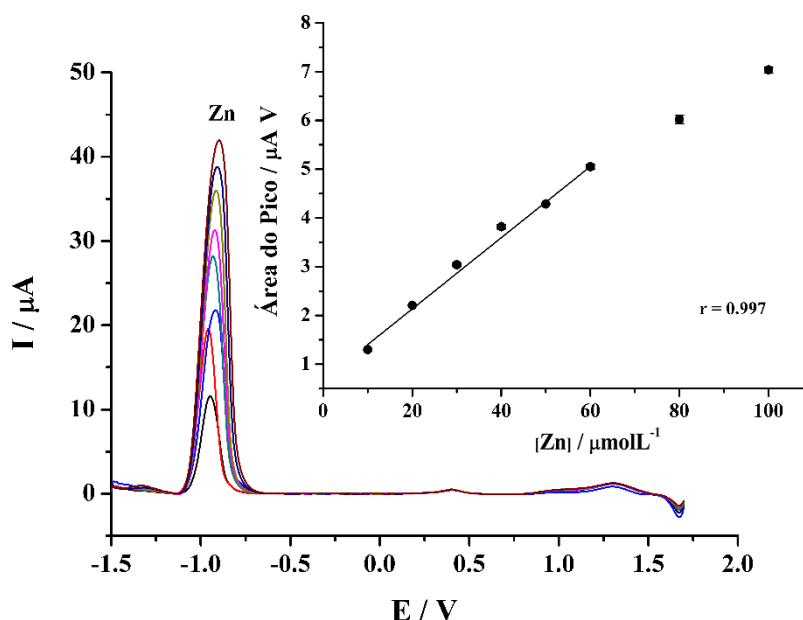


Figura 29. Voltamogramas obtidos para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de Zn ($10 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito: HAc/NaAc (pH 4,7) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ t_{dep} : 30 s; E_{dep} : -1,5 V; volume de injeção: 100 μL ; velocidade de injeção: $28,3 \mu\text{L s}^{-1}$.

Com base nos voltamogramas da **Figura 29**, e no gráfico obtido pela relação entre a concentração de Zn e a área do pico, a faixa linear para Zn estende-se de 10 a $60 \mu\text{mol L}^{-1}$, limitando a concentração de trabalho para a NAF na faixa de concentração de 3,5 a $21 \mu\text{mol L}^{-1}$, pois a concentração de NAF em formulações farmacêuticas comerciais é 3 vezes menor que a de Zn.

4.2.8 Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada

O desenvolvimento de um método de análise empregando voltametria de onda quadrada, os seguintes parâmetros instrumentais necessitam ser otimizados: amplitude de pulsos de potencial (a), frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f) e incremento de varredura de potencial (ΔE_s), onde é possível obter a melhor resposta, em termos de intensidade de corrente e perfil voltamétrico.

4.2.8.1 Frequência de aplicação de pulsos de potenciais

A frequência de aplicação dos pulsos é uma importante variável na SWV, pois pode fornecer informações importantes sobre a reversibilidade do sistema, tais como: número de elétrons envolvidos (sistemas reversíveis) e valor de αn (sistemas irreversíveis). Tais informações fornecem dados importantes para estudos do mecanismo pelo qual a reação redox ocorre (LOVRIĆ; KOMORSKY-LOVRIC, 1988).

No processo de oxidação da NAF, a variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial provocou um aumento na corrente de pico. A **Figura 30 (A)** mostra os voltamogramas de onda quadrada registrados para NAF 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com frequência de aplicação de pulso variando entre 10 s^{-1} e 140 s^{-1} , mantendo-se constante a amplitude de pulso em 50 mV e incremento de varredura em 2 mV. A **Figura 30 (B)** mostra o deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos, comportamento característico de processos irreversíveis. (O'DEA; OSTERYOUNG; OSTERYOUNG, 1981)

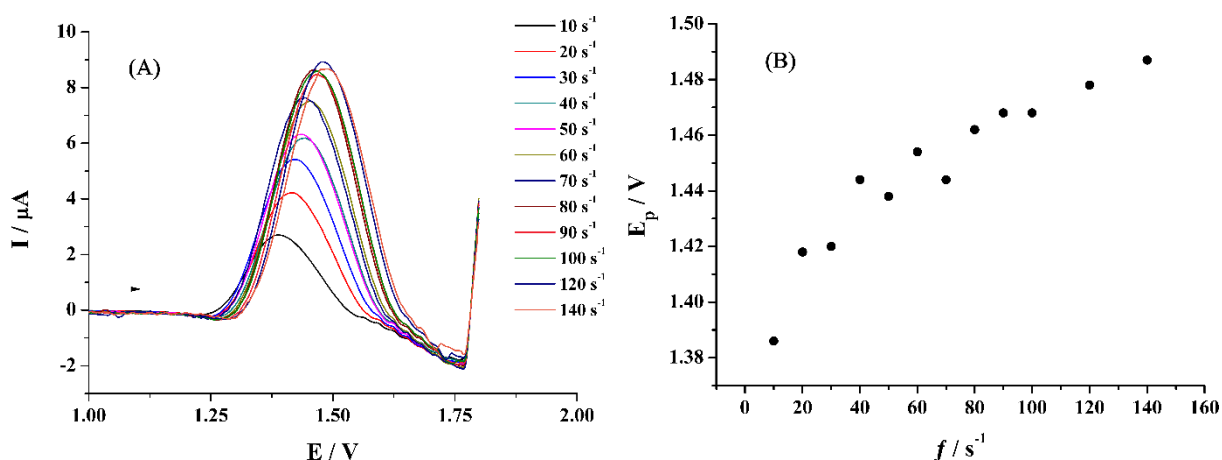


Figura 30. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para NAF 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potencial **(B)** Relação entre potencial de pico e a frequência de aplicação de pulso. Eletrólito: tampão HAc/NaAc 0,05 mol L^{-1} ; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

As relações entre corrente de pico (I_p) e frequência de aplicação de pulsos (f) e entre corrente de pico e raiz quadrada da frequência de aplicação de pulsos ($f^{1/2}$) foram avaliadas e são exibidas nas **Figuras 31 (A)** e **(B)** respectivamente.

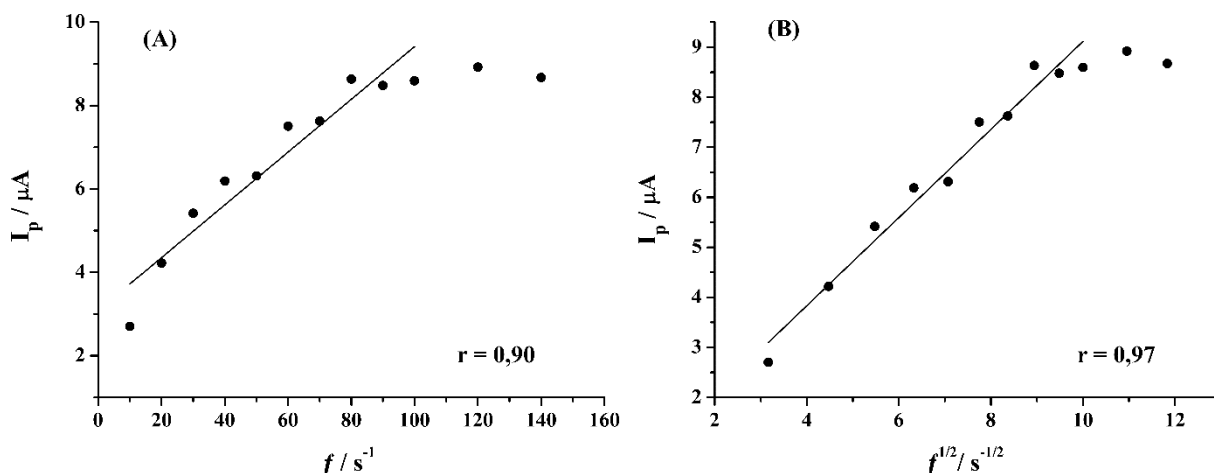


Figura 31. Relações entre corrente de pico e frequência aplicação dos pulsos para NAF 50 $\mu mol L^{-1}$, obtidas a partir dos voltamogramas da **Figura 30** (A): I_p vs. f , (B): I_p vs. $f^{1/2}$

Conforme a teoria proposta por (O'DEA; RIBES; OSTERYOUNG, 1993), em sistemas envolvendo processos de adsorção de espécies eletroativas na superfície do eletrodo, a corrente de pico varia linearmente com a frequência de aplicação da onda quadrada. Pelos resultados expostos na **Figura 31 (A)**, observou-se que as correntes não variam linearmente com a frequência de aplicação da onda quadrada, mostrando que o processo de oxidação não envolve, exclusivamente, a adsorção de NAF e/ou produtos de oxidação. Na sequência, a **Figura 31 (B)** mostra a relação entre corrente de pico e raiz quadrada da frequência de aplicação de onda quadrada. Neste caso, a corrente detectada apresentou melhor proporcionalidade à raiz quadrada da frequência de aplicação da onda quadrada até $f = 100 s^{-1}$, apresentando coeficiente de correlação igual a 0,970. Essa relação de linearidade é mais um indicativo de que o transporte de massa controlado por difusão das espécies eletroativas na superfície do eletrodo de BDD também está presente. Portanto, os dois fenômenos (adsorção e difusão) provavelmente estão presentes neste processo.

Ainda com os dados obtidos a partir dos voltamogramas da **Figura 30**, outra relação pode ser utilizada para avaliar os critérios de reversibilidade da oxidação da NAF, a caracterização do *máximo quase reversível* (KOMORSKY-LOVRIĆ, 2002). Esta relação é estabelecida pela avaliação de I_p/f vs. f . O aparecimento de um máximo caracteriza o processo como quase-reversível. A **Figura 32** apresenta o gráfico obtido.

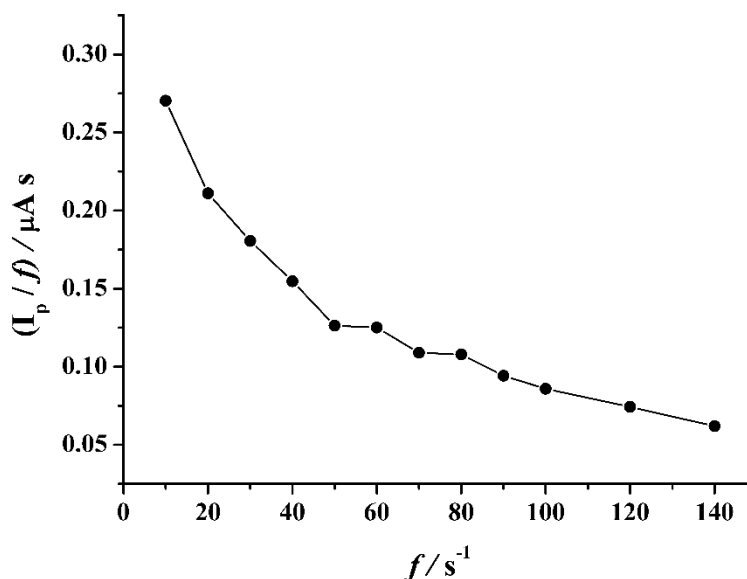


Figura 32. Relações entre I_p/f vs f para caracterização do máximo quase-reversível para NAF $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, obtidas a partir dos voltamogramas da **Figura 30**.

Analisando o gráfico da **Figura 32** é possível perceber que não ocorre a formação de máximo quase-reversível para NAF sobre BDD, indiciando, assim, que no intervalo de frequência estudado (10 a 140 s^{-1}) o processo de oxidação da NAF é irreversível.

A frequência de 100 s^{-1} foi selecionada para ser usada nos estudos seguintes, pois apresentou corrente em patamar máximo e perfil voltamétrico mais gaussiano para a oxidação da NAF.

4.2.8.2 Amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais

Outro parâmetro estudado foi a influência da amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais na corrente de pico de oxidação da NAF. A **Figura 33 (A)** mostra os voltamogramas obtidos mediante a variação deste parâmetro entre 10 e 70 mV , mantendo-se constante a frequência de aplicação de pulsos de potenciais em 100 s^{-1} e o incremento de varredura de potencial em 2 mV .

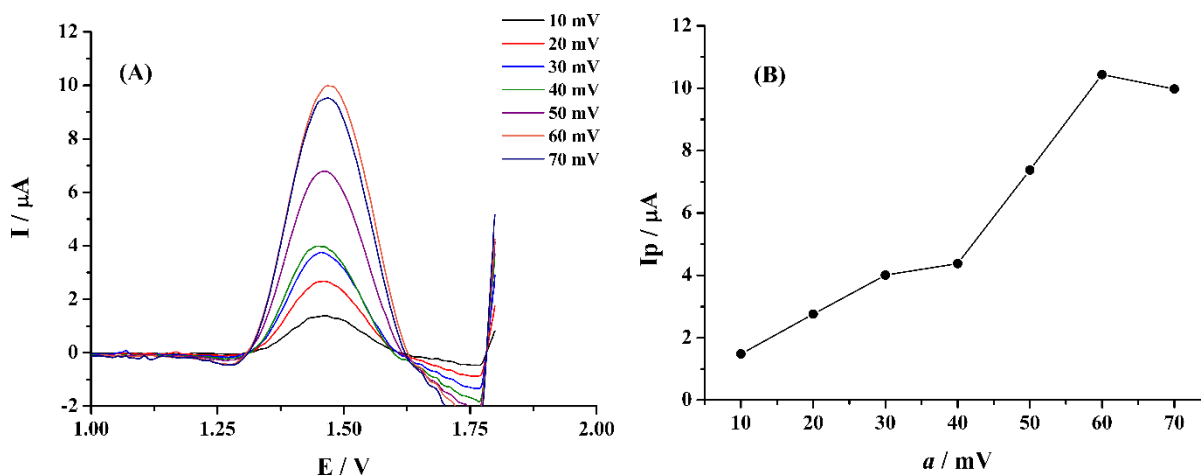


Figura 33. (A): Voltamogramas de onda quadrada obtidos para 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em função da variação nos valores de amplitude de pulso de potencial aplicados. **(B):** Relação entre corrente de pico e amplitude de pulsos. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Analisando as correntes de pico obtidas em diferentes amplitudes, é notável o comportamento linear até a amplitude de 60 mV, com os picos obtidos no intervalo de amplitude de 10 a 40 mV apresentando perfil voltamétrico pouco definido. Para valores de amplitude entre 40 e 60 mV pode-se observar ganho significativo nas correntes registradas na oxidação da NAF, com melhor definição nos picos obtidos. Com amplitude acima de 60 mV, a corrente tem pequeno decréscimo, como pode ser observado na **Figura 33 (B)**.

Pelos resultados obtidos, a amplitude de pulso de 60 mV foi selecionada para fins analíticos.

4.2.8.3 Incremento de varredura

O incremento de varredura de potencial (ΔE_s) determina o modo pelo qual o potencial é aplicado e é considerado como sendo a diferença de altura entre um degrau de potencial e o degrau seguinte, em uma escada de potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho na forma de escada. Em SWV, a velocidade de varredura é definida em função da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais e do incremento de varredura de potencial ($v = f \Delta E_s$) (NUWER; O'DEA; OSTERYOUNG, 1991).

O incremento de varredura de potenciais foi avaliado no intervalo entre 1 e 10 mV, mantendo-se constante a frequência e amplitude de aplicação de pulso em 100 s^{-1} e 50 mV, respectivamente. Os voltamogramas de onda quadrada registrados neste estudo são exibidos na

Figura 34 (A). Analisando-se esses resultados, observou-se que o aumento de incremento de potencial promoveu acréscimo significativo nos valores de corrente de pico até 6 mV, não ocorrendo ganho significativo na corrente de pico a partir desse valor. Além disso, pode-se notar o deslocamento do potencial de pico para valores positivos, indicando comportamento irreversível. (O'DEA; RIBES; OSTERYOUNG, 1993). **A Figura 34 (B)** exibe a relação entre a corrente de pico e o incremento de potencial.

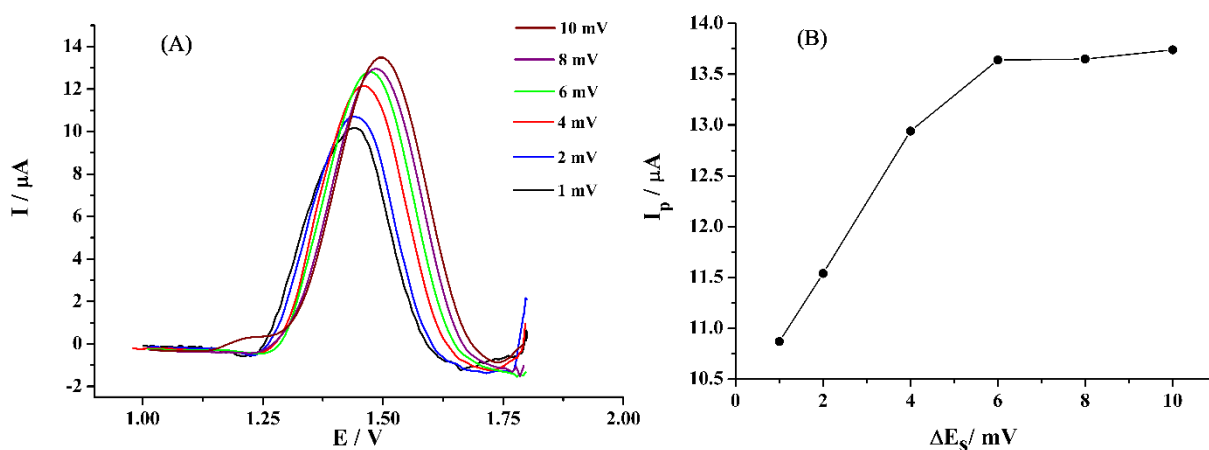


Figura 34. (A): Voltamogramas de onda quadrada obtidos para NAF 50 μmol L⁻¹ em função da variação no incremento de potencial. **(B)** Relação entre a corrente de pico e a variação do incremento de varredura. Eletrólito: HAc/NaAc (pH 4,7) 0,05 mol L⁻¹, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$.

Valores de incremento de varredura maiores podem aumentar o sinal obtido e melhorar a sensibilidade do método. No entanto, pode ocasionar alargamento dos picos, e a resolução dos voltamogramas pode ser comprometida, acarretando perda de seletividade na medida. Isso porque muitos pontos da medida voltamétrica serão omitidos e o voltamograma resultante ficará deformado (PACHECO, 2010). Em função dos resultados obtidos, o incremento de varredura de 6 mV foi selecionado para a realização do trabalho.

4.2.8.4 Componentes de correntes

Após a otimização dos parâmetros relacionados com a SWV, experimentos foram realizados sob as condições otimizadas para analisar as componentes de corrente (corrente direta, reversa e resultante), as quais também podem ser usadas para obter informações sobre a reversibilidade do processo redox em estudo. Na **Figura 35** são apresentados os voltamogramas

de onda quadrada obtidos com solução contendo NAF $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ com a separação das componentes de corrente direta, reversa e resultante.

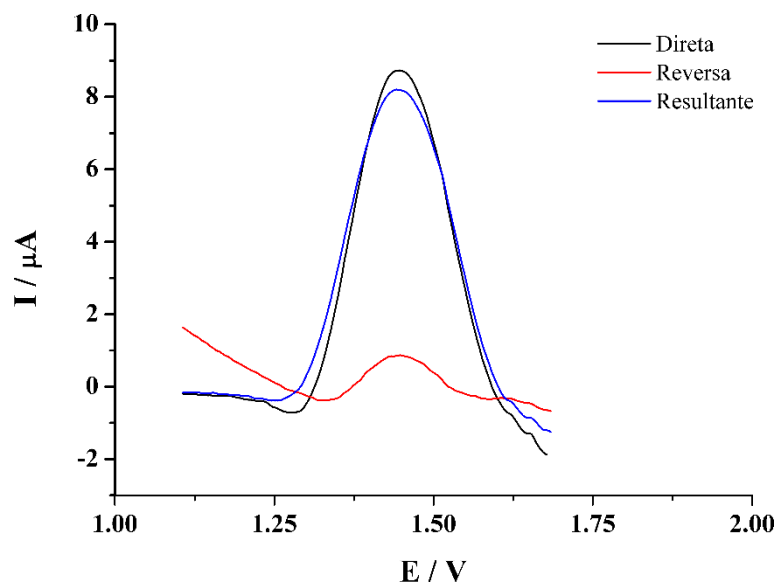


Figura 35. Voltamogramas de onda quadrada obtidos com solução contendo NAF $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ com a separação das componentes de corrente. Eletrodo de trabalho: BDD Eletrólito: HAc/NaAc (pH 4,7) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$; $f = 100 \text{ s}^{-1}$; $a = 60 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$.

A análise das componentes de corrente direta (relacionada ao pulso direto ou processo de oxidação) e corrente reversa (relacionada ao pulso inverso ou processo de redução), mostrou a presença de um pico de oxidação no sentido do pulso direto e um pico no pulso reverso. De acordo com os critérios da voltametria de onda quadrada, os picos reversos no mesmo sentido dos pulsos diretos ocorrem quando a difusão das espécies oxidadas é muito lenta. Assim, quando o pulso reverso é aplicado, ainda ocorre a oxidação de reagentes. Além disso, como a intensidade das correntes direta e reversa é diferente e somente ocorrem processos de oxidação tanto no pulso direto quanto no pulso reverso, o processo redox da NAF sobre BDD pode ser considerado com sendo irreversível nas condições estudadas (MIRCESKI; KOMORSKY-LOVRIC; LOVRIC, 2007).

4.2.9 Repetibilidade

Após a definição das melhores condições de trabalho, um estudo para avaliação da repetibilidade do método BIA-SWV proposto foi realizado. Na **Figura 36** são apresentados os

resultados obtidos para 20 injeções sucessivas de soluções contendo Zn + NAF em duas concentrações diferentes: **(A)** 30 + 10 e **(B)** 60 + 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e NAF, respectivamente.

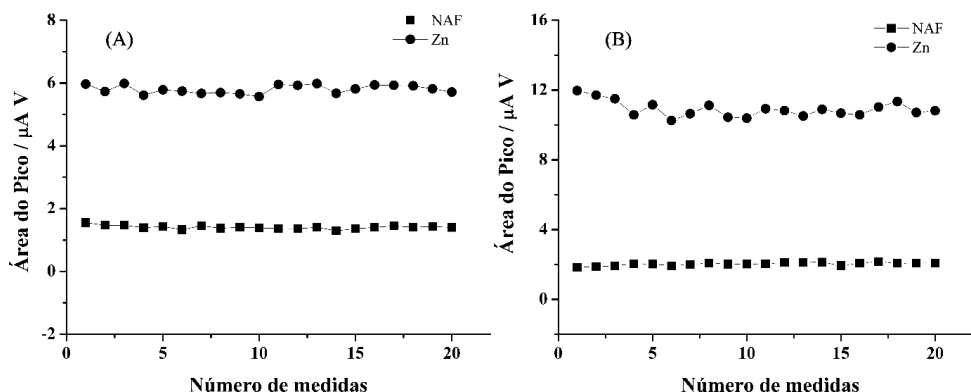


Figura 36. Resultados obtidos por BIA-SWV para injeções sucessivas de soluções contendo 30 + 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **(A)** e 60 + 20 **(B)** $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e NAF, respectivamente ($n = 20$). $t_{\text{dep.}}$: 5 s; $E_{\text{dep.}}$: -1,5 V; volume de injeção: 100 μL ; velocidade de injeção: 28,3 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Os resultados mostrados na **Figura 36** demonstram flutuações aleatórias nas áreas de picos registradas ao longo das medidas, contudo é possível perceber a ausência contaminação significativa da superfície do eletrodo, não havendo decaimento constante da área dos picos registrados. O desvio padrão relativo calculado para Zn foi 0,5% e 1,0%, respectivamente. Já o desvio padrão apresentado pela NAF foi calculado em 0,9% e 1,0%, respectivamente.

4.2.10 Estudo de interferência entre Zn e NAF

Neste estudo, a possibilidade de interferência recíproca entre a redissolução anódica de Zn e a oxidação da NAF foi investigada. Na **Figura 37 (A)** são apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos para soluções contendo concentrações crescentes de NAF (5 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e constante de Zn (60 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

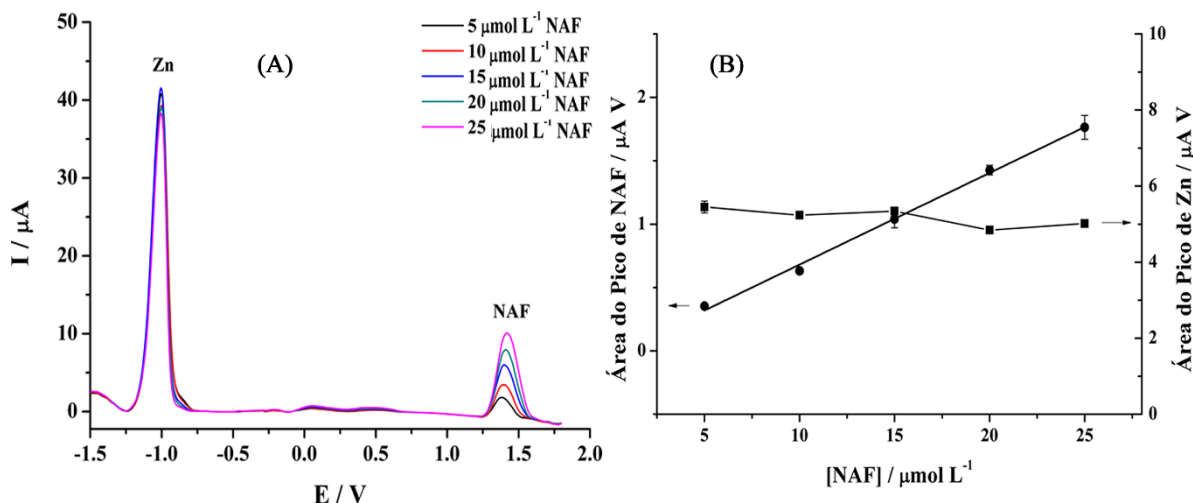


Figura 37. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para soluções contendo concentrações crescentes de NAF (5 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e constante de Zn (60 $\mu\text{mol L}^{-1}$). **(B)** Variação das áreas do pico de NAF (●) e Zn (■).

Como podemos verificar na **Figura 37 (B)**, a área do pico da NAF aumenta linearmente com o aumento de concentração ($r = 0,998$), enquanto que a área do pico do Zn se mantém relativamente constante (RSD = 2,1 %).

O mesmo estudo foi realizado para soluções contendo concentrações crescentes de Zn (10 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e mantendo a concentração de NAF constante em 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os voltamogramas obtidos são exibidos na **Figura 38 (A)**.

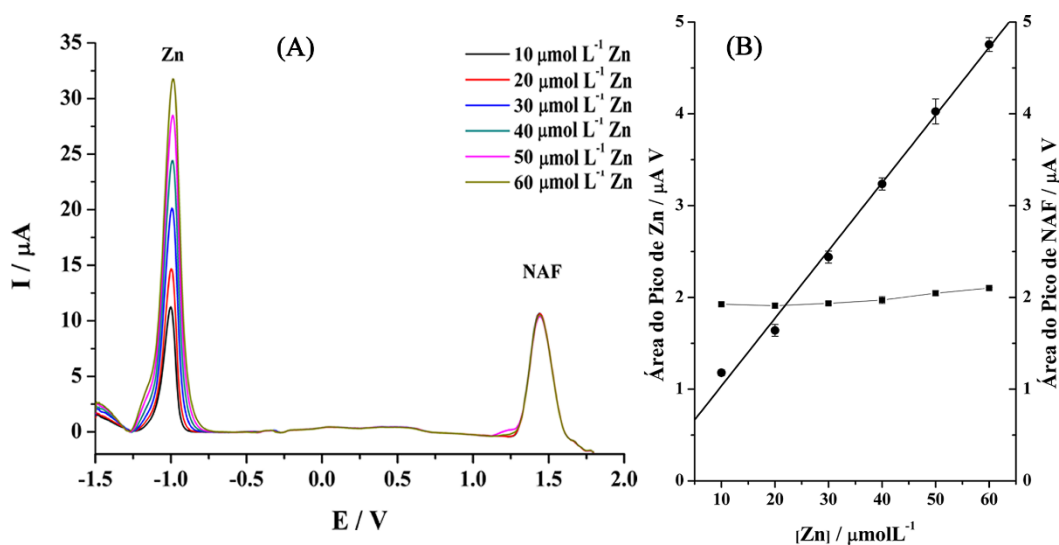


Figura 38. **(A)** Voltamogramas de onda quadrada obtidos para soluções contendo concentrações crescentes de Zn (10 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e constante de NAF (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$). **(B)** Variação das áreas do pico de NAF (●) e Zn (■).

Como podemos verificar na **Figura 38 (B)**, a área do pico de Zn aumenta linearmente com o aumento de concentração ($r = 0,997$), enquanto que a área do pico do NAF se mantém relativamente constante ($RSD = 3,5 \%$). Com base nos resultados exibidos nas **Figuras 37 e 38** e nos RSD calculados, podemos dizer que não há interferência entre as etapas de redissolução anódica e a oxidação da NAF, na faixa de concentração estudada.

4.2.11 Aplicação do sistema BIA-SWV na análise simultânea de Zn e NAF em formulações farmacêuticas

Após a otimização das condições experimentais (tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,7, $E_{\text{dep}} = -1,5 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 5 \text{ s}$, volume de injeção = $100 \text{ }\mu\text{L}$ e velocidade de injeção = $28,3 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$) e voltamétricas ($f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 60 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$), curvas analíticas foram construídas.

As curvas de calibração para ambos analitos foram obtidas com injeções de soluções contendo Zn e NAF, levando em consideração a faixa linear para Zn (10 a $50 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$), e a proporção molar de concentração da amostra (proporção molar de 3:1 para Zn e NAF). A **Figura 39** apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para injeções de soluções contendo Zn e NAF em ordem crescente de concentração.

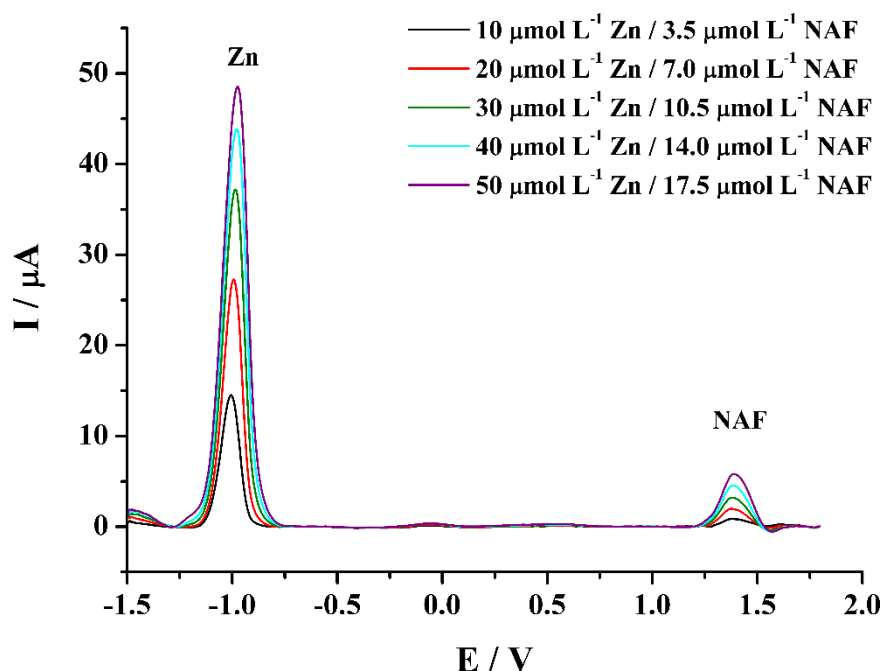


Figura 39. Voltamogramas de onda quadrada obtidas para injeções de soluções contendo concentrações crescentes de Zn e NAF. Demais condições experimentais: idem **Figura 36**.

Com base na média das áreas dos picos obtidos pela injeção em triplicata para cada solução, curvas de calibração foram construídas para Zn e NAF, conforme demonstrado na **Figura 40**.

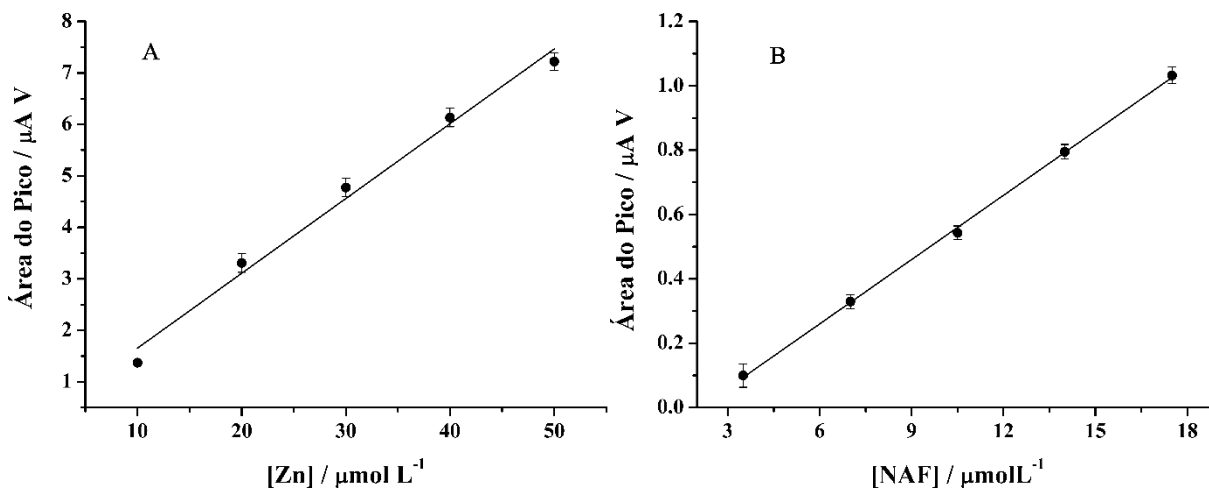


Figura 40. Curvas de calibração obtidas para Zn (A; $r = 0,992$) e NAF (B; $r = 0,999$) a partir dos dados analíticos da **Figura 39**.

As curvas de calibração obtidas para Zn e NAF apresentaram as seguintes equações:

$$y = 0,145[\text{Zn}] + 0,204 \quad (r = 0,992)$$

$$y = 0,067[\text{NAF}] - 0,139 \quad (r = 0,999)$$

A exatidão do método BIA-SWASV proposto também foi avaliada por testes de adição e recuperação utilizando amostras contendo Zn e NAF. As amostras foram analisadas antes e após a adição de concentrações conhecidas de ambos os analitos. A recuperação média foi de $96 \pm 3\%$ ($n = 3$) e de $96 \pm 4\%$ ($n = 3$) para Zn e NAF, respectivamente. Com base nestes resultados, podemos afirmar que o método proposto não possui efeitos significativos de matriz para a determinação simultânea de Zn e NAF em formulações farmacêuticas. A **Tabela 3** reúne as características analíticas do método proposto.

Tabela 3. Características analíticas do método proposto.

Característica	Zn	NAF
r	0,992	0,999
Inclinação ($\mu\text{A V L } \mu\text{mol}^{-1}$)	$0,145 \pm 0,009$	$0,067 \pm 0,001$
Intercepto ($\mu\text{A V}$)	$0,204 \pm 0,030$	$-0,139 \pm 0,012$
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,126	0,040
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,420	0,132
Frequência Analítica	70	70
Repetibilidade Intra-dia	0,98%	0,97%
Recuperação	$96 \pm 3\%$	$96 \pm 4\%$

Onde: r: coeficiente de correlação; LD: limite de detecção e LQ: limite de quantificação. Intervalo de confiança = 95%.

O método BIA-SWV proposto foi empregado para determinar Zn e NAF em duas amostras de formulações farmacêuticas. Para comparação, as amostras também foram analisadas por FAAS, para determinação de Zn e HPLC, para quantificação de NAF. A **Tabela 4** mostra os resultados obtidos para a análise destas amostras com os respectivos desvios padrão ($n = 3$).

Tabela 4. Comparação dos resultados (média $\pm$ DP; $n = 3$) obtidos para a determinação de Zn e NAF em amostras farmacêuticas usando o método proposto versus FAAS (Zn) e HPLC (NAF).

Amostras	Valor da Bula (mg/mL)		Valores Encontrados (mg/mL)			
	Zn	NAF	BIA		FAAS	HPLC
			Zn	NAF	Zn	NAF
Amostra 1	0,122	0,150	$0,124 \pm 0,003$	$0,153 \pm 0,004$	$0,120 \pm 0,001$	$0,146 \pm 0,003$
Amostra 2	0,122	0,150	$0,123 \pm 0,003$	$0,132 \pm 0,001$	$0,126 \pm 0,002$	$0,132 \pm 0,003$

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 4**, podemos afirmar que os resultados obtidos com o método proposto (BIA-SWV) e os métodos de referência, HPLC e FAAS são similares, o que comprova a exatidão do método proposto. A um nível de confiança de 95%, os valores do teste t calculados foram menores do que o valor crítico teórico (2,78, n

= 3), o que indica que estatisticamente não houve diferenças significativas entre os resultados encontrados com ambos os métodos.

4.3 Parte II - Estudos para a determinação simultânea de NAF e FEN ou NAF e CLO por BIA-MPA

4.3.1 Comportamento eletroquímico de NAF, FEN e CLO

No mercado nacional e mundial, a NAF é comercializada como princípio ativo de formulações farmacêuticas concomitantemente com FEN ou CLO. Assim, no presente trabalho propomos a determinação simultânea dos pares NAF + FEN e NAF + CLO. Inicialmente, foram realizados estudos por voltametria cíclica para verificar o comportamento eletroquímico das três espécies empregando tampão BR na faixa de pH de 2,0 a 10,0. Nas **Figura 41, 42 e 43** são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos em função do pH do tampão BR para soluções contendo $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de NAF, e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ FEN e CLO, respectivamente.

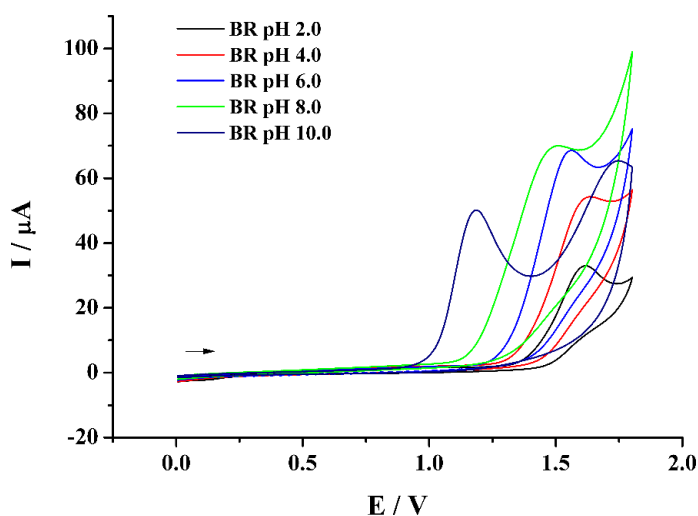


Figura 41. Voltamogramas cíclicos obtidos para solução contendo $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de NAF em tampão BR com diferentes valores de pH (2 a 8) e 1 mmol L^{-1} (pH 10). Eletrodo de trabalho: BDD; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; ΔE_s : 5 mV .

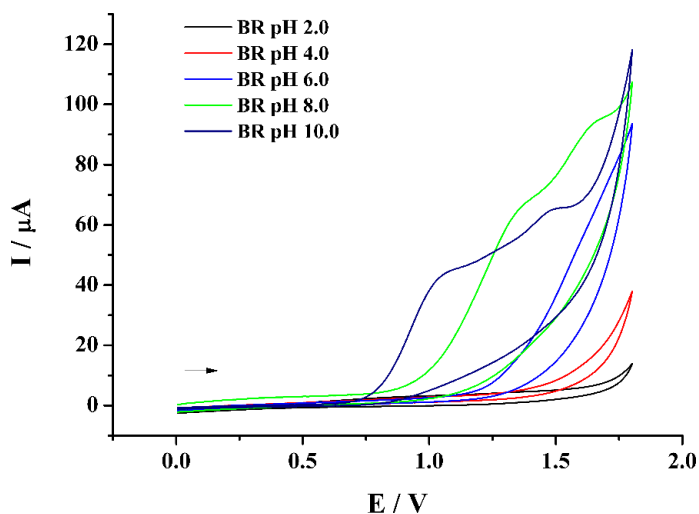


Figura 42. Voltamogramas cíclicos obtidos para solução contendo de 1 mmol L^{-1} de FEN em tampão BR com diferentes valores de pH (2 a 10). Eletrodo de trabalho: BDD; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; ΔE_s : 5 mV.

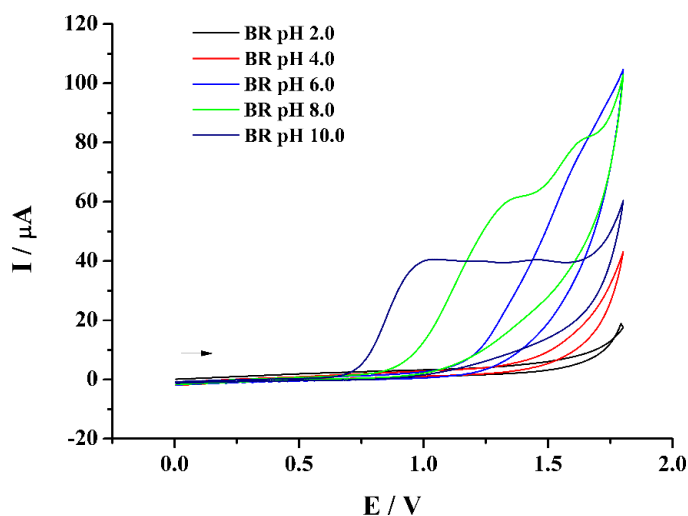


Figura 43. Voltamogramas cíclicos para oxidação de 1 mmol L^{-1} de CLO em tampão BR com diferentes valores de pH (2 a 10). Eletrodo de trabalho: BDD; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; ΔE_s : 5 mV.

Não foram observados picos de redução na varredura reversa, o que indica irreversibilidade dos processos de oxidação destes compostos. A **Figura 44** apresenta a variação do potencial (A) e corrente de pico (B) de oxidação de NAF, FEN e CLO em função do pH do tampão BR.

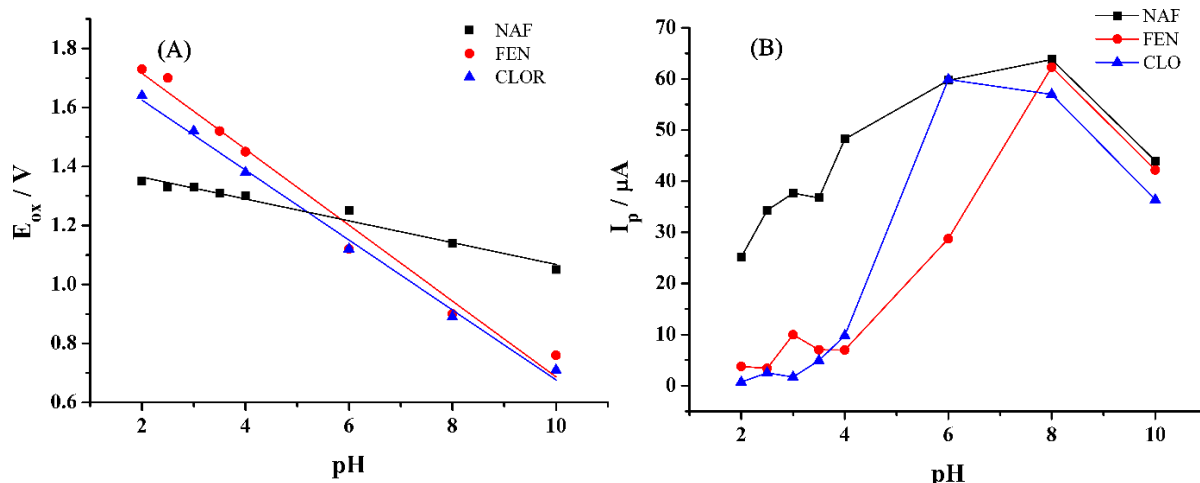


Figura 44. (A) Relação entre potencial de oxidação (E_{ox}) versus pH e, (B) Relação entre corrente de pico (I_p) versus pH para NAF, FEN e CLO, em tampão BR.

Conforme podemos observar na **Figura 44 (A)**, o potencial de oxidação de todos os compostos é influenciado pelo pH do eletrólito de suporte. Os picos de oxidação dos três compostos em estudo tornam-se menos positivos com o aumento do pH do meio. Esse deslocamento de potencial é um indício de que prótons estejam envolvidos no mecanismo de oxidação das moléculas. A reta obtida para NAF apresenta coeficiente angular de $-0,040 \text{ V pH}^{-1}$ ($r = 0,985$). Para FEN e CLO, a inclinação encontrada foi de $-0,128 \text{ V pH}^{-1}$ ($r = 0,989$) e $-0,118 \text{ V pH}^{-1}$ ($r = 0,997$). Com base nos valores de inclinação encontrados, o mesmo número de prótons e elétrons estão envolvidos na oxidação da NAF ($1 \text{ H}^+ : 1 \text{ e}^-$), enquanto que para FEN e CLO, para cada elétron perdido na oxidação, tem-se o dobro de prótons envolvidos no processo ($2 \text{ H}^+ : 1 \text{ e}^-$).

Em relação as correntes de pico, NAF apresenta um comportamento diferente das outras moléculas, enquanto a corrente de pico da NAF diminui com o aumento do pH, as correntes de pico da FEN e CLO aumentam com o aumento do pH do meio. Além disto, a corrente de oxidação de FEN e CLO em soluções com pH abaixo de 3 é próxima de zero, o que o impede a quantificação destes compostos nestas soluções.

Com base nos estudos realizados com as três moléculas empregando voltametria cíclica, foi possível observar que as maiores separações entre os potenciais de oxidação da NAF e FEN ou CLO ocorre em meio de tampão BR pH 10. Para melhor visualização, os voltamogramas obtidos neste pH são apresentados na **Figura 45**. O tampão BR (pH = 10) foi selecionado como eletrólito suporte nos estudos subsequentes.

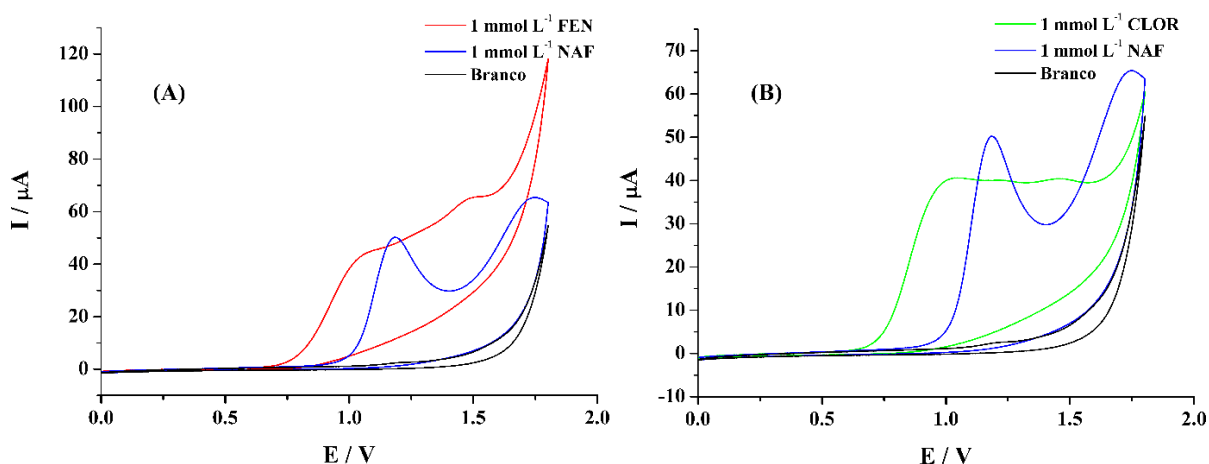


Figura 45. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos soluções contendo 1 mmol L^{-1} de NAF e FEN; **(B)** Voltamogramas cíclicos obtidos soluções contendo 1 mmol L^{-1} de NAF e CLO. Eletrólito suporte: tampão BR pH 10, velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Como o objetivo do trabalho era a determinação simultânea de NAF + FEN e NAF + CLO por BIA-MPA, estudos também foram realizados por voltametria hidrodinâmica. Usando a técnica de MPA, dez pulsos de potenciais, (+0,6; +0,7; +0,8; +0,9; +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5 V; 50 ms cada) foram aplicados continuamente ao eletrodo de trabalho de BDD posicionado no sistema BIA. A corrente em cada pulso de potencial foi continuamente monitorada durante três injeções de soluções contendo $12 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF (■) ou $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de FEN (■) ou $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de CLO (●). A média ($n = 3$) da corrente de pico detectada em cada amperograma foi usada na construção do voltamograma hidrodinâmico de oxidação das três espécies em estudo, conforme demonstrado na **Figura 46**.

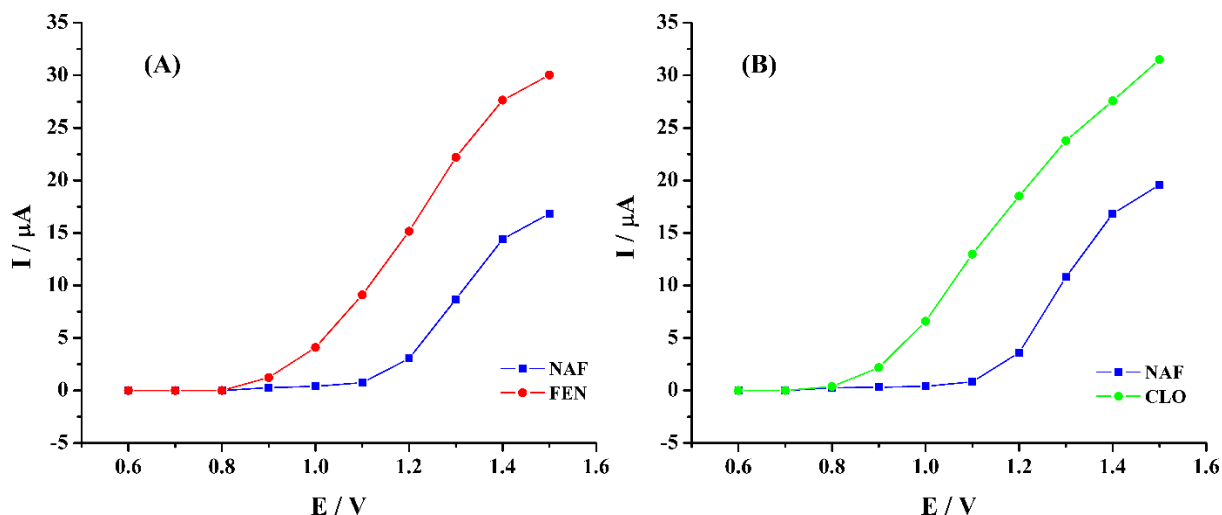


Figura 46. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos com o sistema BIA-MPA para **(A)** NAF (■; $12 \mu\text{mol L}^{-1}$) e FEN (▲; $100 \mu\text{mol L}^{-1}$), e **(B)** NAF (■; $12 \mu\text{mol L}^{-1}$) e CLO (●; $100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms. Eletrólito de suporte: tampão BR pH 10. Velocidade de injeção: $75 \mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado: $150 \mu\text{L}$.

4.3.2 Seleção dos pulsos de potenciais para determinação simultânea de NAF e FEN ou CLO por BIA-MPA

Nos voltamogramas hidrodinâmicos da **Figura 46** podem ser notados comportamentos similares aos obtidos por voltametria cíclica. A oxidação de FEN e CLO tem início em potencial próximo a +0,9 V e a oxidação da NAF somente se inicia em potenciais acima de +1,2 V. Com base nos resultados apresentados na **Figura 46** os seguintes pulsos de potenciais foram selecionados para determinação simultânea de NAF + FEN ou NAF + CLO, utilizando a procedimento de BIA-MPA:

- +1,1 V/ 50 ms: oxidação de FEN ou CLO, sem a interferência da NAF;
- +1,3 V/50 ms: oxidação de ambas espécies (FEN + NAF ou CLO + NAF);
- +0,6 V/150 ms: pulso de potencial de limpeza eletroquímica.

A **Figura 47 (A)** apresenta a escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD posicionado no sistema BIA-MPA. Na **Figura 47 (B)** são apresentados os amperogramas obtidos nos pulsos de potenciais de +1,1 V e +1,3 V após injeções ($n = 3$) no

sistema BIA-MPA de alíquotas de 150 μL de soluções contendo somente NAF, somente FEN e mistura dos dois compostos (NAF + FEN).

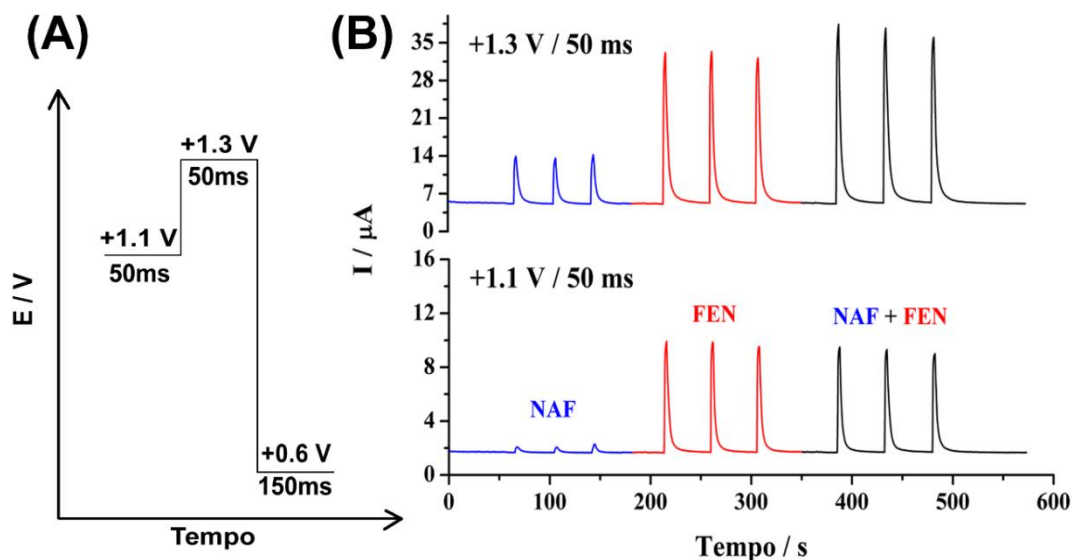


Figura 47. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD. (B) Amperogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FEN e mistura dos dois compostos (NAF + FEN) nas mesmas concentrações anteriores. Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms. Demais condições experimentais iguais a Figura 46.

Analisando a Figura 47 (B) podemos perceber que apenas a FEN é oxidada em +1,1 V, sendo que corrente detectada é a mesma na presença ou ausência de NAF, uma vez que a corrente proveniente da oxidação da NAF em +1,1 V é muito pequena e pode ser desconsiderada. A semelhança na corrente detectada na injeção das duas soluções (FEN e NAF + FEN) também indica que não há interação química entre NAF e FEN ou com os respectivos produtos de oxidação. Em +1,3 V, tanto NAF como a FEN são oxidadas. Na injeção de uma solução contendo ambas as espécies, a corrente de oxidação em +1,3 V corresponde, aproximadamente, à soma das correntes de oxidação individuais da NAF e FEN neste pulso de potencial.

O mesmo teste de seletividade foi realizado para solução contendo NAF + CLO. A Figura 48 (A) apresenta a escada de potenciais aplicados em função do tempo ao eletrodo de

BDD posicionado do sistema BIA-MPA. Na **Figura 48 (B)** são apresentados os amperogramas obtidos nos pulsos de potenciais +1,1 V e +1,3 V após injeções ($n = 3$) no sistema BIA-MPA de alíquotas de 150 μL de soluções contendo somente NAF, somente CLO e mistura dos dois compostos (NAF + CLO).

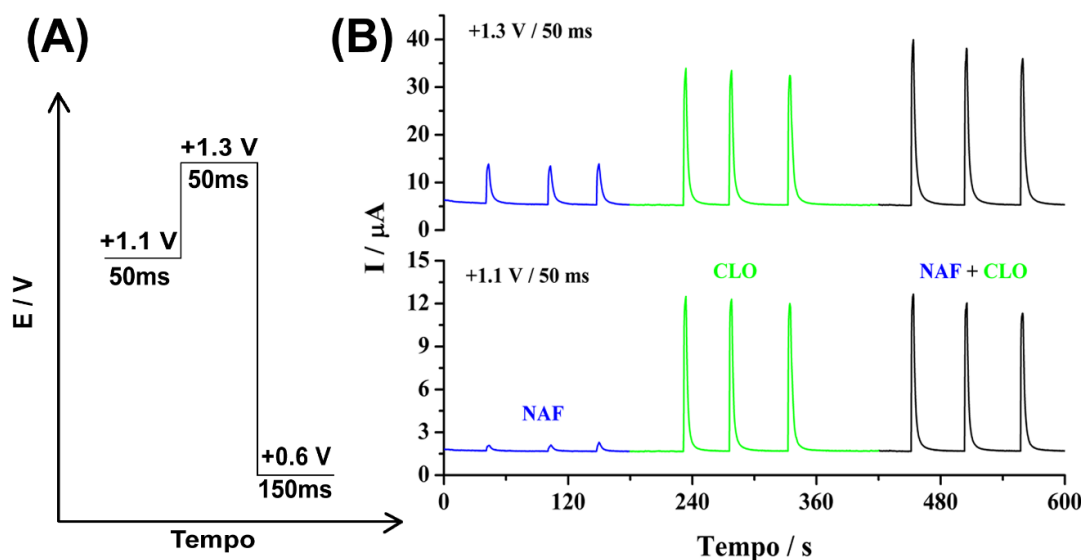


Figura 48. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD. (B) Amperogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF, e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CLO e mistura dos dois compostos (NAF + CLO) nas mesmas concentrações anteriores. Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms. Demais condições experimentais iguais a **Figura 46**.

Analisando a **Figura 48 (B)** podemos perceber que apenas a CLO é oxidada em +1,1 V, sendo que corrente detectada é a mesma na presença ou ausência de NAF, uma vez que a corrente proveniente da oxidação de NAF em +1,1 V é muito pequena (pode ser desconsiderada). A semelhança na corrente detectada na injeção das duas soluções (CLO e NAF+CLO) também indica que não há interação química entre CLO e FEN ou com os respectivos produtos de oxidação. Em +1,3 V, tanto NAF como CLO são oxidadas. Na injeção de uma solução contendo ambas as espécies, a corrente de oxidação em +1,3 V corresponde aproximadamente à soma das correntes individuais de oxidação da NAF e da CLO, neste pulso de potencial.

Os resultados demonstrados nas **Figuras 47 e 48** evidenciam que a corrente gerada pela oxidação da FEN e da CLO não apresentam a mesma magnitude em ambos os pulsos de potenciais (+1,1 e +1,3 V), o que impede o uso de uma subtração simples entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais ($I_{+1,3V} - I_{+1,1V}$) para ter acesso à corrente de oxidação relacionada somente com a oxidação da NAF. No entanto, este problema pode ser contornado através do uso de um fator de correção (FC), obtido pela razão entre a corrente de oxidação da FEN / CLO obtida em +1,3 V pela corrente de FEN / CLO em +1,1 V mediante a injeção de solução contendo apenas uma das espécies (DA SILVA et al., 2011; FREITAS, 2015; GIMENES et al., 2010a). Assim, quando uma solução contendo ambos os compostos (NAF + FEN ou NAF + CLO) é injetada no sistema BIA, a corrente de oxidação proveniente somente da NAF pode ser obtida pela subtração entre a corrente detectada em +1,3 V e a corrente detectada em +1,1 V multiplicada pelo FC. As equações (11) e (12) serão usadas nos cálculos para obtenção do FC e das correntes relacionadas com a oxidação da NAF, respectivamente.

$$FC = \frac{I_{FEN\ 1,3V}}{I_{FEN\ 1,1V}} \text{ ou } \frac{I_{CLO\ 1,3V}}{I_{CLO\ 1,1V}} \quad (11)$$

$$I_{NAF} = I_{1,3V} - (I_{1,1V} \times FC) \quad (12)$$

Dessa forma, com amperogramas adquiridos simultaneamente (em +1,1 V e +1,3 V) e as equações acima é possível detectar seletivamente as correntes de oxidação da FEN ou da CLO e da NAF quando presentes na mesma solução.

4.3.3 Otimização de parâmetros hidrodinâmicos do sistema BIA-AMP

Uma vez definidos os pulsos de potenciais para a realização da determinação seletiva de NAF e FEN ou NAF e CLO, o efeito dos seguintes parâmetros do sistema BIA-MPA foram estudados: velocidade de agitação da solução no interior da célula BIA, volume e velocidade de injeção. Em todos os parâmetros, foi analisada a intensidade das correntes de oxidação detectadas nos pulsos de potenciais otimizados anteriormente através da injeção de uma solução contendo 80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de FEN em meio de tampão BR 0,12 mol L^{-1} pH 10,0. A injeção de solução contendo apenas FEN possibilita a determinação do FC, e a influência dos parâmetros hidrodinâmicos nos valores obtidos.

4.3.3.1 Velocidade de Agitação

Os testes foram realizados utilizando um micromotor DC que permite a variação nas velocidades de agitação, mediante seleção de diferentes voltagens na fonte de alimentação (fonte de alimentação universal de voltagem variável). Foram realizadas injeções em triplicata de soluções contendo FEN $80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência e com diferentes velocidades de agitação da solução no interior da célula. Os resultados obtidos neste estudo são apresentados na **Figura 49**.

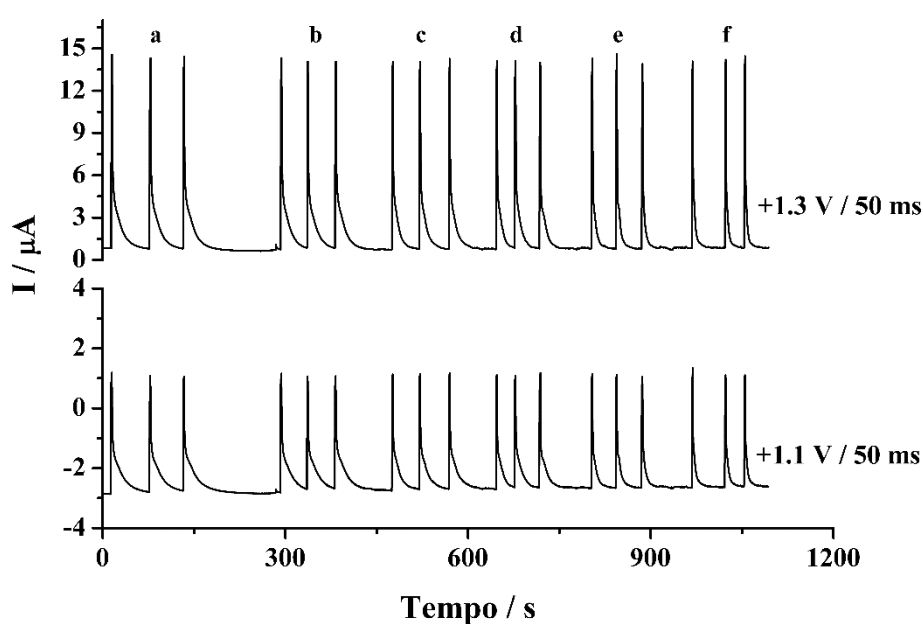


Figura 49. Comparação entre os resultados obtidos por BIA-MPA sem (a), e com aumento gradativo da velocidade de agitação da solução contida na célula BIA: 700 rpm (b), 1000 rpm (c), 1200 rpm (d), 1400 rpm (e) e 1800 rpm (f). Concentração de FEN: $80 \mu\text{mol L}^{-1}$; volume e velocidade de injeção: $100 \mu\text{L}$ e $75 \mu\text{L s}^{-1}$, respectivamente.

Nos resultados obtidos sem a agitação da solução no interior da célula BIA, o pico transiente gerado retorna lentamente à linha base, havendo assim, um alargamento da base dos picos e uma diminuição da frequência analítica. Com a solução do interior da célula em constante agitação, o pico transiente decresce com maior rapidez e consequentemente, as bases dos picos obtidos são mais estreitas, possibilitando a obtenção de maior frequência analítica. Com base nos resultados obtidos, a velocidade de agitação de 1400 rpm foi adotada nos demais estudos.

4.3.3.2 Volume e velocidade de injeção

Para que a corrente de oxidação da NAF no potencial de +1,3 V seja determinada é necessário o uso do FC, conforme descrito anteriormente. Adicionalmente, a análise somente é possível se o valor do FC for relativamente constante nas condições empregadas. Neste sentido, um estudo foi realizado para verificar a influência de parâmetros como volume injetado e velocidade de injeção no valor do FC. Na **Figura 50 (A) e (B)** são apresentadas as variações do FC em função da variação do volume e da velocidade de injeção, respectivamente.

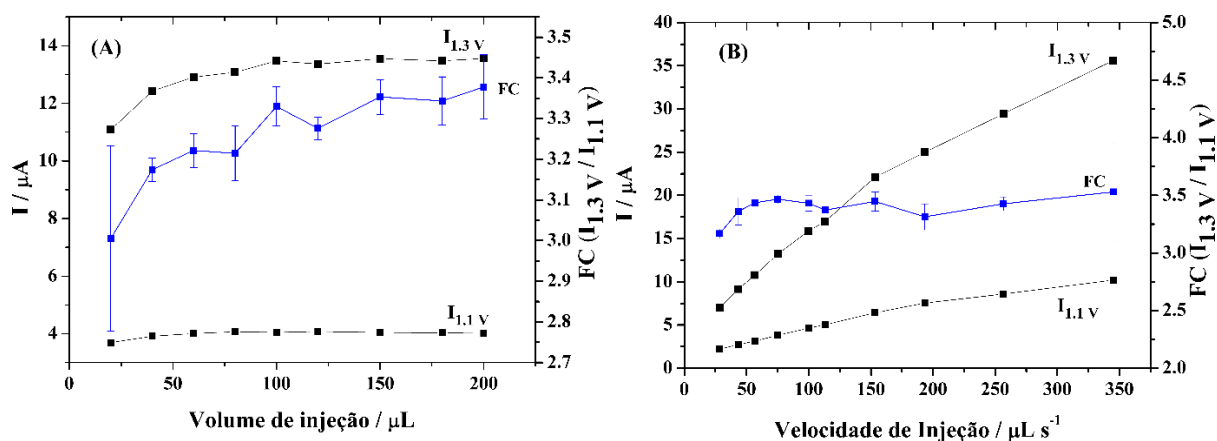


Figura 50. Variação da corrente de oxidação da FEN e do FC em função do volume injetado **(A)** e da velocidade de injeção **(B)**. Condições: Velocidade de injeção: 75 $\mu\text{L s}^{-1}$ em **(A)**; Volume injetado: 100 μL em **(B)**; Concentração de FEN: 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Na **Figura 50 (A)** podemos perceber que a corrente de oxidação da FEN no pulso de potencial de +1,1 V apresenta pequena variação em função do volume de injeção no intervalo estudado. No pulso de potencial de +1,3V observa-se pequeno aumento da corrente de oxidação até 80 μL . A partir de 100 μL e até 200 μL , as correntes de oxidação da FEN nesse pulso de potencial são praticamente constantes. O FC apresenta variações consideráveis ($\text{FC} = 3,204 \pm 0,111$) até volumes de injeção de 120 μL , ficando praticamente constante a partir de 150 μL ($\text{FC} = 3,358 \pm 0,018$). Dessa forma, o volume de injeção de 150 μL foi adotado nos estudos seguintes.

Pelos resultados exibidos na **Figura 50 (B)** é possível verificar que há um aumento nas correntes de oxidação da FEN nos pulsos de potenciais de +1,1 V e +1,3 V com o aumento da

velocidade de injeção. Isto ocorre devido ao aumento na taxa de transporte de massa por unidade de tempo para a superfície do eletrodo de trabalho. O sinal amperométrico não chegou a um valor máximo e constante, provavelmente, devido à elevada área do eletrodo de trabalho ($22,9 \text{ mm}^2$). As correntes de oxidação da FEN em $+1,1 \text{ V}$ e em $+1,3 \text{ V}$ aumentaram proporcionalmente na faixa de velocidade de $28 \mu\text{L s}^{-1}$ até $100 \mu\text{L s}^{-1}$, portanto, o FC apresenta pequena variação nesse intervalo ($\text{FC} = 3,433 \pm 0,038$).

A velocidade de injeção de $75 \mu\text{L s}^{-1}$ foi selecionada para a determinação simultânea de FEN e NAF, uma vez que a aquisição dos valores de corrente na técnica de MPA ocorre a cada 250 ms , pois os três pulsos de potenciais ($+1,1 \text{ V}/50 \text{ ms}$; $+1,3 \text{ V}/50 \text{ ms}$ e $0,60 \text{ V}/150 \text{ ms}$) são constantemente aplicados ao eletrodo de trabalho. Caso o volume de injeção seja muito pequeno, ou a velocidade de injeção seja muito grande, a aquisição dos valores de corrente pode ser comprometida (número de vezes de aquisição de corrente insuficiente), e consequentemente, a repetibilidade do método pode ser prejudicada. Desta forma, na opção pelo volume e velocidade de injeção, o número de vezes que a corrente é adquirida deve ser considerado. No presente trabalho, o volume de injeção foi aumentado ou a velocidade de injeção foi diminuída até que o número de aquisições de corrente fosse pelo de 3 vezes no ápice de cada pico transiente em cada amperograma.

Os resultados obtidos nos estudos de otimização dos parâmetros do sistema BIA-MPA para a determinação de FEN também foram aplicados à CLO, uma vez que ambas espécies apresentaram comportamento semelhante nos estudos realizados.

4.3.4 Influência da concentração da FEN e CLO no FC

No desenvolvimento de um novo método analítico, estudos para determinação da faixa de concentração onde há uma relação linear entre concentração e o sinal do detector devem ser realizados. No entanto, no presente trabalho, além da identificação da faixa linear de resposta, também há a necessidade de identificar a faixa de concentração de FEN e CLO onde o FC é constante. O FC será usado para identificar a corrente de oxidação proveniente da NAF no pulso de potencial de $+1,30 \text{ V}$ ($I_{\text{NAF}} = I_{1,3\text{V}} - (\text{FC} \times I_{1,1\text{V}})$). A **Figura 51** apresenta a faixa de concentração de FEN **(A)** e CLO **(B)** onde existe relação linear com a corrente de oxidação detectada. Além disto, os FC calculados nesta faixa de concentração também são apresentados.

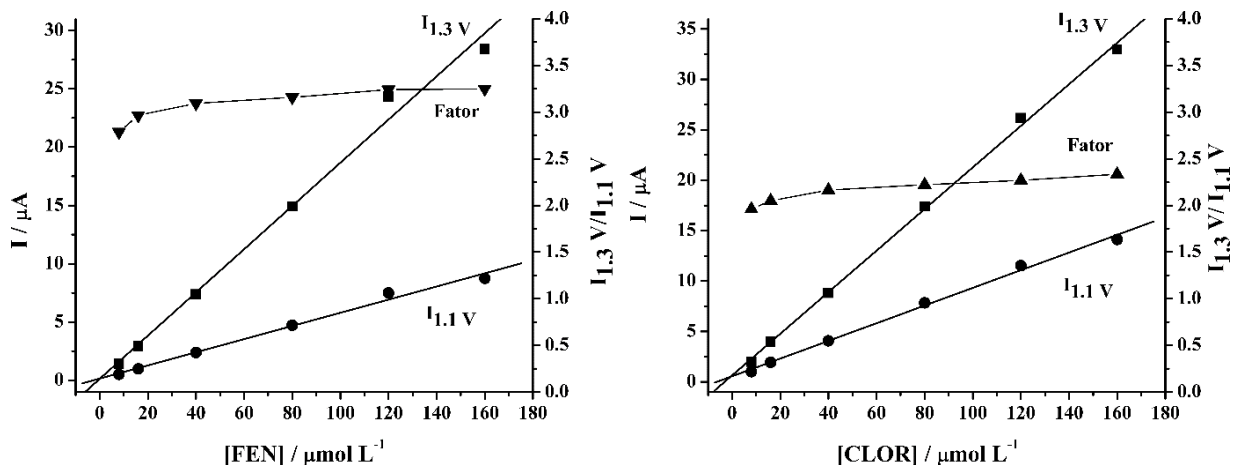


Figura 51. FC ($I_{+1,3V} / I_{+1,1V}$) calculados para injeções de soluções contendo concentrações crescentes (10,0 a 160 $\mu mol L^{-1}$ para ambos) de FEN (A) e de CLO (B). Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms; Eletrólito suporte: BR 0,1 mol L^{-1} pH 10; Vazão: 75 $\mu L s^{-1}$; Volume injetado: 150 μL .

Na faixa de concentração estudada para a FEN (**Figura 51 (A)**; 16 a 160,0 $\mu mol L^{-1}$), o FC apresentou um valor médio de $3,142 \pm 0,117$ (RSD = 3,7%), o que pode ser considerado um valor relativamente satisfatório. Desta forma, na construção de uma curva de calibração, esta faixa de concentração deve ser respeitada para evitar erros na análise proveniente de oscilações no valor do FC. Além disto, conforme também já foi constatado em trabalhos anteriores (GIMENES et al., 2010a; SILVA et al., 2011), em toda curva de calibração sempre é aconselhável que uma solução contendo apenas FEN seja injetada no sistema BIA (para a obtenção do FC). Pequenas variações na superfície do eletrodo BDD decorrentes de pequenas diferenças nos procedimentos de pré-tratamento podem afetar o valor a ser usado como FC. Os resultados apresentados na **Figura 51 (B)** evidenciam que o FC obtido para a CLO também é relativamente constante no intervalo de 16 a 160,0 $\mu mol L^{-1}$, apresentando um valor médio de $2,208 \pm 0,108$ (RSD = 4,3%).

4.3.5 Estudo de repetibilidade do método

Uma vez definidos os parâmetros do sistema BIA-MPA e a faixa de concentração na qual o fator de correção permanece relativamente constante, a estabilidade de resposta do eletrodo de BDD foi avaliada através de injeções sucessivas ($n=10$) de duas soluções contendo FEN+NAF em concentrações distintas: 16 + 2 $\mu mol L^{-1}$ (a) e 120 + 15 $\mu mol L^{-1}$ (b),

respectivamente. Os amperogramas obtidos neste estudo com a aplicação de três pulsos de potenciais (+1,1 V/50 ms; +1,3 V / 50 ms e +0,8 V/250 ms) são apresentados na **Figura 52**.

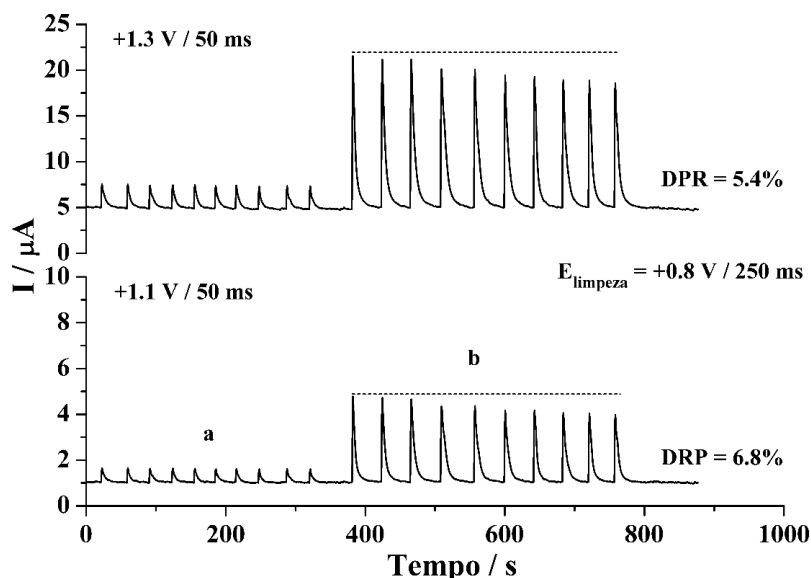


Figura 52. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de solução contendo $16 + 2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) e $120 + 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b) de FEN e NAF, respectivamente ($n=10$). Eletrólito suporte: BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10; Vazão: $75 \mu\text{L s}^{-1}$; Volume injetado: $150 \mu\text{L}$.

Conforme podemos observar na **Figura 52**, após 3 injeções da solução contendo $120 + 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FEN+NAF, ocorre uma diminuição da corrente de oxidação tanto no potencial +1,1 V (oxidação de FEN) quanto no potencial de +1,3 V (oxidação de FEN e NAF) e um alto desvio padrão relativo foi calculado para FEN (6,8%; $n=10$) e NAF empregando o FC (3,8%; $n=10$). Provavelmente, isto ocorreu devido à adsorção de NAF e/ou FEN ou de produtos de oxidação na superfície do eletrodo, ocasionando a contaminação do mesmo (variação de sua área). A fim de contornar esse problema, estudos foram realizados para a seleção de um potencial de limpeza adequado, o qual garantisse repetibilidade das medidas. A

Tabela 5 apresenta os resultados obtidos no estudo de repetibilidade para injeções sucessivas de soluções contendo $16 + 2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ou $120 + 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ FEN + NAF, respectivamente, em função da aplicação de diferentes pulsos de potenciais de limpeza.

Tabela 5. Comparação dos RSD obtidos em diferentes potenciais de limpeza.

Potencial de Limpeza	Tempo	RSD _{IFEN}	RSD _{INAF}
+0,8 V	250 ms	6,8%	3,8%
+1,6 V	250 ms	15,8%	12,4%
+1,9 V	250 ms	3,9%	2,1%

Com base nos valores de desvios padrões relativos calculados mediante aplicação dos pulsos de potenciais selecionados, podemos observar que a aplicação de +1,9 V, durante 250 ms, favorece a repetibilidade nos valores de corrente de oxidação detectados nos dois pulsos de potenciais (+1,1 V e +1,3V). Em função dos resultados obtidos, a sequência dos pulsos de potenciais aplicados passou a ser a seguinte:

- (1) +1,1 V/50 ms: oxidação e quantificação de FEN;
- (2) +1,3 V/50 ms: para oxidação simultânea de FEN e NAF;
- (3) +1,9 V/250 ms: para constante limpeza da superfície do BDD.

Uma vez selecionado o pulso de potencial para a limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de BDD, o teste de repetibilidade foi repetido para soluções contendo FEN + NAF e NAF + CLO. Os amperogramas obtidos, assim como o novo esquema de aplicação de pulsos são exibidos nas **Figuras 53 e 54**, respectivamente.

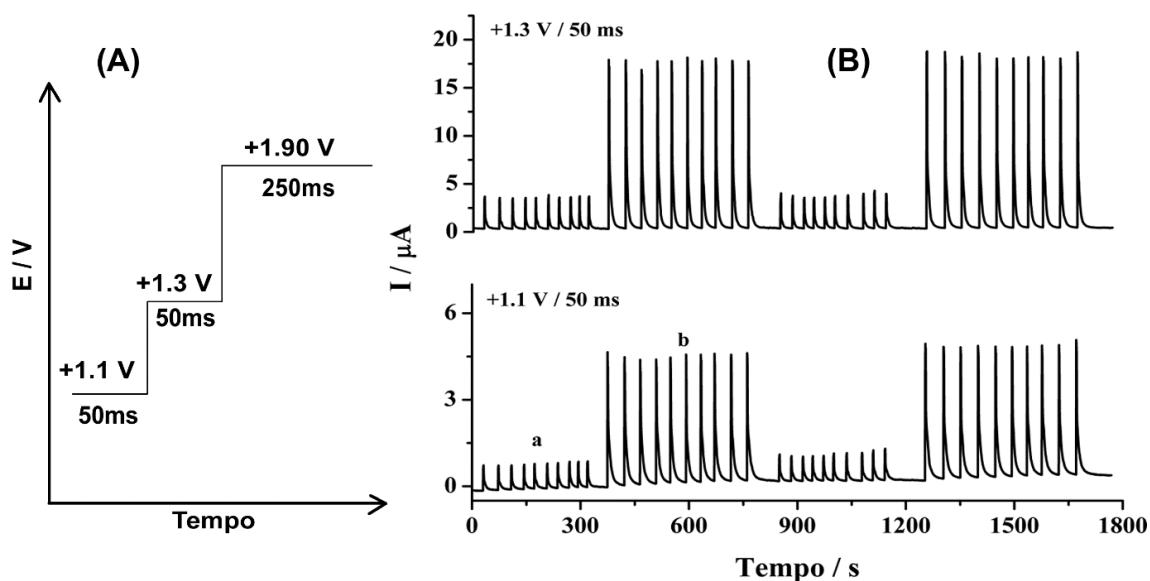


Figura 53. (A) Escada de potencial aplicada ao eletrodo BDD em função do tempo. (B) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo $16 + 2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) e $120 + 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b) de FEN e NAF, respectivamente ($n = 20$). O amperograma para o pulso de potencial $+1,9 \text{ V} / 250\text{ms}$ não foi registrado. Demais condições: idem **Figura 52**.

Com base nos amperogramas da **Figura 53**, podemos observar que a aplicação do pulso de potencial de $+1,9 \text{ V}$ garante boa repetibilidade nos valores de corrente registradas nos pulsos de potenciais de $+1,1 \text{ V}$ e $+1,3 \text{ V}$ na determinação simultânea de FEN e NAF. Os desvios padrão relativos foram calculados em 1,7% (a) e 0,7% (b) para a FEN e 4,0% (a) e 1,5% (b) para a NAF ($n = 20$).

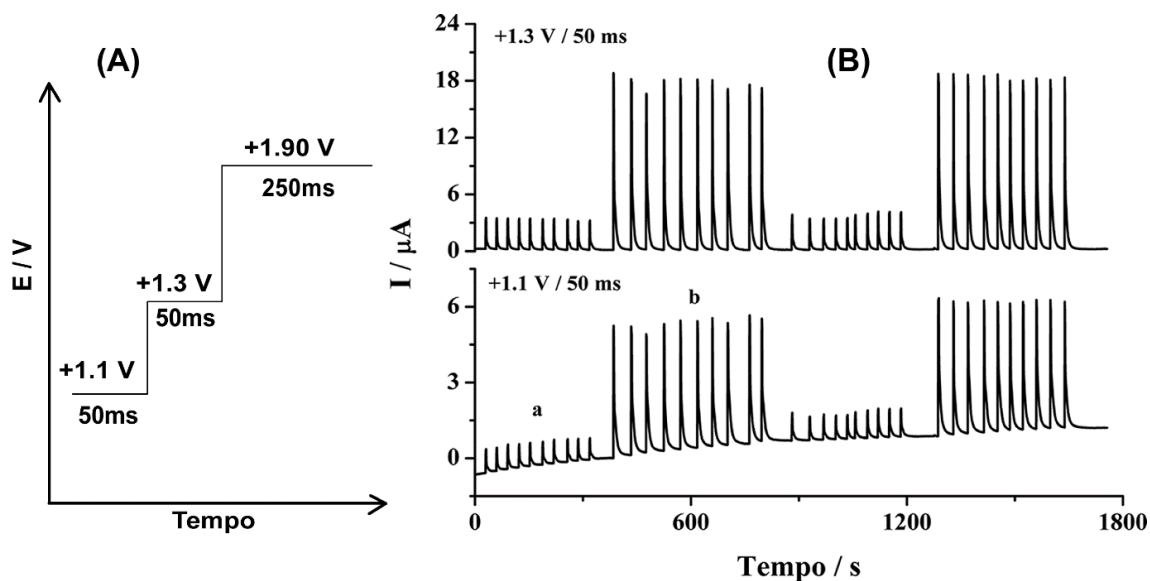


Figura 54. (A) Escada de potencial aplicada ao eletrodo BDD em função do tempo. (B) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo 16 + 2 μ mol L⁻¹ (a) e 120 + 15 μ mol L⁻¹ (b) de CLO e NAF, respectivamente (n = 20). O amperograma para o pulso de +1,9 V / 250 ms não foi registrado. Demais condições: idem **Figura 52**.

Com base nos amperogramas da **Figura 54**, podemos observar que a aplicação do pulso de potencial de +1,9 V também garante boa repetibilidade nos valores de corrente registradas nos pulsos de potenciais de +1,1 V e +1,3 V na determinação simultânea de CLO e NAF. Os desvios padrão relativos foram calculados em 2,1% (a) e 0,7% (b) para CLO e em 3,6% (a) e 3,3% (b) para NAF (n = 20).

4.3.6 Aplicação do sistema BIA-MPA na análise simultânea de NAF e FEN ou NAF e CLO em formulações farmacêuticas

O desempenho do método proposto foi avaliado na quantificação de FEN e NAF ou CLO e NAF em formulações farmacêuticas comerciais com esta composição (colírios). As curvas de calibração para os pares de compostos foram obtidas levando-se em consideração a faixa de concentração onde o fator de correção (FC) é relativamente constante (16 a 120 μ mol L⁻¹) para FEN e CLO, e a proporção molar de concentração para as amostras (8:1 para FEN ou CLO:NAF, respectivamente). A **Figura 55** apresenta os amperogramas obtidos em +1,1 V e +1,3 V para injeções em triplicata de soluções em ordem crescente (a - f) e decrescente (f' - a') de concentração de FEN+NAF. Duas amostras de formulações farmacêuticas previamente

diluídas no eletrólito suporte (g e h) e uma solução contendo somente FEN (cálculo do FC) também foram injetadas. As respectivas curvas de calibração também são apresentadas.

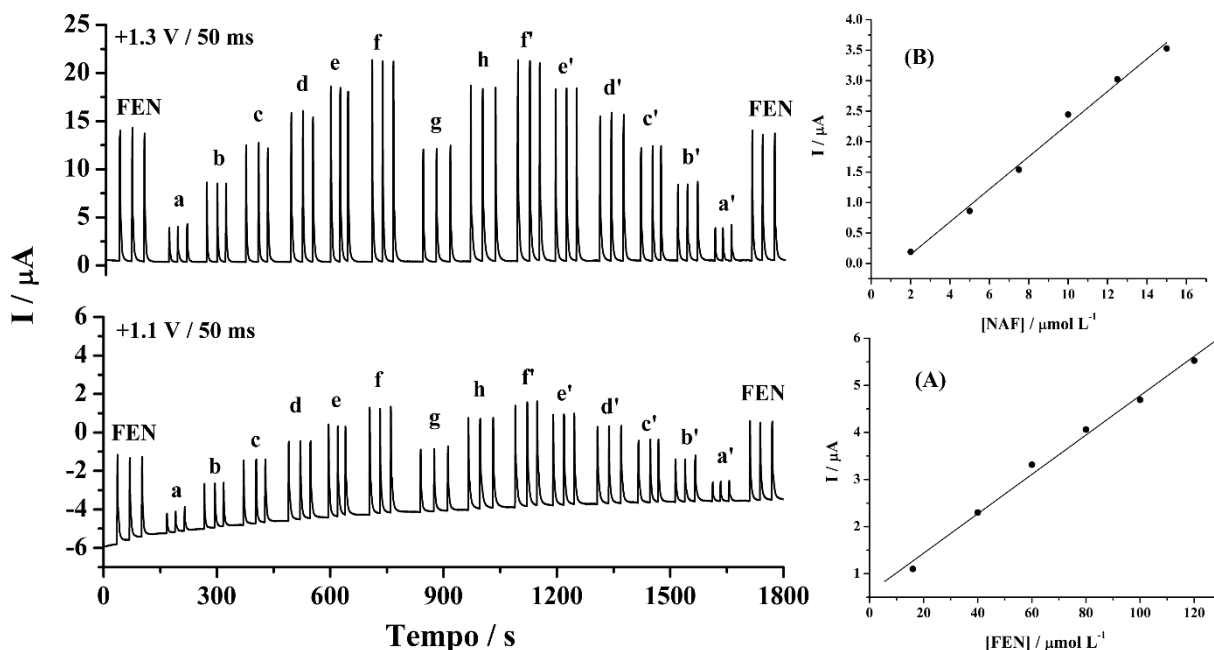


Figura 55. Amperogramas obtidos para injeções de uma solução contendo somente FEN ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$), seis soluções (a-f; f'-a') contendo simultaneamente FEN ($16 - 120 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF ($2 - 15 \mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras adequadamente diluídas (g e h). (A e B), respectivas curvas de calibração obtidas para FEN ($r = 0,996$) e NAF ($r = 0,997$). Demais condições: idem **Figura 52**.

As curvas de calibração foram obtidas para as concentrações injetadas em ordem crescente e decrescente no sistema BIA-MPA. As equações de reta e respectivos coeficientes de correlação para as injeções em concentração crescente foram as seguintes:

$$y = 0,0418[FEN] + 0,600 \quad (r = 0,996)$$

$$y = 0,267[NAF] - 0,386 \quad (r = 0,997)$$

As equações de reta e respectivos coeficientes de correlação para as injeções em concentração decrescente foram as seguintes:

$$y = 0,0415[FEN] + 0,563 \quad (r = 0,995)$$

$$y = 0,266 [NAF] - 0,421 \quad (r = 0,996)$$

Pode ser observado que as soluções padrões injetadas em ordem crescente ou decrescente de concentração apresentaram respostas semelhantes, o que confirma que o fenômeno da contaminação do eletrodo ou efeito de memória está ausente, mesmo usando um eletrodo de trabalho sem modificação química ou eletroquímica.

De forma semelhante, curvas de calibração analítica também foram construídas para CLO e NAF. A **Figura 56** apresenta os amperogramas obtidos em +1,1 V e +1,3 V para injeções em triplicata de soluções em ordem crescente (a-f) e decrescente (f'-a') de concentração. Duas amostras de formulações farmacêuticas previamente diluídas no eletrólito suporte (g e h) e uma solução contendo somente CLO (para o cálculo do FC) também foram injetadas. As respectivas curvas de calibração também são apresentadas

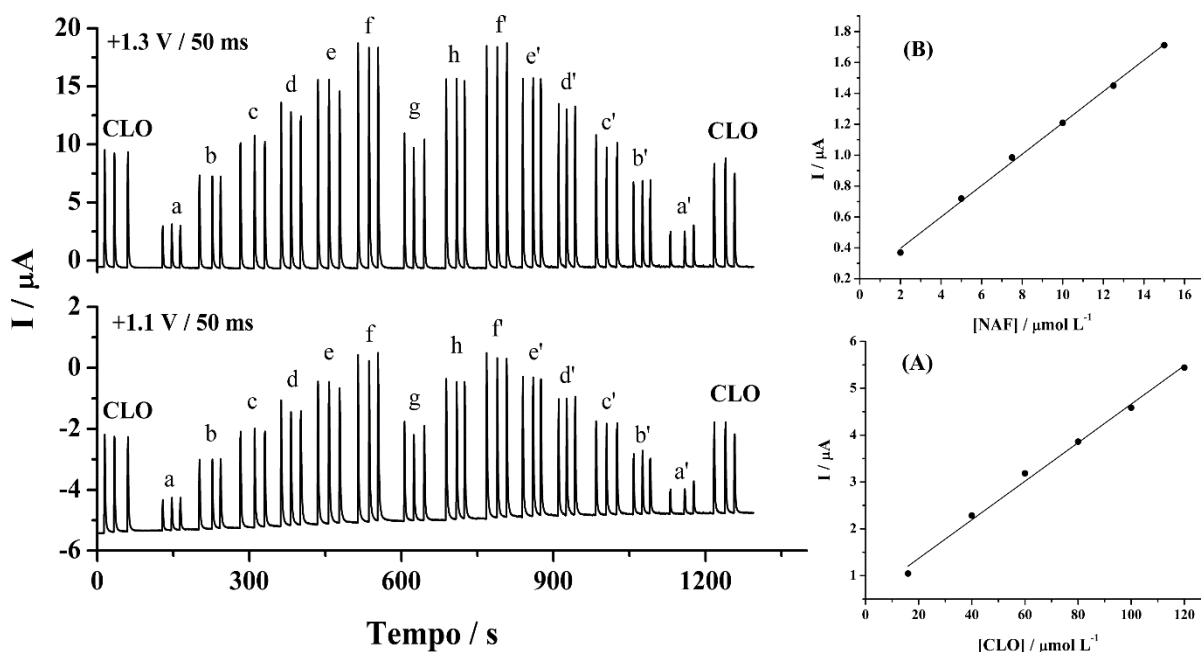


Figura 56. Amperogramas obtidos para injeções de uma solução contendo somente CLO ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$), seis soluções (a-f; f'-a') contendo simultaneamente CLO ($16 - 120 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF ($2 - 15 \mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras adequadamente diluídas (g e h). (A e B), respectivas curvas de calibração obtidas para CLO ($r = 0,996$) e NAF ($r = 0,997$). Demais condições: idem **Figura 52**.

As curvas de calibração foram obtidas para as concentrações injetadas em ordem crescente e decrescente no sistema BIA-MPA. As equações de reta e respectivos coeficientes de correlação para as injeções em concentração crescente foram as seguintes:

$$y = 0,0412[CLO] + 0,547 \quad (r = 0,996)$$

$$y = 0,102[NAF] - 0,194 \quad (r = 0,997)$$

As equações de reta e respectivos coeficientes de correlação para as injeções em concentração decrescente foram as seguintes:

$$y = 0,0430[CLO] + 0,292 \quad (r = 0,996)$$

$$y = 0,108 [NAF] - 0,299 \quad (r = 0,995)$$

Como pode ser observado, as soluções padrões injetadas em ordem crescente ou decrescente de concentração para o par CLO + NAF também apresentaram respostas semelhantes, o que confirma que o fenômeno da contaminação do eletrodo ou efeito de memória está ausente, mesmo usando um eletrodo de trabalho sem modificação.

As características analíticas para os métodos propostos de determinação simultânea de FEN + NAF e de CLO + NAF encontram-se listadas nas **Tabelas 6 e 7**, respectivamente.

Tabela 6. Características analíticas do método proposto para determinação de FEN + NAF.

Característica	FEN	NAF
r	0,996	0,997
Inclinação ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}$)	$0,0418 \pm 0,002$	$0,267 \pm 0,011$
Intercepto (μA)	$0,600 \pm 0,146$	$-0,386 \pm 0,105$
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,361	0,06
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,20	0,188
Frequência Analítica	110	110
Repetibilidade Intra-dia	1,7%	3,95%

Tabela 7. Características analíticas do método proposto para determinação de CLO + NAF.

Característica	CLO	NAF
r	0,996	0,997
Inclinação ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}$)	$0,0412 \pm 0,0154$	$0,102 \pm 0,002$
Intercepto (μA)	$0,547 \pm 0,119$	$-0,194 \pm 0,021$
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,367	0,148
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,22	0,495
Frequência Analítica	110	110
Repetibilidade Intra-dia	2,1%	3,6%

Os métodos BIA-MPA propostos foram usados para determinar FEN + NAF e CLO + NAF em duas amostras de produtos farmacêuticos. Os resultados obtidos encontram-se listados nas **Tabela 8 e 9**, respectivamente.

Tabela 8. Resultados (média $\pm$ DP; n = 3) obtidos para a determinação de FEN e NAF em amostras farmacêuticas usando o método proposto.

Amostras	Valor da Bula (mg/mL)		Valores Encontrados (mg/mL)			
	FEN	NAF	BIA		HPLC	
			FEN	NAF	FEN	NAF
Amostra 1	3,0	0,25	$2,95 \pm 0,04$	$0,245 \pm 0,025$	$2,96 \pm 0,01$	$0,241 \pm 0,005$
Amostra 2	3,0	0,25	$3,20 \pm 0,01$	$0,256 \pm 0,005$	$3,00 \pm 0,08$	$0,245 \pm 0,002$

Tabela 9. Resultados (média $\pm$ DP; n = 3) obtidos para a determinação de CLO e NAF em amostras farmacêuticas usando o método proposto.

Amostras	Valor da Bula (mg/mL)		Valores Encontrados (mg/mL)			
	CLO	NAF	BIA		HPLC	
			CLO	NAF	CLO	NAF
Amostra 1	3,0	0,25	$3,05 \pm 0,24$	$0,257 \pm 0,014$	$3,03 \pm 0,02$	$0,244 \pm 0,002$
Amostra 2	3,0	0,25	$2,94 \pm 0,04$	$0,247 \pm 0,018$	$2,98 \pm 0,02$	$0,245 \pm 0,001$

De acordo com os resultados apresentados nas **Tabela 4 e 9**, podemos afirmar que os resultados obtidos com o método proposto (BIA-MPA) e os métodos de referência (HPLC) são similares, o que comprova a exatidão do método proposto. A um nível de confiança de 95%, os

valores do teste t calculados foram menores do que o valor crítico teórico (2,78, $n = 3$), o que indica que estatisticamente não houve diferenças significativas entre os resultados encontrados com ambos os métodos.

5 Conclusões

No presente trabalho foi demonstrada a potencialidade da detecção por voltametria de onda quadrada com redissolução anódica acoplada à técnica BIA (BIA-SWV) no desenvolvimento de um novo método para determinação simultânea de Zn e NAF. Adicionalmente, a detecção por amperometria de múltiplos pulsos acoplada à técnica BIA (BIA-MPA) foi empregada no desenvolvimento de dois novos métodos de análise: (i) determinação simultânea de NAF e FEN e (ii) determinação simultânea de NAF e CLO.

Os métodos propostos são facilmente implementáveis, rápidos, apresentam baixo custo operacional, geram uma pequena quantidade de resíduo aquoso e requerem de etapas simples de preparação da amostra (somente diluição). Os métodos apresentaram ainda sensibilidade, seletividade e estabilidade adequada para quantificação simultânea destes compostos em formulações farmacêuticas usando um eletrodo de trabalho (BDD) sem qualquer modificação química ou eletroquímica, o que torna os métodos mais atraentes para aplicações em análises de rotina.

Os resultados obtidos com o método proposto para determinação simultânea de Zn e NAF foram estatisticamente similares aos obtidos com a técnica de HPLC (NAF) e FAAS (Zn). Ademais, o sistema BIA-SWV permite análises mais rápidas (70 injeções h^{-1}), apresenta menor custo e consome menor quantidade de reagentes ou solventes com baixa toxicidade.

Com relação aos métodos propostos para determinação simultânea de NAF e FEN e NAF e CLO, os resultados obtidos foram estatisticamente semelhantes aos obtidos com a técnica de HPLC. Entretanto, o sistema BIA-AMP possibilita análises mais rápidas (110 injeções h^{-1}).

Devido às características portáteis do sistema BIA, os métodos propostos também têm potencialidade para serem usados em laboratórios com infraestrutura limitada e para a realização de análises *in situ*.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, v. 02/06/2003, n. Brasília, DF, [s.d.].

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, (ANVISA). Anvisa alerta para a contraindicação do uso de nafazolina em crianças. **Alerta SNVS/Anvisa/Nuvig/Gfarm nº 04, de 16 de julho de 2013**, 2013.

ALI, N. W. et al. Simultaneous determination of naphazoline hydrochloride, chlorpheniramine maleate and methylene blue in their ternary mixture. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 3, p. 641–648, 2013.

BABAEI, A.; GARRETT, D. J.; DOWNARD, A. J. Selective simultaneous determination of paracetamol and uric acid using a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotube/chitosan composite. **Electroanalysis**, v. 23, n. 2, p. 417–423, 2011.

BALBANI, A. P. S. et al. Rinites e anti-histamínicos: impacto na cognição e psicomotricidade. **Rev Bras Alerg Immunopatol**, v. 24, n. 3, p. 106–114, 2001.

BALDAN, M. R. et al. Cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond with different sp² content: Morphological, structural, and impedance spectroscopy characterizations. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 74, n. 12, p. 1830–1835, 2013.

BARD, A. J. et al. **Encyclopedia of Electrochemistry, Volume 3, Instrumentation and Electroanalytical Chemistry**. [s.l.] Wiley New York, 2003.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: Wiley New York, 2001.

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

BEZERRA DA SILVA, R. A. et al. Development of a Simple and Fast Electrochemical Method to Evaluate Physical Stress in Athletes. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2601–2606, 2011.

BIELORY, L.; FRIEDLAENDER, M. H. Allergic Conjunctivitis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 28, n. 1, p. 43–58, 2008.

BRETT, A. M. C. F. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. [s.l.] Almedina Coimbra, 1996. v. 1

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric batch injection analysis: Theoretical aspects of current transients and comparison with wall-jet electrodes in continuous flow. **Electroanalysis**, v. 7, n. 3, p. 225–229, mar. 1995.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; TUGULEA, L. Anodic stripping voltammetry of trace metals by batch injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 322, n. 3, p. 151–157, abr. 1996.

BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA BRETT, A. M.; MITOSERIU, L. C. Amperometric and Voltammetric Detection in Batch Injection Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 19, p. 3145–3150, out. 1994.

BUCARETCHI, F.; DRAGOSAVAC, S.; VIEIRA, R. J. Acute exposure to imidazoline derivatives in children. **Jornal de pediatria**, v. 79, n. 6, p. 519–524, 2003.

CASADO-TERRONES, S. et al. A fluorescence optosensor for analyzing naphazoline in pharmaceutical preparations: Comparison with other sensors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 4, p. 785–789, 2005.

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

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

CHEN, L. C.; CHANG, C. C.; CHANG, H. C. Electrochemical oxidation of histidine at an anodic oxidized boron-doped diamond electrode in neutral solution. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 6, p. 2883–2889, 2008.

CHINIFOROSHAN, H.; TABRIZI, L.; POURRAHIM, N. A new Ag-nanoparticle with 4-nitro phenylcyanamide ligand: synthesis characterization and application to the detection of dibucaine, naphazoline, dopamine, and acetaminophen. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 45, n. 2, p. 197–207, 2014.

CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Square wave voltammetry on boron-doped diamond electrodes for analytical determinations. **Diamond and Related Materials**, v. 11, n. 9, p. 1670–1675, set. 2002.

CRIADO, P. R. et al. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 195–210, abr. 2010.

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

DA SILVA, R. A. B. **Caracterizações e aplicações analíticas de eletrodos compósitos modificados com Azul da Prússia e determinações simultâneas em sistemas de análise por injeção em batelada empregando somente um eletrodo de trabalho**. 2012. 142 p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

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

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

DEROCO, P. B. et al. Square-wave voltammetric determination of hydroxychloroquine in pharmaceutical and synthetic urine samples using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 719, p. 19–23, abr. 2014.

DEWANI, A. P. et al. RP-HPLC-DAD method for the determination of phenylephrine, paracetamol, caffeine and chlorpheniramine in bulk and marketed formulation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 811–816, 2012.

DIAMOND, D. et al. Multicomponent batch-injection analysis using an array of ion-selective electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 281, n. 3, p. 629–635, 1993.

DÍAZ, B. C. et al. Comparison of three different phosphorescent methodologies in solution for the analysis of naphazoline in pharmaceutical preparations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, n. 1, p. 30–34, 1 maio 2004.

DORNELLAS, R. M. et al. Electrochemical Oxidation of the Fungicide Dimoxystrobin and Its Amperometric Determination by Batch-Injection Analysis. **Analytical Letters**, v. 47, n. 3, p. 492–503, 2014.

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

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

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

DOUGHTY, M. J. A guide to ophthalmic pharmacy medicines in the United Kingdom. **Ophthalmic & physiological optics : the journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)**, v. 17 Suppl 1, p. S2–S8, 1997.

EL GOHARY, N. A.; EL NASHAR, R. M.; ABOUL-ENIEN, H. Y. Potentiometric Determination of Sibutramine Using Batch and Flow Injection Analysis. **Analytical Letters**, v. 44, n. 1-3, p. 241–257, 2011.

EL-DIEN, F. A N. et al. Modified screen printed and carbon paste ion selective electrodes for potentiometric determination of naphazoline hydrochloride in pure and pharmaceutical preparations. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 10, p. 10266–10281, 2012.

ELKADY, E. F. Simultaneous spectrophotometric determination of diclofenac potassium and methocarbamol in binary mixture using chemometric techniques and artificial neural networks. **Drug testing and analysis**, v. 3, n. 4, p. 228–233, 2011.

FIGURA, P.; MCDUFFIE, B. Determination of labilities of soluble trace metal species in aqueous environmental samples by anodic stripping voltammetry and chelex column and batch methods. **Analytical chemistry**, v. 52, n. 9, p. 1433–1439, 1980.

FOGG, A. G.; WANG, J. Terminology and Convention for Electrochemical Stripping Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 891–897, 30 jan. 1999.

FREITAS, J. M. **Determinação estequiométrica de dimenidrinato e simultânea de 8-cloroteofilina , difenidramina e piridoxina usando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos**. 2015. 110 p. Dissertação. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

FREITAS, J. M. et al. Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Talanta**, jun. 2015.

GHOREISHI, S. M.; BEHPOUR, M.; NABI, M. A novel naphazoline-selective membrane sensor and its pharmaceutical applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 113, n. 2, p. 963–969, fev. 2006.

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

GIMENES, D. T. et al. Internal standard in flow injection analysis with amperometric detection. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 2, p. 216–218, 2010a.

GIMENES, D. T. et al. Flow-Injection Amperometric Method for Indirect Determination of Dopamine in the Presence of a Large Excess of Ascorbic Acid. **Electroanalysis**, v. 22, n. 1, p. 74–78, 2010b.

GIMENES, D. T. et al. Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac. **Talanta**, v. 116, p. 1026–1032, 2013.

GIMENES, D. T. et al. Determination of propranolol and hydrochlorothiazide by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytical Methods**, v. 6, n. 10, p. 3261–3267, 2014.

GIRARD, H. et al. Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes. **Diamond and Related Materials**, v. 16, n. 2, p. 316–325, 2007.

GOICOECHEA, H. C.; OLIVIERI, A. C. Chemometric assisted simultaneous spectrophotometric determination of four-component nasal solutions with a reduced number of calibration samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 453, n. 2, p. 289–300, fev. 2002.

GRANGER, M. C.; SWAIN, G. M. The influence of surface interactions on the reversibility of Ferri/Ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 146, n. 12, p. 4551–4558, 1999.

GUTIERREZ, A. et al. Amperometric Detection and Quantification of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) Using Dendrimer Modified Electrodes. **Electroanalysis**, v. 20, n. 21, p. 2294–2300, 2008.

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

HERBERTS, R. A. et al. Uso indiscriminado de descongestionantes nasais contendo nafazolina. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 19, n. 2, p. 103–108, 2006.

HONÓRIO, G. G. et al. Use of boron-doped diamond electrode pre-treated cathodically for the determination of trace metals in honey by differential pulse voltammetry. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 42–48, 2014.

HUANG, T. et al. A validated stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of pheniramine maleate and naphazoline hydrochloride in pharmaceutical formulations. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 7, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, N. E. Q. I. (INMETRO). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008. 2003.

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

KAPALKA, A.; FÓTI, G.; COMNINELLIS, C. Investigations of electrochemical oxygen transfer reaction on boron-doped diamond electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 4, p. 1954–1961, 2007.

KARUWAN, C. et al. Pulsed amperometry for anti-fouling of boron-doped diamond in electroanalysis of β -agonists: application to flow injection for pharmaceutical analysis. **Sensors**, v. 6, n. 12, p. 1837–1850, 2006.

KHOSHAYAND, M. R. et al. Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by chemometric methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 70, n. 3, p. 491–499, 2008.

KHOSHAYAND, M. R. et al. Simultaneous spectrophotometric determination of chlordiazepoxide and clidinium using multivariate calibration techniques. **Drug testing and analysis**, v. 2, n. 9, p. 430–435, 2010.

KOMORSKY-LOVRIĆ, Š. Kinetics of the Cinnoline Surface Redox Reaction. **Electroanalysis**, v. 14, n. 13, p. 888, jul. 2002.

KRAFT, A. Doped diamond: A compact review on a new, versatile electrode material. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, n. 5, p. 355–385, 2007.

LAMANI, S. D. et al. Voltammetric Determination of Chlorpheniramine Maleate Based on the Enhancement Effect of Sodium-dodecyl Sulfate at Carbon Paste Electrode. **Electroanalysis**, v. 23, n. 2, p. 347–354, 2011.

LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 101, n. 1, p. 19–28, jul. 1979.

LAWRENCE, N. S. et al. Electroanalytical applications of boron-doped diamond microelectrode arrays. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 829–834, 2006.

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

LOURENÇÃO, B. C. et al. Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Caffeine in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 15, p. 1717–1723, 2010.

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

LUTKA, A.; BUKOWSKA, H. Voltammetric determination of zinc in compound pharmaceutical preparations--validation of method. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 66, n. 5, p. 471–475, 2009.

MANOURI, O. C. et al. Three approaches to the analysis of zinc(II) in pharmaceutical formulations by means of different spectrometric methods. **Farmaco**, v. 53, n. 8-9, p. 563–569, 1998.

MARCHESINI, A. F. et al. Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 1, p. 39–46, 2003.

MARTENS, J. Determination of loratadine and pheniramine from human serum by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 673, n. 2, p. 183–188, nov. 1995.

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

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

MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. **Food chemistry**, v. 123, n. 3, p. 886–891, 2010.

MIKUŠ, P.; VALÁŠKOVÁ, I.; HAVRÁNEK, E. Enantioselective determination of pheniramine in pharmaceuticals by capillary electrophoresis with charged cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 3, p. 442–448, 2005.

MIRANDA, J. A. T. DE et al. Quim. Nova, v. 35, n. 7, p. 1459–1463, 2012.

MIRCESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIC, S.; LOVRIC, M. **Square-Wave Voltammetry**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007.

MOODY, R. R.; TAYLOR, R. B. Determination of zinc in pharmaceutical preparations by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, n. 11, p. 848–852, 1 nov. 1972.

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

O'DEA, J. J.; OSTERYOUNG, J.; OSTERYOUNG, R. A. Theory of square wave voltammetry for kinetic systems. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 695–701, abr. 1981.

O'DEA, J. J.; RIBES, A.; OSTERYOUNG, J. G. Square-wave voltammetry applied to the totally irreversible reduction of adsorbate. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 345, n. 1-2, p. 287–301, 1993.

OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Boron doped diamond electrode pre-treatments effect on the electrochemical oxidation of dsDNA, DNA bases, nucleotides, homopolynucleotides and biomarker 8-oxoguanine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 648, n. 1, p. 60–66, set. 2010.

ONUR, F. Simultaneous determination of pseudoephedrine sulfate, dexbrompheniramine maleate and loratadine in pharmaceutical preparations using derivative spectrophotometry and ratio spectra derivative spectrophotometry. **Talanta**, v. 51, n. 2, p. 269–279, 7 fev. 2000.

PACHECO, L. C. M. **Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras de alimentos e de águas naturais**. 2010. 172 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Depto. de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Fortaleza, 2010.

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

PALABIYIK, İ. M.; ONUR, F. The Simultaneous Determination of Phenylephrine Hydrochloride, Paracetamol, Chlorpheniramine Maleate and Dextromethorphan Hydrobromide in Pharmaceutical Preparations. **Chromatographia**, v. 66, n. S1, p. 93–96, set. 2007.

PASTORINO, A. C. Revisão sobre a eficácia e segurança dos anti-histamínicos de primeira e segunda geração. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol**, v. 33, p. 88–92, 2010.

PEDROSA, V. A.; LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. FIA Determination of Paracetamol in Pharmaceutical Drugs by Using Gold Electrodes Modified with a 3-Mercaptopropionic Acid Monolayer. **Electroanalysis**, v. 18, n. 9, p. 931–934, 2006.

PEDROSO, R. C. R. et al. Desenvolvimento de métodos de análise por clae-uv para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica como sistemas de pré-concentração. **Quim. Nova**, v. 34, n. 2, p. 206–212, 2011.

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

PEREIRA, P. F. et al. Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol. **Talanta**, v. 90, n. 0, p. 99–102, fev. 2012.

PEREIRA, P. F. et al. Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 39, p. 41–46, 2013.

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

PHATTHIYAPHAIBUN, K. et al. Chiral separation of pheniramine by capillary electrophoresis partial-filling technique using hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 803–808, ago. 2010.

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

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

PLESKOV, Y. V. et al. Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 228, n. 1-2, p. 19–27, ago. 1987.

QUINTINO, M. DO S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas**. 2003. 117 p. Tese. (Doutorado em Química) Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

RAMSING, A. U.; RŮŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. The principles and theory of high-speed titrations by flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 129, n. 0, p. 1–17, ago. 1981.

RAO, T. N.; FUJISHIMA, A. Recent advances in electrochemistry of diamond. **Diamond and Related Materials**, v. 9, n. 3, p. 384–389, 2000.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771–780, 2004.

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

RISO, R. D.; LE CORRE, P.; CHAUMERY, C. J. Rapid and simultaneous analysis of trace metals (Cu, Pb and Cd) in seawater by potentiometric stripping analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 351, n. 1, p. 83–89, 1997.

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

SÁNCHEZ-MORENO, R. A. et al. Potentiometric Screen-Printed Bisensor for Simultaneous Determination of Chromium (III) and Chromium (VI). **Electroanalysis**, v. 23, n. 1, p. 287–294, 2011.

SARTORI, E. R.; MEDEIROS, R. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. v. 123, n. 1998, p. 3195, 2007.

SÀSÁ, S. I.; AL-MOMANI, I. F.; JALAL, I. M. Determination of Naphazoline Nitrate and Antazoline Sulphate in Pharmaceutical Combinations by Reversed-Phase HPLC. **Analytical Letters**, v. 23, n. 6, p. 953–971, 1 jun. 1990.

SAYED, N. E. D. et al. Spectrophotometric, chemometric and chromatographic determination of naphazoline hydrochloride and chlorpheniramine maleate in the presence of naphazoline hydrochloride alkaline degradation product. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 51, n. 1, p. 57–68, 2013.

SCHIAVON, G. et al. Pulsed amperometric detection of ethanol in breath by gold electrodes supported on ion exchange membranes (solid polymer electrolytes). **Electroanalysis**, v. 8, n. 6, p. 544–548, 1996.

SCHMID, K. L.; SCHMID, L. M. Ocular allergy: causes and therapeutic options. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 83, n. 5, p. 257–270, set. 2000.

SCHOLZ, F. **Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications**. 2. ed. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2009.

SHIMAZAKI, J.; SAKATA, M.; TSUBOTA, K. Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction. **Archives of Ophthalmology**, v. 113, n. 10, p. 1266–1270, 1 out. 1995.

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

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

SIMONS, F. E. R. Comparative pharmacology of H1 antihistamines: clinical relevance. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 38–46, dez. 2002.

SIMONS, F. E. R. H1-antihistamines: More relevant than ever in the treatment of allergic disorders. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 4, p. S42–S52, out. 2003.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Principios de análisis instrumental. **Mc Graw-Hill/Interamericana de España, Madrid**, 2001.

SOUZA, D. DE et al. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 790–797, out. 2004.

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

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

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

SWAIN, G. M. **Handbook of Electrochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2007.

TERASHIMA, C. et al. Direct Electrochemical Oxidation of Disulfides at Anodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 7, p. 1564–1572, 25 abr. 2003.

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

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

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

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

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

UHLIG, A. et al. Chip-array electrodes for simultaneous stripping analysis of trace metals. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 25, n. 1, p. 899–903, 1995.

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**, v. 52, n. 1, p. 109–117, 2007.

WANG, J. Injection analysis—from flow-injection analysis to batch-injection analysis. **Microchemical journal**, v. 45, n. 2, p. 219–224, 1992.

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

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2006.

WANG, J.; CHEN, L. Small-volume batch-injection analyser. **Analyst**, v. 119, n. 6, p. 1345–1348, 1994.

WANG, J.; LU, J.; CHEN, L. Batch injection stripping voltammetry of trace metals. **Analytica Chimica Acta**, v. 259, n. 1, p. 123–128, 1992.

WANG, J.; RAYSON, G. D.; TAHA, Z. BATCH INJECTION-ANALYSIS USING FIBEROPTIC FLUOROMETRIC DETECTION. **Applied Spectroscopy**, v. 46, n. 1, p. 107–110, 1992.

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

WAROWNA-GRZEŚKIEWICZ, M.; FIJAŁEK, Z. Polarographic determination of zinc in eye drops and validation of the method. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 55, n. 4, p. 263–266, 1998.

WU, H. et al. Chiral Quantitation of Pheniramine , Chlorpheniramine , and Brompheniramine Maleates by Capillary Zone Electrophoresis. v. 37, n. January, p. 24–30, 1999.

YAGI, I. Control of the Dynamics of Photogenerated Carriers at the Boron-Doped Diamond/Electrolyte Interface by Variation of the Surface Termination. **Electrochemical and Solid-State Letters**, v. 2, n. 9, p. 457, 1999.

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

ZEN, J.-M.; TING, Y.-S. Simultaneous determination of caffeine and acetaminophen in drug formulations by square-wave voltammetry using a chemically modified electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 342, n. 2, p. 175–180, 1997.

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