

**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa Multiinstitucional de Doutorado em Química**

***DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS
DE ANÁLISES EM FLUXO COM
DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE
MÚLTIPLOS PULSOS***

WALLANS TORRES PIO DOS SANTOS

**Uberlândia
Agosto/2009**



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa Multiinstitucional de Doutorado em Química**

***DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS DE
ANÁLISES EM FLUXO COM DETECÇÃO
AMPEROMÉTRICA DE MÚLTIPLOS PULSOS***

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

Doutorando: Wallans Torres Pio dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Área de Concentração: Química Analítica

**Uberlândia
Agosto/2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- S237d Santos, Wallans Torres Pio dos, 1981-
Desenvolvimento de metodologias de análises em fluxo com detecção
amperométrica de múltiplos pulsos / Wallans Torres Pio dos Santos. -
2009.
- 126 f. : il.
Orientador: Eduardo Mathias Richter.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação Multifuncional em Química UFG-UFMS-UFU.
- Inclui bibliografia.
1. Eletroquímica - Teses. 2. Acetaminofen - Teses. 3. Vitamina C - Teses. 4. Dipirona - Teses. I. Richter, Eduardo Mathias. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação Multiinstitucional de Doutorado em Química. III. Título.

CDU: 544.6

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Programa Multinstitucional de Doutorado em Química
E-mail: ppqquimica@ufu.br - Fone: 3239-4385

ALUNO(A): WALLANS TORRES PIO DOS SANTOS

NÚMERO DE MATRÍCULA: 88308

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL DOUTORADO

TÍTULO DA TESE:

***"Desenvolvimento de metodologias de análises em fluxo
com detecção amperométrica de múltiplos pulsos"***

ORIENTADOR(A):

PROF. DR. EDUARDO MATHIAS RICHTER

A Tese foi **APROVADA** em apresentação pública realizada na Sala 204,
Bloco 1B, no Campus Santa Mônica, no dia 17 de agosto de 2009, às
13:30 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

PROF. DR. EDUARDO MATHIAS RICHTER
(Instituto de Química / UFU)

PROF. DR. ORLANDO FATIBELLO FILHO
(Universidade Federal de São Carlos)

PROF. DR. LÚCIO ÁNGNES
(Universidade de São Paulo)

PROF. DR. LUIZ ANTONIO DE FARIA
(Instituto de Química / UFU)

PROF. DR. OTÁVIO LUIZ BOTTECCHIA
(Instituto de Química / UFU)

ASSINATURA:

Uberlândia, 17 de agosto de 2009.

AGRADECIMENTOS

- ✓ *A Deus por estar sempre presente em minha vida, me iluminando durante toda essa jornada.*
- ✓ *À minha mãe, Maria Dulce, pelo apoio, confiança, carinho, dedicação e por me amar tanto, enaltecendo em mim suas virtudes.*
- ✓ *Ao meu pai, Wilson, pelo apoio, amor, carinho e conselhos de vida.*
- ✓ *Ao meu irmão, JR, pela eterna amizade, carinho, amor e por sempre acreditar em mim. Também a minha cunhada, Helen, pelo seu carinho e amizade.*
- ✓ *À minha sobrinha, Yasmin, que trouxe muita paz, alegria e esperança na minha vida.*
- ✓ *À minha madrinha e todos meus familiares pelo amor e carinho, sempre acreditando e torcendo por mim durante toda minha vida.*
- ✓ *À minha namorada, Amanda, companheira de todas as horas, que sempre me motivou e ajudou a passar pelos momentos mais difíceis com muito amor, paciência e dedicação. Também a toda sua família.*
- ✓ *Ao meu orientador, Dr. Eduardo M. Richter, pela orientação, paciência, dedicação e amizade. Em especial a sua esposa, Isabel, pelos ensinamentos de vida e grande carinho demonstrado desde que nos conhecemos.*
- ✓ *À minha querida orientadora de mestrado e iniciação científica, Prof.a Dra. Yaico D. Tanimoto de Albuquerque, pela dedicação e confiança depositada em mim desde a minha graduação sempre me apoiando com muito carinho e amizade. Também a toda sua família.*
- ✓ *Aos meus grandes amigos e colegas de laboratório: Daniel, Rodrigo (Cabeça), Moacir, Carla, Diego, Lucas, Adriano, Humberto, Leandro, Leandra, Miquéias, Elaine, Adriana, Abílio, Johnes, Thiago, Vanessa e todos os demais, a minha eterna gratidão pelo apoio e pelos bons momentos que passamos. Em especial aos amigos de laboratório Edimar e Denise, pela amizade e grande colaboração neste trabalho.*
- ✓ *Aos grandes amigos e mestres, que mesmo de longe sempre torceram pelo meu sucesso: Manuel, Carlão, Faria, Reinaldo, Sérgio, Francisco, Otávio, Ângela,*

Malu, Sebastião, Margarida, Chang, Rodrigo Muños, Waldomiro, Fernandão, Borgato, Ferreira, Luciana, Bruno, Breno, Douglas, Landercy, Jessé, Tio Toninho, Flávio, Bill, Adriana e a todos os demais o meu muito obrigado.

- ✓ *Ao Prof. Dr. Luiz Antônio de Faria, pelo empréstimo do equipamento utilizado para realização dos estudos deste trabalho.*
- ✓ *Aos membros da banca pela aceitação e contribuições a serem concedidas para o aprimoramento deste trabalho.*
- ✓ *Aos amigos de trabalho do Instituto de Química, Marilda, Ângela, Ricardo, Gabriel, Mário, Otávio, Moacir, Buiate, Edmar, Edmilson, Ildo, Ivan e Andre, pelo apoio, carinho e grande demonstração de amizade.*
- ✓ *À Universidade Federal de Uberlândia, em especial, ao Instituto de Química, pela estrutura e oportunidade de desenvolver toda minha carreira acadêmica até o momento.*

*“O degrau de uma escada não serve simplesmente para
que alguém permaneça em cima dele, destina-se a
sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para
que ele coloque o outro um pouco mais alto”.*

Thomas Huxley

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIACÕES	ix
TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O DOUTORAMENTO	x
 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO	 1
1.1- Considerações gerais	2
1.2- Limpeza e ativação da superfície do eletrodo através da MPA	6
1.3- Análises de compostos eletroativos através da MPA em FIA	10
1.4- Aspectos relevantes da detecção MPA em FIA	14
1.5- Analitos investigados	24
1.6- Justificativas para os estudos de determinação dos analitos	30
1.7- Objetivos	31
 CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL	 33
2.1- Soluções e reagentes	34
2.2- Instrumentação	34
2.3- Estudos do comportamento eletroquímico e da otimização dos parâmetros da detecção amperométrica dos analitos investigados em sistema FIA	40
2.4 - Estudos da potencialidade da detecção MPA acoplado a sistema CLAE	44

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
3.1- Considerações gerais	46
3.2- Parte (I): Análise simultânea de ácido ascórbico (AA) e paracetamol (PC) em formulações farmacêuticas em FIA com detecção MPA	46
3.3- Estudos para determinação indireta de PC na presença de altas concentrações de AA	63
3.4- Parte (II): Análise simultânea de dipirona (DI) e paracetamol (PC) por FIA com detecção amperométrica de múltiplos pulsos (MPA).....	68
3.5 – Parte (III): Acoplamento da detecção MPA em sistema CLAE.....	85
CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	96
4.1- Conclusões e perspectivas	97
CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

RESUMO

No presente trabalho investigou-se a potencialidade da detecção amperométrica de múltiplos pulsos (MPA) acoplada a sistemas em fluxo. Foram desenvolvidos métodos de análises simples para a determinação simultânea de analitos de interesse farmacêutico ou ambiental usando a MPA acoplada a sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A determinação simultânea de ácido ascórbico (AA) e paracetamol (PC) por FIA com detecção amperométrica foi realizada através da aplicação de quatro pulsos de potenciais sequenciais e cíclicos (que se repetem com intervalos regulares) em função do tempo. O AA é diretamente detectado em +0,40 V/100ms e o paracetamol indiretamente em 0,00V/100ms através da redução do produto de oxidação (N-acetil-p-benzoquinonaimina) gerada eletroquimicamente no pulso de potencial anterior (+0,65 V/100ms). O quarto pulso de potencial (-0,05 V/300ms) é aplicado para a regeneração (limpeza) do eletrodo de trabalho de ouro. O mesmo princípio de detecção foi aplicado na determinação simultânea dos princípios ativos dipirona (DI) e paracetamol (PC) em formulações farmacêuticas. Assim como no método anterior, os compostos foram detectados simultaneamente através da aplicação de quatro pulsos de potenciais sequenciais em função do tempo sob eletrodo de trabalho de carbono vítreo. Dipirona (DI) é diretamente detectada em +0,40 V/100ms e o paracetamol (PC) indiretamente em 0,00V/200ms. O produto de oxidação eletroquimicamente gerado a partir da DI também é eletroativo no pulso de potencial usado para detecção indireta de PC (0,00 V). A seletividade para a detecção de PC neste pulso de potencial foi obtida em função do tempo de aplicação do pulso (200ms). Ambas as análises simultâneas foram realizadas em meio de tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH 4,7).

As regressões lineares obtidas a partir das curvas analíticas para as análises simultâneas apresentaram excelentes coeficientes de correlação ($R = 0,999$), assim como os resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação ($\approx 100\%$). A frequência analítica dos métodos propostos foi calculada em 45 e 60 determinações por hora para os sinais amperométricos dos pares DI/PC e AA/PC, respectivamente. O desvio padrão relativo dos estudos de repetibilidade de sinal foi menor que 1% para todas as determinações. O método proposto foi usado com sucesso para a determinação destes compostos em formulações farmacêuticas. A detecção MPA acoplada a FIA foi utilizada também para quantificação de PC na presença de altas concentrações de AA usando método de adição padrão. Neste caso, é possível detectar o PC em nível de traços ($LD = 0,20 \text{ mg L}^{-1}$) na presença de AA numa concentração 880 vezes superior ($176,0 \text{ mg L}^{-1}$).

O presente trabalho também descreve a possibilidade do acoplamento da detecção MPA a sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) através de uma célula eletroquímica em fluxo do tipo “*wall jet*”. O modo de detecção MPA acoplada à CLAE apresenta vantagens, tais como: resposta rápida, alta estabilidade e elevada seletividade na resposta analítica. A célula eletroquímica proposta não apresenta efeitos de alargamento de banda e nem efeitos de memória, possibilitando o monitoramento dos analitos separados pela coluna cromatográfica com resolução comparável a de um detector UV comercial. Além disso, este trabalho demonstra a versatilidade desta célula eletroquímica para adaptação de eletrodos de trabalho comerciais ou fabricados no próprio laboratório na detecção eletroquímica em sistemas de CLAE.

Palavras Chave: *Amperometria, Múltiplos pulsos, Sistemas em fluxo, Análises simultâneas, Dipirona, Paracetamol, Ácido ascórbico.*

ABSTRACT

In this work we investigated potentialities of the multiple pulse amperometric detection (MPA) coupled with flow system. Simple analytical methodologies were developed for the simultaneous determination of analytes of pharmaceutical or environmental interest using MPA coupled with flow injection analysis (FIA) and high-performance liquid chromatography (HPLC).

The simultaneous determination of ascorbic acid (AA) and paracetamol (PC) by FIA with amperometric detection was carried out by applying four sequential potential pulses (which are repeated within regular intervals) in function of time. AA is directly detected at +0.40 V / 100ms and PC indirectly at 0.00V/100ms through the reduction of the oxidation product (N-acetyl-p-benzoquinoneimine) electrochemically generated in the prior potential pulse (+0.65 V/100ms). The fourth potential pulse (-0.05 V/300ms) is applied for regeneration (cleaning) of the working gold electrode.

The same principle of detection was applied for the simultaneous detection of active principles such as dipyrone (DI) and paracetamol (PC) in pharmaceutical formulations. As described in the previous method, the compounds were detected simultaneously through the application of four sequential potentials pulses in function of time on a glassy carbon working electrode. Dipyrone (DI) is directly detected at +0.40 V/100ms and paracetamol (PC) indirectly at 0.00 V/200ms. The oxidation product electrochemically generated from DI is also electroactive in the potential pulse applied for the indirect detection of PC (0.00 V). The selectivity for the PC detection in this potential pulse was obtained in function of the time of pulse application (200ms). Both simultaneous analyses were carried out under 0.10 mol L⁻¹ acetate buffer (pH 4.7).

The linear regressions obtained from analytical curves for simultaneous analyses presented excellent correlation coefficients ($R = 0.999$), as well as the recovery values ($\approx 100\%$). The analytical frequency for the proposed methodologies were calculated as 45 and 60 injections per hour for the analysis of DI/PC and AA/PC, respectively. The relative standard deviation for studies of repeatability of signal was lower than 1% for all analyses. The proposed method was used successfully for the determination of such compounds in pharmaceutical formulations. MPA detection coupled with FIA was also employed for PC quantification in the presence of high concentrations of AA using the standard addition method. In this case, it is possible to detect PC at trace level ($LD = 0.20 \text{ mg L}^{-1}$) in the presence of AA in 800-fold excess. (176.0 mg L^{-1}).

The present work also describes the possibility of coupling MPA detection with high-performance liquid chromatography (HPLC) through an electrochemical wall-jet cell. The MPA detection mode coupled with HPLC presents advantages such as fast response, high stability, and elevated selectivity of analytical response. The proposed electrochemical cell does not present either effects of peak broadening or carryover effects which make possible the monitoring of analytes separated by the chromatographic column with resolution comparable with a commercial UV detector. Moreover, this work demonstrates the versatility of the electrochemical cell developed in our laboratory for adaptation of commercial or home-made working electrodes for electrochemical detection in HPLC systems.

Keywords: *Amperometry, Multiple pulse, Flow system, Simultaneous analysis, Dipyrone, Ascorbic acid, Paracetamol.*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Pulsos de potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho (E_T) em função do tempo para a detecção de analito(s) eletro-oxidáveis, E_1 e limpeza do eletrodo, E_2 .	8
Figura 2: Pulsos de potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho (E_T) em função do tempo para a detecção de analito(s) eletro-oxidáveis, E_1 ; limpeza do eletrodo, E_2 ; e ativação do eletrodo, E_3 .	9
Figura 3: Esquema da dependência da magnitude dos sinais amperométricos para uma detecção direta em função da vazão da solução transportadora.	15
Figura 4: Esquema da dependência da magnitude dos sinais amperométricos para detecção no Ecoletor.	16
Figura 5: Esquema da dependência da altura do sinal amperométrico na MPA em função da variação da alça de amostragem.	18
Figura 6: Zona da amostra no instante da injeção e no momento que atinge o detector.	19
Figura 7: Dependência da corrente faradaica (I_F) em função do tempo de aplicação de um pulso de potencial.	23
Figura 8: Célula eletroquímica do tipo “wall jet”.	37
Figura 9: Esquema do sistema FIA ou CLAE em funcionamento com detecção MPA.	38
Figura 10: Esquema do sistema FIA utilizado.	39
Figura 11: Esquema de propulsão do sistema FIA.	39
Figura 12: Voltamogramas cíclicos obtidos AA e PC em tampão acetato.	47
Figura 13: Esquema da reação de oxidação do AA	48
Figura 14: Esquema da equação redox do PC e NPBQ	49

Figura 15: Amperogramas de múltiplos pulsos com a aplicação sucessiva de +0,8 V/0,1 s (a), +0,4 V/0,1 s (b) e 0,0 V/0,1 s (c) em função do tempo.	51
Figura 16: A) Escada de pulsos de potenciais aplicados sob eletrodo de trabalho de ouro em função do tempo para detecção de AA e PC.	53
Figura 17: Magnitude dos sinais de corrente em função da vazão da solução para detecção de AA e PC.....	54
Figura 18: Magnitude dos sinais de corrente em função da alça de amostragem para detecção de AA e PC.....	55
Figura 19: Esquema das reações eletroquímicas dos pares AA/ADA e PC/NPBQ e da reação química entre AA e NPBQ.....	57
Figura 20: Resposta da detecção MPA em FIA obtidas para soluções injetadas em triplicata contendo concentrações crescentes de AA e constante de PC.	58
Figura 21: Curvas de calibração para AA e PC (Fiagramas).	60
Figura 22: Repetibilidade da resposta da detecção de AA e PC.	62
Figura 23: Resposta da detecção de PC em altas concentrações de AA.	66
Figura 24: Curvas de calibração para PC obtida a partir de dados da Figura 23.	66
Figura 25: Voltamogramas cíclicos de DI e PC sob eletrodo de carbono vítreo em uma solução tampão ácido acético/acetato 0,10 mol L ⁻¹ (pH 4,7)	69
Figura 26: Esquema da primeira etapa da reação de oxidação da DI.	70
Figura 27: A) Esquema da aplicação dos pulsos de potenciais para detecção simultânea de DI e PC por MPA acoplada a FIA.	73
Figura 28: Magnitude dos sinais de corrente em função da vazão da solução transportadora para detecção de DI e PC.....	75

Figura 29: Magnitude dos sinais de corrente em função da alça de amostragem para detecção de DI e PC.....	76
Figura 30: Resposta amperométrica obtida para injeções em duplicata de soluções contendo concentrações crescentes de DI e constante de PC, e em seguida concentrações crescentes de PC e constante de DI	78
Figura 31: Repetibilidade das respostas obtidas por detecção MPA acoplada a FIA para detecção de DI e PC	80
Figura 32: Curvas de calibração para DI e PC (Fiagramas).....	81
Figura 33: Voltamograma cíclico obtido para uma solução de paration 20,0 mg L ⁻¹ em meio de ácido cítrico 0,050 mol L ⁻¹ . E _T : carbono vítreo.	86
Figura 34: Cromatogramas adquiridos com (A) detector UV comercial (273 nm) e (B) detector eletroquímico (MPA) para nitrocompostos.	87
Figura 35: Cromatogramas de uma solução contendo quatro nitrocompostos detectados por MPA em uma seqüência (cíclica) de pulsos de potenciais.....	89
Figura 36: Cromatogramas obtidos para uma solução contendo por ordem de eluição: Ácido Ascórbico, Dipirona e Paracetamol.	91
Figura 37: Esquema dos pulsos de potenciais aplicados pela detecção MPA da Fig. 36. ..	91
Figura 38: Cromatogramas obtidos de cinco injeções sucessivas de uma solução contendo (a) Ácido Ascórbico, (b) Dipirona e (c) Paracetamol.....	93
Figura 39: Cromatogramas obtidos para uma solução contendo Ácido Ascórbico (AA), Dipirona (DP) e Paracetamol (PA) com diferentes eletrodos de trabalho	95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais características físico-químicas e estruturais do Paracetamol	25
Tabela 2: Principais características físico-químicas e estruturais da Dipirona	27
Tabela 3: Principais características físico-químicas e estruturais do Ácido Ascórbico	28
Tabela 4: Resultados obtidos para análise de AA e paracetamol em formulações farmacêuticas.....	63
Tabela 5: Resultados obtidos para a determinação de DI e PC em formulações farmacêuticas.....	83

LISTA DE ABREVIACES

AA – cido ascrbico
ADA – cido dehidroascrbico
ANVISA – Agncia Nacional de vigilância sanitária
CLAE – Cromatografia de Líquida de Alta Eficincia
DI - Dipirona
DPR – Desvio Padrão Relativo
EA – Eletrodo Auxiliar
EAu – Eletrodo de ouro
ECV – Eletrodo de carbono vítreo
EPC – Eletrodo de Pasta de Carbono
ER – Eletrodo de Referncia
ET – Eletrodo de Trabalho
FE - Fenitrocion
FIA – Flow Injection Analysis (Análise por injeo em fluxo)
I_C – Corrente Capacitiva
I_F – Corrente Faradica
IUPAC – Unio Internacional de Química Pura e Aplicada
LD – Limite de Deteco
LQ – Limite de Quantificao
MPA – Multiple Pulse Amperometry (Amperometria de Múltiplos Pulsos)
MP – Metil Paration
NPBQ- N-acetil-p-benzoquinonaimina
NF - Nitrofenol
PA - Paration
PAD – Pulsed Amperometric Detection (Amperometria pulsada)
PC - Paracetamol
R – Coeficiente de correlao linear
UV – Ultravioleta
VC – Voltamograma cíclico ou voltametria cíclica

TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O DOUTORAMENTO

- 1 - Wallans T. P. dos Santos, Eduardo F. Azevedo, Yaico D. T. de Albuquerque, Eduardo M. Richter. *Construção e caracterização de um detector eletroquímico para análises em fluxo*; *Química Nova*, **2009**, no prelo.
- 2 - Denise T. Gimenes, Wallans T. P. dos Santos, Thiago F. Tormin, Joyce T. Miranda, Eduardo M. Richter *Flow-injection amperometric method for indirect determination of dopamine in the presence of a large excess of ascorbic acid*, *Artigo submetido para publicação*, **2009**.
- 3 - Wallans T. P. dos Santos, Denise T. Gimenes, Edimar G.N. de Almeida, Sebastião de P. Eiras, Yaico D. T. de Albuquerque, Eduardo M. Richter, *Simple Flow Injection Amperometric System for Simultaneous Determination of Dipyrone and Paracetamol in Pharmaceutical Formulation*, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2009**, no prelo.
- 4 - Wallans T. P. dos Santos, Edimar G.N. de Almeida, Humberto E. A. Ferreira, Denise T. Gimenes, Eduardo M. Richter, *Simultaneous Flow Injection Analysis of Paracetamol and Ascorbic Acid with Multiple Pulse Amperometric Detection*, *Eletroanalysis*, **2008**, 20, 1878-1883.

- 5- Wallans T. P. dos Santos, Eduardo F. Azevedo, Yaico D. T. de Albuquerque, Eduardo M. Richter, *Detector eletroquímico em fluxo do tipo wall-jet (depósito do pedido de patente - Protocolo 014080005440)*, **2008**.
- 6 - Denise T. Gimenes, Wallans T. P. dos Santos, Jhonys M. de Freitas, Eduardo M. Richter. *Estudo para determinação simultânea de Ácido Ascórbico e Ácido Úrico em sistema FIA com detecção amperométrica de múltiplos pulsos*, resumo enviado para o XV Encontro Nacional de Química Analítica, Salvador, **2009**.
- 7- Denise T. Gimenes, Wallans T. P. dos Santos, Thiago F. Tormin, Joyce T. Miranda, Eduardo M. Richter, *Determinação indireta de dopamina na presença de altas concentrações de ácido ascórbico usando FIA com detecção amperométrica*, Livro de resumos do XVII simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Fortaleza, **2009**.
- 8 - Wallans T. P. dos Santos, Denise T. Gimenes, Lúcio Angnes, Eduardo M. Richter *Flow injection analysis with pulsed amperometric detection for simultaneous analysis*, 59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Seville, Spain, **2008**.
- 9- Thiago F. Tormin, Denise T. Gimenes, Wallans T. P. dos Santos, Eduardo M. Richter, *Estudos iniciais para determinação simultânea de diclofenaco e paracetamol em fármacos utilizando Fia com detecção amperométrica*, Anais do XXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Belo Horizonte-MG, **2008**.

- 10- Denise T. Gimenes, Wallans T. P. dos Santos, Eduardo M. Richter, *Investigação para determinação de Ácido Acetilsalicílico (AAS) e Ácido Ascórbico (AA) em formulações farmacêuticas*, Anais do XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Uberlândia, **2007**.
- 11 - Almeida, E. G. N.; Ferreira, H. E. A.; Santos, W. T. P.; Albuquerque, Y. D. T.; Richter, E. M.; *Utilização da Detecção Amperométrica de Múltiplos Pulsos para Análises Simultâneas em FIA*, Livro de resumos do XVI simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Águas de Lindóia, Brasil, **2007**.

CAPÍTULO 1:
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO

1.1- Considerações gerais

O desenvolvimento de métodos analíticos que combinam menor tempo de análise, maior sensibilidade e seletividade, bem como simplicidade de aplicação e baixo custo, constitui-se uma área de pesquisa muito ampla e em constante expansão em química analítica.

Nesse contexto, a análise por injeção em fluxo, identificada pela sigla FIA (do inglês “Flow Injection Analysis”), tem sido explorada com sucesso na análise de uma grande diversidade de substâncias, proporcionando diversas vantagens, tais como, uso de instrumentação versátil, baixo custo dos componentes do sistema e elevada frequência analítica [1-7]. Além disto, o sistema FIA pode ser totalmente automatizado, diminuindo os riscos de intoxicação do analista, devido a uma menor exposição aos reagentes e amostras em comparação aos procedimentos manuais. Os primeiros trabalhos empregando FIA foram propostos por Ruzicka & Hansen em 1975 como um novo conceito de análises químicas [8, 9]. Nesses dois primeiros trabalhos, o sistema FIA foi acoplado a detectores de absorção molecular. Posteriormente, uma diversidade de detectores foram explorados, como por exemplo: absorção atômica [10, 11], fluorescência [12, 13], quimiluminescência [14, 15], potenciometria [16, 17], voltametria [18, 19], amperometria [20, 21], entre outros.

Dentre esses detectores, destacam-se os eletroquímicos, pois quando os analitos apresentam eletroatividade na superfície de um eletrodo, a sensibilidade e a seletividade da análise são na maioria das vezes superiores aos espectrofotométricos. Além disto, também apresentam vantagens em relação à detecção fluorimétrica de compostos eletroativos que não possuem propriedades fluorescentes, devido ao fato desses compostos necessitarem de um processo de derivatização, que em geral é uma etapa complexa de uma análise [22, 23]. O modo de detecção eletroquímico oferece ainda vantagens frente a outros sistemas, como: baixo

custo de instrumentação, simplicidade de aplicação e minimização ou até mesmo eliminação das etapas de preparação de amostras em várias metodologias de análises [3, 24-27].

Os detectores eletroquímicos mais utilizados em fluxo são os amperométricos, sendo responsáveis por grande parte dos trabalhos descritos na literatura [3]. Nesta técnica, o eletrodo de trabalho (ou sensor eletroquímico) é normalmente mantido num potencial constante adequado em função do tempo, o qual promove a oxidação ou redução eletroquímica de compostos eletroativos de interesse. As principais vantagens da detecção amperométrica sobre os métodos voltamétricos convencionais em sistemas FIA são: maior sensibilidade (devido a convecção forçada) e menores efeitos da contaminação da superfície do eletrodo de trabalho, uma vez que o tempo de contato da amostra com o eletrodo é menor e o eletrólito suporte flui continuamente durante a realização da análise [28]. Com isso, uma maior estabilidade da resposta do detector e, conseqüentemente, uma maior reprodutibilidade dos resultados podem ser obtidos.

A limitação associada a esse modo de detecção, assim como para as demais técnicas voltamétricas, está na estabilidade do sinal eletroquímico em função do tempo quando determinados compostos são analisados, comprometendo a repetibilidade da resposta e a reprodutibilidade dos resultados da análise. A estabilidade do sinal eletroquímico é governada pela taxa de transferência de carga (elétrons) entre o eletrodo e a espécie eletroativa (presente na interface eletrodo-solução), que por sua vez depende das condições da superfície do eletrodo. A superfície do eletrodo pode ser modificada gradativamente durante a análise, dependendo do tipo de composto que está envolvido no processo eletroquímico. Ou seja, quando a espécie eletroativa ou o produto formado na reação de eletrodo ou ambos ou ainda alguma impureza presente em solução são adsorvidos na superfície do eletrodo de modo irreversível ou quase-irreversível, ocorre a contaminação ou a passivação do eletrodo, que se

torna mais significativo à medida que novas alíquotas da solução contendo o analito são injetadas. Este problema é verificado, por exemplo, na determinação eletroquímica de fenóis e seus derivados [29]. A passivação ou a contaminação da superfície do eletrodo pode afetar a taxa de transferência de carga entre o eletrodo e o analito, como também produzir sinais eletroquímicos devido aos produtos adsorvidos, que interferem no sinal eletroquímico desejado.

Outra limitação da detecção amperométrica a potencial constante (usando um único eletrodo de trabalho) é a impossibilidade da determinação simultânea de compostos eletroativos com potenciais redox distintos em determinadas condições experimentais. Quando a diferença de potencial envolvida em ambos os processos eletroquímicos é suficientemente grande, superior a 0,1 V [30], é possível contornar esta limitação realizando-se medidas do sinal amperométrico em dois potenciais distintos (E_1 e E_2): 1^o) em E_1 , somente uma das espécies é reduzida ou oxidada, sendo o sinal amperométrico proporcional à concentração desta espécie; 2^o) em E_2 , ambas as espécies sofrem processo de oxidação ou redução. O sinal amperométrico diferencial corresponderá à concentração da 2^a espécie. Essa medida pode também ser realizada simultaneamente utilizando-se uma célula eletroquímica em fluxo com dois eletrodos de trabalho em paralelo, um em E_1 e outro em E_2 [31]. A utilização de uma rede de microeletrodos associada a tratamentos quimiométricos também é descrita na literatura para determinação simultânea de dois ou mais analitos [32]. No entanto, cabe ressaltar que nestes casos um bi-potenciostato ou multi-potenciostato são exigidos para controlar o potencial de cada eletrodo de trabalho, o que aumenta o custo da instrumentação para realização da análise. Além disto, o uso de mais de um eletrodo simultaneamente impede o emprego da amperometria pulsada (limitações dos softwares comerciais disponíveis) e consequentemente, a limpeza eletroquímica não é possível.

A detecção amperométrica acoplada a sistemas em fluxo também pode ser implementada no modo pulsado, onde pulsos de potenciais são aplicados ao eletrodo de trabalho sequencialmente e continuamente em função do tempo (durante a análise). Esse modo de detecção é conhecido na literatura como detecção amperométrica pulsada, popular pela sigla PAD, do inglês “Pulsed Amperometric Detection”. A PAD contorna de forma simples as limitações da detecção amperométrica com potencial constante em relação à estabilidade do sinal eletroquímico em função do tempo. Esta técnica permite que a resposta do eletrodo apresente estabilidade de sinal por um período de tempo maior devido à periódica limpeza eletroquímica a ser realizada ao longo da análise, evitando ou diminuindo a contaminação da superfície do eletrodo [3, 33-35].

A técnica PAD está normalmente presente na maioria dos softwares dos potenciostatos comerciais disponíveis no mercado. O número de pulsos de potenciais aplicáveis varia entre os diferentes equipamentos comercializados (mínimo de dois até seis pulsos de potenciais). Porém, a aquisição do sinal de corrente é normalmente restrita a um pulso de potencial. Uma alternativa a esta técnica é disponibilizada em potenciostatos comercializados pela empresa Eco Chemie – Metrohm (software GPES). Este software permite aplicar até 10 pulsos de potenciais com a possibilidade de aquisição do sinal de corrente em função do tempo em cada pulso de potencial (10 amperogramas distintos). A técnica é conhecida como amperometria de múltiplos pulsos, popular pela sigla MPA, do inglês “Multiple Pulse Amperometry”. O tempo mínimo de aplicação de cada pulso é de 30 ms (limitação do software).

Na literatura são descritos inúmeros trabalhos que aplicam a detecção MPA ou PAD a sistemas em fluxo com a finalidade de melhorar o desempenho dos métodos analíticos empregados em diversas áreas [3, 33, 35-68]. Grande parte dessas aplicações tem o intuito de realizar a limpeza e ativação da superfície do eletrodo de trabalho durante a análise. Ainda que

pouco explorada, alguns trabalhos descrevem a utilização da MPA em FIA para detecção indireta ou simultânea de analitos eletroativos. A seguir serão apresentadas e discutidas as aplicações da técnica MPA em fluxo.

1.2- Limpeza e ativação da superfície do eletrodo através da MPA

As técnicas amperométricas baseadas na MPA geralmente contornam os problemas em relação à contaminação ou passivação, ou ambos, da superfície do eletrodo de trabalho. No entanto, a aplicação de dois pulsos de potenciais somente possibilita a limpeza eletroquímica do eletrodo, sendo que, em muitos casos é necessário a aplicação de três ou mais pulsos de potenciais para realizar, além da limpeza eletroquímica, a ativação do eletrodo de trabalho com intuito de alcançar uma boa estabilidade do sinal eletroquímico ao longo da análise [36]. Isto pode ser explicado pelo fato da ativação produzir, em alguns processos, produtos intermediários, ou causar modificações na superfície do eletrodo, que favorecem os processos de transferência de carga entre o eletrodo e as espécies eletroativas de interesse, resultando numa maior sensibilidade na resposta do detector. Se a superfície do eletrodo for mantida limpa e eletroquimicamente ativa durante a análise, aumenta consideravelmente a possibilidade de obtenção de respostas estáveis, reproduzíveis e relacionáveis com a concentração do analito na solução (faixa linear de trabalho).

A Figura 1 ilustra a sequência de pulsos de potenciais que são aplicados a eletrodos de trabalho para a detecção de analito(s) eletro-oxidáveis no potencial E_1 . Os potenciais E_1 e E_2 são aplicados sequencialmente e sucessivamente ao eletrodo de trabalho, durante períodos de tempo muito curtos. A aquisição do sinal de corrente, no potencial E_1 , por exemplo, sempre é realizada após um tempo definido de aplicação do pulso de potencial. Este artifício possibilita

que a corrente residual (sempre presente na aplicação de pulsos de potenciais rápidos) apresente um valor constante em função do tempo, desde que a força iônica e a vazão da solução transportadora (FIA) ou da fase móvel (CLAE) sejam mantidas praticamente constantes. Durante a aplicação dos potenciais E_1 e E_2 tem-se a detecção dos analitos e a limpeza eletroquímica do eletrodo, respectivamente. O potencial E_1 deve ser suficientemente anódico (para analitos eletro-oxidáveis) ou catódico (para analitos eletro-reduzíveis) para que a transferência de carga entre o eletrodo e as espécies presentes na interface eletrodo-solução ocorra com cinética rápida. Nesta situação, os analitos são oxidados ou reduzidos tão rapidamente quanto são transportados para a superfície do eletrodo, produzindo uma corrente que é proporcional à concentração (faixa linear) deste analito no interior da solução. O pulso de potencial E_1 é aplicado durante um período de tempo t_1 , sendo que a corrente faradaica é monitorada somente durante o período de tempo t_2 (detecção do analito), quando a contribuição da corrente capacitiva é menor. O potencial E_2 é aplicado durante um período de tempo t_3 para a limpeza eletroquímica do eletrodo, e é selecionado com o objetivo de remover qualquer espécie que adsorva no eletrodo durante a passagem da alíquota da amostra e na detecção do(s) analito(s) presente(s). Por exemplo, quando analitos eletro-oxidáveis estão envolvidos na reação de eletrodo, a aplicação do potencial E_2 deve ter energia suficiente para provocar a redução de qualquer espécie que se encontre adsorvida no eletrodo, seja ela produto da reação eletroquímica formada a partir do analito ou outra espécie que esteja presente na solução (impurezas, por exemplo) e que tenha afinidade pelo eletrodo.

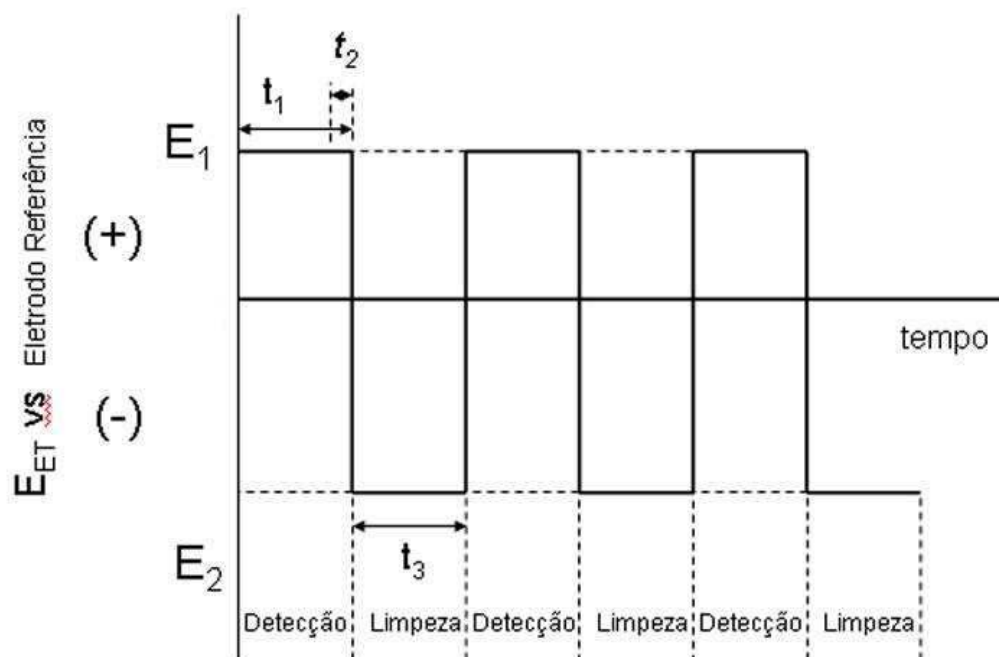


Figura 1: Pulsos de potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho (E_T) em função do tempo para a detecção de analito(s) eletro-oxidáveis, E_1 durante um tempo t_1 e t_2 (detecção no tempo t_2) e limpeza do eletrodo, E_2 durante um tempo t_3 .

Os pulsos de potenciais de ativação podem ser aplicados imediatamente após a limpeza eletroquímica do eletrodo, e antes da aplicação do pulso de potencial de detecção de analitos eletro-oxidáveis, como mostra a Figura 2. Neste caso, o ciclo envolvendo pulsos de potenciais de detecção, limpeza e reativação são aplicados sequencialmente para garantir a maior estabilidade da resposta do detector para o(s) analito(s) investigado(s).

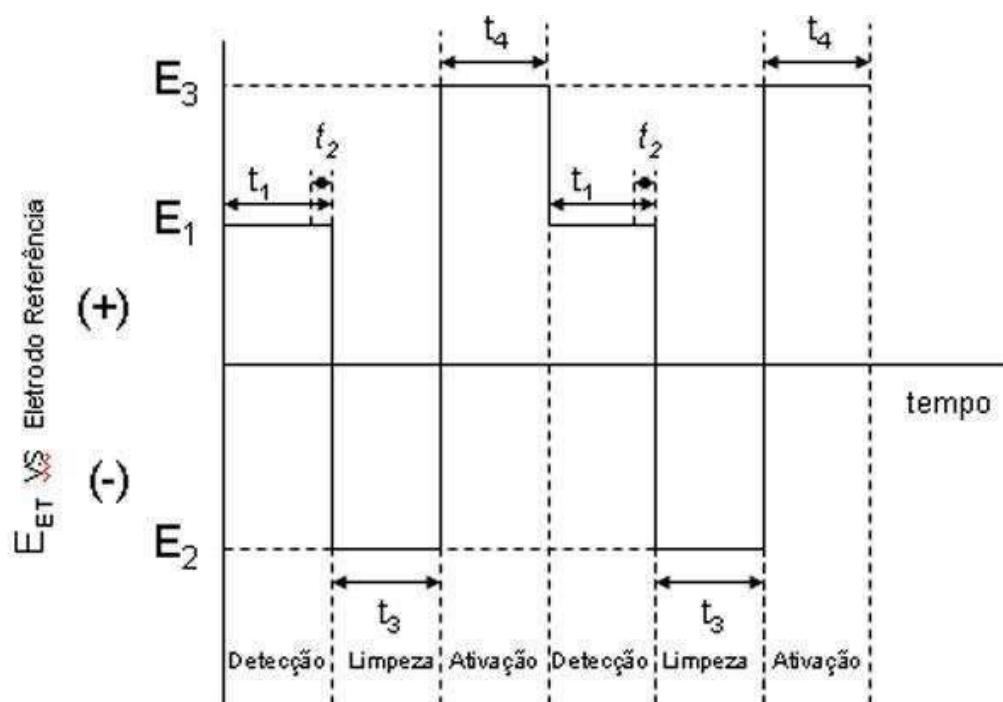


Figura 2: Pulsos de potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho (E_T) em função do tempo para a detecção de analito(s) eletro-oxidáveis, E_1 durante um tempo t_1 e t_2 (detecção no tempo t_2); limpeza do eletrodo em E_2 durante um tempo t_3 ; e ativação do eletrodo, E_3 durante um tempo t_4 .

Os esquemas de detecção amperométrica (PAD ou MPA) mostrados nas Figuras 1 e 2 são utilizados associados a FIA por diversos autores [3, 33, 37-43] ou a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo que, a CLAE abrange a maioria dos trabalhos encontrados na literatura [35, 36, 44-56]. Em ambos os sistemas, o intuito da detecção pulsada é quase sempre realizar a limpeza eletroquímica e ativação da superfície do eletrodo de trabalho. A amplitude, polaridade e tempos de aplicação dos pulsos de potencial, de detecção, limpeza e ativação, podem ser variados no sentido de se garantir a maior sensibilidade e estabilidade do sinal eletroquímico para uma diversidade de analitos. Embora os métodos de limpeza eletroquímica

sejam muito úteis para se garantir a estabilidade da resposta dos detectores durante a análise, estes procedimentos não eliminam a limpeza mecânica do eletrodo após certo período, especialmente quando as espécies adsorvem fortemente sobre a superfície desse eletrodo. Em alguns casos, a adsorção é irreversível eletroquimicamente e o uso de pulsos de potenciais de limpeza pode apresentar limitações.

1.3- Análises de compostos eletroativos através da MPA em FIA

Apesar da técnica de MPA em FIA ser muito difundida no meio científico, esta técnica ainda é pouco explorada na forma de detecção no modo gerador-coletor para espécies que apresentam comportamento redox, podendo, dessa forma, detectar indiretamente o analito com a possibilidade de eliminação de possíveis interferentes na análise. Outro procedimento pouco explorado na MPA em FIA é a análise simultânea de compostos eletroativos que possuam potenciais de oxidação ou redução distintos em determinadas condições experimentais, minimizando a desvantagem apresentada pela amperometria a potencial constante em FIA frente aos métodos cromatográficos. Abaixo estão descritos os trabalhos localizados na literatura para essas finalidades.

(i) Análise simultânea.

Em geral, o que é mais utilizado para determinação simultânea é o uso de uma coluna de separação posicionada num estágio anterior ao detector eletroquímico. No entanto, esse tipo de alternativa requer, na maior parte dos casos, o uso de sistemas cromatográficos, que, além de serem equipamentos dispendiosos, ainda necessitam de uma etapa de preparação da amostra mais trabalhosa para garantir a seletividade ou a sensibilidade (ou ambas) na detecção, o que pode comprometer o tempo da análise e produzir quantidades significativas de resíduos. A

determinação simultânea em fluxo sem utilização de técnicas cromatográficas tem sido proposta em sistemas FIA com detecção espectrofotométrica [57-65]. Mesmo apresentando vantagens em relação aos métodos cromatográficos, como a diminuição no custo de análise, estes métodos também necessitam de etapas de tratamento prévio da amostra para remoção de interferentes e, além disto, os dados gerados geralmente necessitam de um tratamento estatístico (quimiometria) para que a quantificação simultânea e seletiva seja possível. Dessa forma, a MPA em FIA demonstra ser uma técnica vantajosa em relação ao tempo, simplicidade de aplicação, baixo custo e geração de resíduos em menor volume frente aos métodos descritos anteriormente para determinação simultânea de diversos compostos.

O primeiro trabalho apresentado na literatura (fonte: Web of Science) utilizando a MPA em FIA para análise simultânea de compostos eletroativos foi proposto pelos autores Surareungchai, Deepunya e Tasakorn [66]. Eles descrevem a análise simultânea de Glicose e Frutose com aplicação de quatro pulsos de potenciais sob eletrodo de ouro modificado com Nafion em meio de NaOH 0,10 mol L⁻¹. Os pulsos de potenciais foram otimizados na seguinte sequência:

- (1) -0,50V/240ms: o grupo aldeído presente na glicose é oxidado e usado para quantificação seletiva deste analito sem a interferência da frutose;
- (2) +0,20V/180ms: o grupo aldeído presente na glicose é oxidado juntamente com os grupos alcoóis presentes tanto na glicose quanto na frutose. Dessa forma, como a frutose não possui a função aldeído em sua estrutura, a diferença entre as respostas amperométricas do primeiro pulso de potencial aplicado (E₂) e o segundo pulso de potencial (E₁) fornece proporcionalmente a resposta para quantificação da frutose sem a interferência da glicose.

(3) +1,00V/180ms: pulso de potencial usado para a limpeza da superfície do eletrodo de trabalho

(4) -0,80V/300ms: pulso de potencial usado para reativação da superfície do eletrodo de trabalho. A duração da aplicação de todos os pulsos de potenciais aplicados foram otimizados para melhor desempenho da análise.

Outro trabalho descrito por Chang e Huang relaciona a aplicação de pulsos voltamétricos a um sistema de fluxo para determinação simultânea de compostos eletroativos na superfície do eletrodo de trabalho de gota de mercúrio, como por exemplo: Cd^{2+} e I_3^- ou Pb^{2+} e Br^- , respectivamente [67]. Este trabalho pode também ser considerado como detecção MPA, pois um sensor amperométrico é um sensor voltamétrico a potencial constante, e como autores utilizam pulsos de dois ou três potenciais para análise simultânea dos analitos acoplados a um sistema FIA, a técnica assemelha-se a MPA em FIA. Ainda neste trabalho, o modo de detecção proposto foi acoplado a um sistema de cromatografia líquida de íons, onde uma coluna de troca catiônica foi utilizada para separar os íons Cd^{2+} e Pb^{2+} . Os pulsos de potenciais aplicados sob o eletrodo de trabalho de gota pendente de mercúrio em meio de NaNO_3 ou $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 0,10 mol L^{-1} foram:

(1) -0,80V: redução do íon eletroativo Cd^{2+} ou Pb^{2+} ;

(2) -0,30V: oxidação do íon I_3^- ; ou -0,1V: para oxidação do íon Br^- ; Os autores também demonstraram que os íons $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ e SCN^- também podem ser oxidados no eletrodo de trabalho em -0,30V. Cabe ressaltar que, os tempos de duração dos pulsos de potenciais aplicados não foram relatados no trabalho.

(ii) Análise Indireta

A análise indireta utilizando a detecção MPA em FIA de compostos eletroativos pode ser considerada quando se quantifica a espécie eletroquimicamente gerada na superfície do mesmo eletrodo de trabalho. O único trabalho encontrado até o momento usando esse princípio, salvo engano, foi descrito por Kubota e colaboradores. Neste trabalho, os autores descrevem a determinação de cisteína sob eletrodo de trabalho de ouro com solução transportadora de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 10,0) [68]. A sequência de aplicação dos pulsos de potenciais para detecção do analito através da técnica MPA em FIA foi:

- (1) +0,10V/700ms: oxidação da cisteína e adsorção do produto gerado na superfície de ouro;
- (2) -0,60V/30ms: detecção e quantificação indireta de cisteína pela redução do produto adsorvido;
- (3) -1,30V/2000ms: renovação e limpeza da superfície do eletrodo para análise seguinte.

O trabalho aborda as vantagens quando se utiliza a determinação indireta de cisteína pela técnica MPA em FIA, como, alta seletividade e reprodutibilidade da análise frente aos demais métodos descritos na literatura para este analito. Deve-se ressaltar que, outras formas de abordar este modo de detecção como análise indireta em FIA são encontrados, como por exemplo: uso de dois eletrodos de trabalho (gerador-coletor) [69] e, adição de reagentes que geram ou consomem compostos eletroativos, os quais são posteriormente analisados pela detecção amperométrica [70-73].

Contudo, considerando-se a potencialidade da detecção MPA acoplada a sistemas FIA, abrem-se perspectivas de desenvolvimento de métodos de análises químicas de compostos eletroativos, apresentando as seguintes vantagens: baixo custo; alta reprodutibilidade dos resultados, melhor seletividade e sensibilidade, menor tempo de análise e maior simplicidade

na execução da metodologia de tratamento das amostras, diminuindo significativamente a geração de resíduos. Os aspectos relevantes relacionados com a MPA em FIA são apresentas no item a seguir.

1.4- Aspectos relevantes da detecção MPA em FIA

Alguns aspectos relevantes da detecção MPA em FIA possuem características em comum para maioria das investigações de determinação de um ou mais analitos, como: variações de vazão do sistema, alça de amostragem e tempo de duração do pulso de potencial aplicado. Deste modo, serão abordados a seguir esses parâmetros de forma geral, podendo ser aplicados aos resultados desenvolvidos no presente trabalho.

1.4.1 – Variação da vazão no sistema FIA com detecção amperométrica

Em sistemas FIA, os termos fluxo e vazão são, normalmente, usados como sinônimos e se referem ao volume de solução transportadora que atinge o detector acoplado ao sistema FIA por unidade de tempo. Porém, o termo vazão é normalmente adotado para identificar este parâmetro.

Considerando uma espécie eletroativa que sofre um processo de oxidação ou redução diretamente na superfície do eletrodo de trabalho, a magnitude da resposta eletroquímica aumenta com o aumento da vazão da solução transportadora (mantendo os demais parâmetros constantes). O aumento na magnitude do sinal é proporcionado pelo aumento da taxa de transporte de massa por unidade de tempo do interior da solução para a superfície do eletrodo. Como consequência, diminui-se a espessura da camada de difusão de Nernst e um maior sinal amperométrico é obtido. O sinal alcança um valor máximo, sofrendo

pequeno decréscimo em vazões muito elevadas, motivo o qual ainda não é conhecido na literatura. A Figura 3 mostra um possível esquema da dependência da magnitude do sinal amperométrico na detecção direta de analitos eletroativos em função da variação da vazão do sistema.

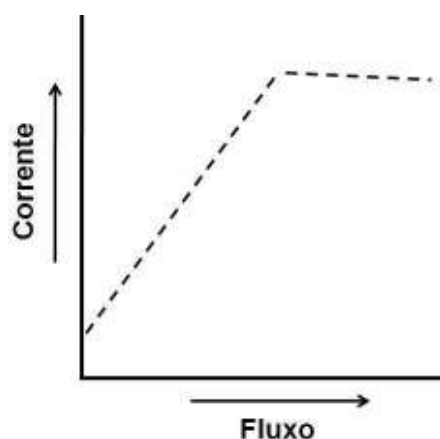


Figura 3: Esquema da dependência da magnitude dos sinais amperométricos para uma detecção direta em função da vazão da solução transportadora. Mantendo-se outras variáveis constantes.

Outro fenômeno a ser considerado é quando um composto eletroativo tem um comportamento redox na superfície de um eletrodo de trabalho. Nesse caso, o modo de detecção MPA em FIA permite o monitoramento simultâneo das correntes de cada processo (oxidação-redução e vice-versa). Assim sendo, há possibilidade da detecção da espécie eletroativa gerada no pulso de potencial anterior. Considerando a detecção de um sistema redox por MPA, em vazões muito lentas o processo redox tende a possuir a mesma magnitude de sinal, visto que as espécies geradas num pulso de potencial anterior permanecem na superfície do eletrodo para serem detectadas (pulsos de potenciais na ordem de ms). À medida que a vazão aumenta, a magnitude do sinal no pulso de potencial

gerador é aumentada e, assim, se o tempo de aplicação do pulso de potencial coletor for rápido o suficiente para detectar as espécies antes que elas difundam da superfície do eletrodo para o interior da solução, a magnitude do sinal também aumenta no pulso de potencial coletor devido ao maior número de espécies geradas anteriormente. No entanto, em vazões elevadas o sinal analítico decresce devido à remoção das espécies eletroquimicamente geradas na proximidade (nanômetros) do eletrodo se tornar mais rápida do que a detecção no potencial coletor. A Figura 4 mostra um esquema da dependência da magnitude do sinal amperométrico na detecção de analitos eletroativos gerados em um pulso de potencial anterior em função da variação da vazão do sistema. Deve-se destacar que, o comportamento pode variar dependendo do analito (diferentes coeficientes de difusão), principalmente se a detecção indireta for realizada para espécies eletroativas que adsorvem na superfície do eletrodo após serem geradas. Outro ponto importante a ressaltar é que as inclinações mostradas nos gráficos da Figura 3 e 4 são meramente ilustrativas.

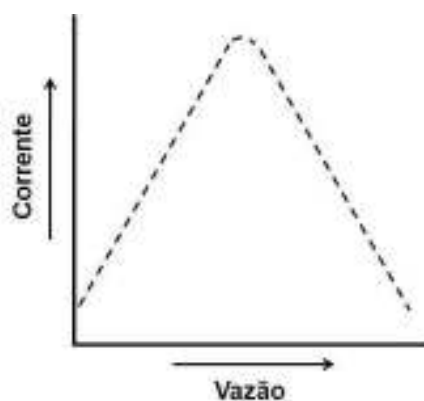


Figura 4: Esquema da dependência da magnitude dos sinais amperométricos para uma detecção de um produto gerado em um pulso de potencial anterior em função da vazão da solução transportadora. Demais variáveis constantes.

1.4.2 – Variação da alça de amostragem no sistema FIA com detecção amperométrica

A alça de amostragem é um compartimento que contém uma quantidade em volume (μL) de amostra ou solução padrão para ser inserida no percurso analítico através de um injetor. Em sistema FIA, normalmente, as alças utilizadas têm capacidade de 50 a 500 μL . Por outro lado, em sistema CLAE, a capacidade da alça de amostragem varia de 2 a 20 μL , pois nesses sistemas, o volume injetado tem relação direta com a capacidade de resolução da coluna cromatográfica, ou seja, quanto menor o volume injetado, melhor a resolução e vice-versa.

Na detecção amperométrica em sistema FIA utiliza-se frequentemente a altura do pico como medida analítica. Deste modo, quando se aumenta o volume da alça de amostragem, a magnitude do sinal vai aumentando até alcançar um limite máximo e constante. Como a detecção indireta através da técnica MPA também depende da quantidade gerada em um processo eletroquímico prévio, o comportamento da magnitude do sinal amperométrico em função da variação da alça de amostragem é semelhante a detecção direta de um composto eletroativo. A Figura 5 apresenta um esquema da dependência da altura do sinal amperométrico na MPA em função da variação da alça de amostragem.



Figura 5: Esquema da dependência da altura do sinal amperométrico na MPA em função da variação da alça de amostragem. Mantendo outras variáveis constantes.

O comportamento observado pela Figura 5 ocorre devido ao efeito de dispersão da amostra no percurso entre o injetor e o detector eletroquímico. Outro fator que pode causar esse efeito é quando o volume da célula for maior que o volume da alça de amostragem, provocando uma diluição da amostra, porém, normalmente, os volumes das células utilizadas são muito pequenos. Então, quanto menor o volume da alíquota injetada, menor a magnitude do sinal amperométrico porque a dispersão da amostra pode se estender por toda a zona da mesma. A dispersão é uma característica intrínseca das análises em sistemas por injeção em fluxo [74], causada pelo surgimento de um gradiente de concentração da espécie química de interesse nas duas extremidades da zona da amostra, que se amplia à medida que aumenta o percurso entre o injetor e o detector. Para uma maior compreensão deste fenômeno encontram-se disponíveis na literatura uma diversidade de textos sobre o assunto, que discutem os aspectos teóricos da dinâmica de fluídos [74].

A dispersão do analito nas extremidades da zona da amostra causará maior efeito de diluição quanto menor for o volume da alíquota injetada (mantendo o percurso analítico

fixo desde o início da alça de amostragem até o detector). No entanto, há um limite máximo de corrente dado pela altura de pico para um composto eletroativo em relação ao aumento do volume na alça de amostragem. A partir de certo volume, os gradientes de concentração (diluição) que ocorrem nas extremidades da zona da amostra deixam de alcançar a região central da mesma e um sinal analítico constante é adquirido em relação à altura de pico a partir deste volume. Em contra partida, em relação à área do pico em sistemas por injeção em fluxo, quanto maior alça de amostragem, maior será a área do pico do composto investigado, porém sem atingir um ponto limite em função dessas variáveis. A Figura 6 ilustra o efeito de dispersão nas extremidades da zona de amostra num sistema de análise por injeção em fluxo.

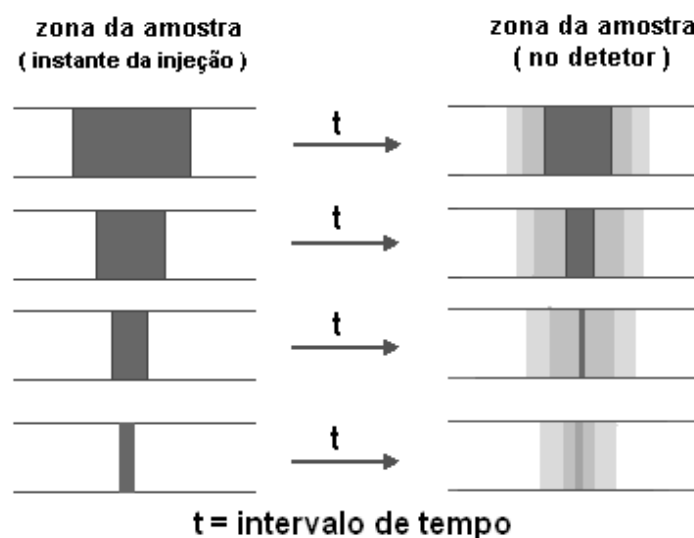


Figura 6: Zona da amostra no instante da injeção e no momento que atinge o detector (considerando somente o efeito da dispersão).

Na Figura 6, a região mais escura representa a região da zona da amostra que não sofreu efeito de dispersão, que se mantém inalterada (nesta zona, o analito se encontra na concentração da solução original). As regiões mais claras representam a região da zona da amostra que sofreu efeito de dispersão ou diluição (nesta zona, o analito se encontra em concentração inferior à da solução original). Quanto mais clara, mais diluída está a amostra. Na Figura 6 a representação da zona da amostra que atinge o detector é mostrada sem efeito da distorção radial que ocorre nas extremidades (interface solução/parede do tubo). O problema gerado pela dispersão pode ser minimizado colocando o injetor bem próximo do detector.

Deve-se ressaltar que, mesmo havendo um ganho na resposta amperométrica com o aumento do volume da alça de amostragem, altas quantidades de amostras implicam em baixas frequências analíticas devido ao tempo maior necessário para que toda amostra passe pelo detector. Além disso, na detecção eletroquímica, uma quantidade elevada de amostra pode agravar problemas de passivação ou contaminação da superfície do eletrodo, o que prejudica a reprodutibilidade da análise.

Outra questão que sempre deve ser observada na utilização da MPA em FIA está relacionada com o número mínimo de pontos de aquisição de corrente por pico transiente gerado em cada injeção de amostra ou solução padrão. Isto está diretamente relacionado com a vazão, volume da alça de amostragem e velocidade de aquisição. Em um estudo de otimização prévio ficou definido que um pico é adquirido sem deformação significativa quando este apresentar no mínimo 20 pontos de aquisição. Em outras palavras, o sinal de corrente deve ser adquirido pelo menos 20 vezes durante a passagem da alíquota da amostra ou solução padrão pelo detector. Como exemplo, hipoteticamente, os seguintes pulsos de

potenciais em uma determinada análise foram aplicados: +0,40 V/0,10 s; +0, 80 V/0,60 s; 0,00 V/0,03 s e -0,10 V/0,60 s. A soma total do tempo dos pulsos de potenciais é de 1,33 segundos, o que significa que um ponto é adquirido em cada amperograma (4 no total) a cada 1,33 segundos. Portanto, para que um pico transiente apresente pelo menos 20 pontos de aquisição de corrente, a zona de amostragem deve levar no mínimo 27 segundos para passar pelo detector. Isto faz com que grandes alças de amostragem ou baixas vazões sejam utilizadas. Apesar disto, é possível realizar em média 60 determinações por hora, o que ainda é uma alta frequência analítica comparada a outros métodos.

1.4.3 - Variação do tempo de duração do pulso de potencial em FIA com detecção MPA

A corrente amperométrica monitorada durante a aplicação de cada pulso de potencial é governada por dois componentes de corrente: corrente capacitiva, I_C (originária do carregamento da dupla camada elétrica quando um pulso de potencial é aplicado) e corrente faradaica, I_F (devido ao processo eletroquímico no eletrodo) [75]. A participação da I_F na corrente amperométrica total depende da presença de espécies eletroativas que podem ser oxidadas ou reduzidas no eletrodo, sob o pulso de potencial aplicado. Assim, numa análise que envolve a detecção amperométrica em fluxo, quando apenas o eletrólito está passando através da célula eletroquímica, a magnitude de I_F dependerá da concentração de impurezas eletroativas (em geral baixas) que se encontram presentes na solução do eletrólito.

A dependência da I_F e da I_C com o tempo de aplicação do pulso é diferente. A componente I_C é alta no início da aplicação do pulso de potencial, mas diminui rapidamente (exponencialmente) com o tempo da aplicação do pulso ($I_C \propto e^{-t}$). Para uma solução que

contém um analito eletroativo, a dependência da componente I_F com o tempo de aplicação do pulso depende das condições do transporte de massa do analito. Sob condições estacionárias, I_F diminui menos rapidamente que a I_C com o tempo de aplicação do pulso de potencial ($I_F \propto t^{-1/2}$) [75].

Considerando-se a dependência da I_F e da I_C com o tempo de aplicação do pulso, tem-se que, quanto maior o tempo de aplicação do pulso de potencial, menor será a contribuição da I_C para a corrente amperométrica total monitorada. Entretanto, deve-se ressaltar que, apesar da contribuição da I_C ser maior quando pulsos de potenciais são aplicados por curtos períodos de tempo, esta contribuição, em princípio, não afetará o sinal amperométrico de interesse (I_F), pois, a corrente amperométrica está sendo medida continuamente, antes, durante e após a passagem da zona da amostra. Dessa forma, a contribuição da I_C será a mesma, antes, durante e após a passagem da zona da amostra que contém o analito de interesse. Por consequência, durante a passagem da zona da amostra é possível monitorar somente a contribuição da I_F (devido ao analito) para o sinal amperométrico. Entretanto, o aumento da I_C proporciona um acréscimo no sinal de corrente de fundo (o que gera um aumento no ruído da linha base) e pode provocar um aumento no limite de detecção para a espécie eletroativa investigada. A Figura 7 mostra a dependência do sinal de I_F e I_C em função do tempo de aplicação de um pulso de potencial em FIA com detecção amperométrica em um sistema estacionário (Fig. 7A), em soluções em fluxo com vazões baixas (Fig. 7B) e elevadas (Fig. 7C).



Figura 7: Dependência da corrente faradaica (I_F) e da corrente capacitiva (I_C) em função do tempo de aplicação de um pulso de potencial em uma solução estacionária (A) e em sistemas em fluxo com vazões baixas (B) e elevadas (C).

A Figura 7 demonstra que a I_C tende a diminuir à medida que os tempos de aplicação dos pulsos de potenciais aumentam, sendo que a magnitude da diminuição da I_C tende a ser a mesma tanto para sistema estacionário (Fig. 7A), quanto para sistemas em fluxo com vazões baixas (Fig. 7B) e elevadas (Fig. 7C). Entretanto, a I_F apresenta uma diminuição mais acentuada em sistemas estacionários (Fig. 7A) do que em sistemas em fluxo (Fig. 7B e 7C), tendendo a diminuir menos quanto maior é a vazão utilizada. Este fenômeno ocorre na I_F devido à taxa de reposição das espécies eletroativas não ser suficientemente rápida para repor o material que está sendo consumido no eletrodo.

O comportamento apresentado pela Figura 7 não ocorre no pulso de potencial gerador quando a vazão é alta o suficiente para repor o material consumido na interface eletrodo/solução e, desta forma, um sinal de corrente (I_F) constante deve ser observado independente do tempo de aplicação do pulso de potencial. Em relação à duração do tempo

de aplicação do pulso de potencial coletor, a corrente (I_F) detectada diminui em função do tempo, tendendo a zero.

1.5- Analitos investigados

(i) Paracetamol

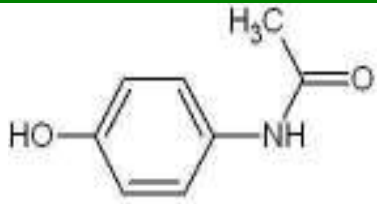
O paracetamol (PC) é um fármaco com propriedades analgésicas e antipiréticas, sendo bastante utilizado em formulações farmacêuticas com capacidade de combater a dor e a febre sem a geração de problemas gástricos, como apresentado pela aspirina [76, 77]. O PC é também chamado de acetoaminofeno ou de acordo com a nomenclatura recomendada pela IUPAC por N-(4-hidroxifenil)etanamida [78]. A atuação no organismo é realizada pela inibição da síntese das prostaglandinas, as quais são mediadores celulares responsáveis pelo aparecimento da dor e da febre [77]. Devido o PC oferecer poucos efeitos colaterais e não reagir com a maioria dos medicamentos, atualmente este é um dos fármacos mais utilizados como analgésico em casos de dores suaves e moderadas em pacientes, podendo ser administrado na forma de gotas, comprimidos, xaropes ou injetáveis [79, 80].

No entanto, em doses elevadas, o PC apresenta sérios riscos à saúde com danos significativos no fígado. Segundo a literatura, quando é administrada uma dose de um grama de PC, quatro vezes ao dia, um terço dos pacientes pode ter um aumento em seus testes de função hepática de três vezes em relação ao valor normal. Cabe ressaltar que, a sobredosagem de PC depende do quadro clínico do paciente, apresentando diferenças entre adultos e crianças, o que leva a incertezas na afirmação de uma possível insuficiência hepática com os níveis apresentados (4g / dia). A sobredosagem de PC quando não tratada

adequadamente pode gerar uma falência hepática seguida de morte em poucos dias [81, 82].

Com base nas observações acima mencionadas em relação ao PC, o controle de qualidade deste fármaco em formulações farmacêuticas torna-se extremamente importante. Assim sendo, uma diversidade de métodos analíticos têm sido desenvolvidos para determinação de PC em sua forma pura e, em associações com outras substâncias, como destaca um artigo de revisão recentemente publicado [79], onde o estado da arte em relação aos métodos de análise em relação ao PC são discutidos. A estrutura do PC e as propriedades físico-químicas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Principais características físico-químicas e estruturais do Paracetamol [83, 84]

Estrutura	
Fórmula molecular	C ₈ H ₉ NO ₂
Massa molar	151,163 g mol ⁻¹
Nomenclatura da IUPAC	N-(4-hidroxifenil)etanamida
Solubilidade em água	12,75 mg mL ⁻¹ (20 °C)
Ponto de Fusão	170 °C
Densidade	1,26 g cm ⁻³

(ii) Dipirona

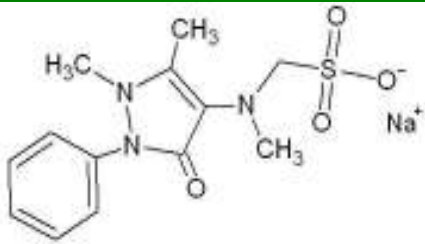
A dipirona (DI) ou metamizol sódico é um medicamento antiinflamatório não-estereoidal amplamente utilizado como analgésico e antipirético em formulações farmacêuticas [85]. A DI é hidrossolúvel e em consequência disto pode ser administrada em

grandes doses, o que contribui para uso abusivo deste fármaco pelos pacientes [85, 86]. Apesar da restrição de uso em alguns países, como Estados Unidos, a DI ainda é utilizada no Brasil, devido principalmente ao seu forte efeito analgésico e custo relativamente baixo [86]. Como o paracetamol, a dipirona é quase sempre vendida sem prescrição médica, sendo principalmente comercializada na forma sódica (solução oral, injetável e comprimidos). No Brasil existem cerca de 100 (cem) produtos à base de dipirona, sendo grande parte destes associados a outras substâncias.

A restrição imposta a DI em alguns países está relacionada com a descoberta, na década de 70, que o uso contínuo desse composto poderia causar uma doença chamada de agranulocitose [87]. Essa doença provoca a falta ou diminuição de glóbulos brancos no sangue e, em caso agudo pode ser muito perigosa e potencialmente fatal. No entanto, estudos mais recentes sobre o risco de agranulocitose atribuível à DI demonstram que a incidência deste evento entre os usuários de DI é baixa. Além disto, a agranulocitose pode ser causada por muitos medicamentos, assim como agentes químicos e pesticidas [87].

Devido ao constante uso de DI, a utilização de métodos eficientes de análise deste fármaco é de grande relevância na produção e fiscalização deste composto. As análises de DI são descritas na literatura por procedimentos empregando titulometria [88, 89], cromatografia com detectores no ultravioleta [90, 91], voltametria [92], polarografia [93], espectrofotometria [94, 95] e métodos em fluxo usando diversos detectores [32, 95-100]. A estrutura da DI e as propriedades físico-químicas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Principais características físico-químicas e estruturais da Dipirona [101]

Estrutura	
Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₆ N ₃ O ₄ Na
Massa molar	311,358 g mol ⁻¹
Nomenclatura da IUPAC	[(2,3-diidro-1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-1H-pirazol-4-il)metilamino] metanosulfonato sódico.
Solubilidade em água	solúvel
Ponto de Fusão	não disponível
Densidade	não disponível

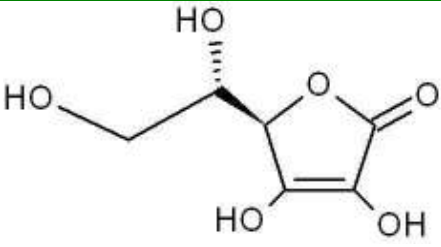
(iii) Ácido ascórbico

O ácido ascórbico (AA) é uma vitamina hidrossolúvel, também conhecido como vitamina C, que tem como função principal dar resistência aos ossos, dentes, tendões e paredes dos vasos sanguíneos. O AA também atua na síntese de algumas moléculas que são utilizadas como hormônios e neurotransmissores. Além de varias outras funções do AA, como prevenção a gripes, fraqueza muscular e infecções, uma em especial está relacionada com seu poderoso efeito antioxidante, que converte os radicais livres de oxigênio em formas inertes, evitando a formação de células cancerosas [102, 103]. A dose terapêutica diária recomendada de AA é de 40 a 60 mg, mas a sobredosagem desse composto não causa efeitos adversos perceptíveis em consequência de ser praticamente atóxico e, quando saturado nos tecidos, o excesso é rapidamente eliminado pela urina. A carência desta

vitamina provoca a avitaminose designada por escorbuto, que causa hemorragias nas gengivas, dores nas articulações, feridas que não cicatrizam, além de desestabilização dos dentes [104, 105].

Dada a importância do AA na dieta humana, existe uma alta demanda de consumo em relação a esse composto na forma pura ou mesmo em associações em formulações farmacêuticas, ambos administrados, principalmente, como comprimidos. Com isso, inúmeros trabalhos são encontrados com intuito de determinar o AA em fármacos e em fluidos biológicos [106-113]. Cabe destacar que, o AA em muitas análises, principalmente nas eletroquímicas, é um interferente na determinação de outros analitos devido a sua fácil oxidação e interação com outros compostos [114-118]. A estrutura do AA e as propriedades físico-químicas são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Principais características físico-químicas e estruturais do Ácido Ascórbico [119].

Estrutura	
Fórmula molecular	C ₆ H ₈ O ₆
Massa molar	176,13 g mol ⁻¹
Nomenclatura da IUPAC	3-oxo-L-gulofuranolactona
Solubilidade em água	solúvel
Ponto de Fusão	191 °C
Densidade	1,65 g cm ⁻³

(iv) Mistura dos analitos

A associação de fármacos é muito comum, sendo utilizada, principalmente, quando se pretende potencializar o efeito por interação farmacodinâmica desses compostos [120, 121], o que pode justificar as combinações de AA e PC ou DI e PC numa mesma formulação. Segundo a Farmacopéia Americana [122], quando dois ou mais princípios ativos estão presentes numa determinada formulação, a quantificação deve ser feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção no ultravioleta (UV). Entre as poucas referências citadas em relação à determinação simultânea de DI e PC, uma delas relata o uso de titulometria [123], onde a amostra necessita de etapas prévias de preparação e separação dos analitos, o que compromete significativamente o tempo da análise. Outros métodos descritos são através da CLAE-UV [90, 124, 125], que apesar de serem baseadas no método oficial, são dispendiosas e normalmente necessitam de um tratamento prévio trabalhoso da amostra, podendo afetar a frequência analítica e produzir quantidades expressivas de solventes orgânicos como resíduos.

Em relação à determinação simultânea de AA e PC há poucos métodos descritos com esta finalidade, sendo a maior parte destes realizada por técnicas cromatográficas [79, 126-129]. Uma alternativa aos métodos cromatográficos é descrita por Lau e colaboradores [130]. Neste trabalho, AA, cafeína e PC foram determinados simultaneamente em formulações farmacêuticas por voltametria de pulso diferencial usando um eletrodo de carbono vítreo. Outro trabalho apresenta um método capaz de quantificar simultaneamente uma mistura contendo PC, AA e ácido acetilsalicílico utilizando espectrofotometria com detecção no ultravioleta associada à técnicas de calibração multivariada [131]. No entanto, os dois métodos foram utilizados em estado estacionário, possuindo uma baixa frequência analítica quando comparados aos métodos acoplados a sistema FIA. Um método sequencial

em FIA para quantificação de AA e PC é descrito por Ruiz-Medina e colaboradores. Nesse trabalho uma fase sólida (trocadora de íons) é usada no percurso analítico com o intuito de separar os componentes e, a detecção é realizada por um sensor espectrofotométrico no ultravioleta [132]. O sensor desse método responde alternadamente para os dois analitos e uma injeção é possível a cada cinco minutos.

Dessa forma, a investigação de métodos de análises mais rápidos e de menor custo, com seletividade e sensibilidade comparável à dos métodos oficiais é assunto de grande interesse nessa área de pesquisa.

1.6- Justificativas dos estudos de determinação dos analitos

O desenvolvimento de métodos de análises para determinação de fármacos é de extrema importância no controle de qualidade desses compostos com objetivo de obter a autenticidade dos produtos farmacêuticos introduzidos no mercado, evitando possíveis erros, adulterações e falsificações na composição de suas formulações. A possibilidade da utilização de métodos analíticos que sejam rápidos, precisos e de custo reduzido apresenta grande interesse, tanto na produção, como na fiscalização desses fármacos.

Devido ao baixo custo dos medicamentos manipulados em relação aos industrializados, as farmácias de manipulação se tornaram uma alternativa frequente na aquisição dessas drogas pelo consumidor. No entanto, existem alguns obstáculos que impedem um maior crescimento desse setor, sendo, o maior deles, a falta de credibilidade do produto manipulado [133]. Recentemente entrou em vigor a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº. 67 da ANVISA, de 08 de outubro de 2007, que dispõe sobre as boas práticas de manipulação em farmácias, as quais estabelecem que as mesmas devem realizar

uma análise da formulação manipulada para algumas classes de princípios ativos a cada três meses [134]. Apesar do controle de qualidade normatizado pela RDC nº. 67 da ANVISA aumentar a credibilidade desse setor, a implicação econômica desta resolução pode gerar um custo adicional aos produtos manipulados, ocasionando um grande problema nas microempresas que manipulam estes produtos, principalmente nos casos em que a formulação manipulada possuir mais de um princípio ativo. Isto porque, nesse caso, segundo o método oficial adotado atualmente, a quantificação (controle de qualidade) deve ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em grande parte com detecção ultravioleta (UV) [135]. Todavia, os métodos CLAE-UV exigem uma infraestrutura de laboratório de maior porte, devido ao uso de equipamento de alto custo, acessórios e ao consumo de solventes orgânicos de pureza espectroscópica e cromatográfica.

Dentro deste contexto, investigações de métodos de análises que sejam simples, rápidos e de baixo custo, que possam ser utilizados no controle de qualidade de um maior número de medicamentos manipulados, são de grande interesse das empresas de manipulação com a finalidade de reduzir o custo das análises. Nesse sentido, os métodos eletroanalíticos em fluxo baseados na MPA em FIA apresentam características interessantes a serem exploradas no controle de qualidade das formulações farmacêuticas.

1.7- Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a potencialidade da técnica MPA acoplada a um sistema FIA com a finalidade de propor métodos de análises simultâneas de compostos eletroativos. Os objetivos específicos consistiram em:

- ✓ Investigar os parâmetros da detecção MPA acoplada a sistema FIA de linha única na análise dos analitos estudados (ácido ascórbico, paracetamol e dipirona), como por exemplo: eletrodo de trabalho, eletrólito suporte, vazão, alça de amostragem, pulsos de potenciais aplicados e o tempo de aplicação de cada pulso de potencial;
- ✓ Determinar simultaneamente Ácido Ascórbico e Paracetamol em formulações farmacêuticas;
- ✓ Determinar indiretamente o Paracetamol na presença de altas concentrações de Ácido ascórbico;
- ✓ Determinar simultaneamente Dipirona e Paracetamol em formulações farmacêuticas;
- ✓ Avaliar o desempenho da detecção MPA acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência.

CAPÍTULO 2:

PARTE EXPERIMENTAL

2.1- Soluções e reagentes

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida de sistema de purificação Milli-Q.plus (Millipore). As soluções padrão de ácido ascórbico (Vetec), paracetamol (Synth), dipirona (Sigma-Aldrich) e dos nitrocompostos (nitrofenol, metil paration, fenitroton, paration, todos adquiridos da Sigma-Aldrich) foram preparadas com reagentes de grau analítico. Soluções $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico e tampão de ácido acético/acetato de potássio (pH 4,7) foram utilizadas como eletrólito suporte nos experimentos eletroquímicos. Tampões fosfato (pH 7,2), citrato (pH 2,0) e borato (pH 9,2) também foram utilizados em estudos preliminares. Soluções estoque contendo $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ dos respectivos fármacos foram preparadas e posteriormente diluídas em eletrólito suporte para os estudos conduzidos no presente trabalho. As amostras foram adquiridas em drogarias da cidade de Uberlândia-MG e preparadas no mesmo eletrólito suporte. Todos os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente ($27^{\circ}\text{C} \pm 2$). A fase móvel utilizada nos estudos cromatográficos era constituída de acetonitrila de grau cromatográfico e espectroscópico (Merck) e ácido cítrico (Vetec) $0,050 \text{ mol L}^{-1}$.

2.2- Instrumentação

2.2.1- Detecção eletroquímica

As medidas amperométricas e voltamétricas foram realizadas utilizando-se o potenciostato/Galvanostato PGSTAT 20 da Autolab e um micro Autolab III (ambos da Eco Chemie Metrohm). Células eletroquímicas de três eletrodos foram utilizadas nos estudos em sistema estacionário (um béquer de vidro de 10 mL) e, no sistema em fluxo foi

construída no próprio laboratório uma célula do tipo “wall-jet”, apresentada na Figura 8 e 9. Como eletrodos de referência e auxiliar foram usados um microeletrodo de Ag/AgCl (KCl saturado) [136] e um fio de platina, respectivamente. Os eletrodos de trabalho utilizados foram o de pasta de carbono, carbono vítreo e ouro, todos de 2,0 mm de diâmetro, sendo os dois últimos da empresa Metrohm e o de pasta de carbono preparado pela mistura de 0,100 g de grafite puro (Fluka) com 50 μ L de óleo mineral em um almofariz de ágata, até completa homogeneização.

O eletrodo de referência foi preparado pela eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag (30,0 mm x 1,0 mm de diâmetro), através da eletrólise da solução de NaCl 0,10 mol L⁻¹, sob corrente constante de 0,2 mA, durante 10 minutos, utilizando-se o Potenciostato/Galvanostato PGSTAT 20 da Autolab (Eco Chemie). Após a eletrodeposição, o fio de Ag/AgCl foi inserido em uma ponteira de micro pipeta de 100 μ L, a qual foi fechada na sua extremidade menor por meio de uma junção porosa e preenchida com uma solução saturada de KCl, constituindo dessa forma o micro-referência. Todos os experimentos usando a MPA são apresentados com a subtração da corrente capacitiva, que é gerada devido à aplicação de pulsos de potenciais elevados e rápidos ($\approx$ 500 mV e em milissegundos). Foi usado o software gráfico Origin 7.0 nos tratamentos de dados obtidos nesse trabalho (todos gráficos apresentados neste trabalho foram suavizados).

O detector é mostrado na Figura 8A e consiste de um tubo de vidro (1) fechado na extremidade inferior por meio de uma peça de teflon (2), com um orifício longitudinal no centro da mesma. Um tubo em aço inoxidável (3) com um fino capilar (ao redor de 100-500 μ m d.i.) é introduzido no interior deste orifício, através do qual fluirá a solução de eletrólito transportador (com ou sem a amostra) de um sistema de análise por injeção em fluxo ou a fase móvel (com ou sem o eluato) de um sistema de cromatografia líquida. Na extremidade

superior do tubo de vidro (1) encontra-se outra peça de teflon (4) com um orifício central longitudinal, dotado de uma rosca interna. O diâmetro deste orifício é ajustado de acordo com o diâmetro externo do tubo de teflon (5), que por sua vez tem um diâmetro interno ajustado de acordo com o diâmetro externo do corpo do eletrodo de trabalho (6). O tubo de teflon (5) tem uma rosca externa que permite fazer o ajuste fino da distância do eletrodo de trabalho à saída do jato de solução (3), o qual está posicionado em frente ao centro do eletrodo de trabalho. O eletrodo auxiliar (7) que completa o circuito da eletrólise, e o eletrodo de referência (8), que controla o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho são posicionados próximos ao eletrodo de trabalho, em lados opostos. A solução no interior da célula é transportada a um reservatório de descarte pela saída (9). A área do eletrodo de trabalho e a distância entre a superfície deste eletrodo e a saída do jato, indicado por (b) na Figura 8B, define o “*volume efetivo da célula*”. Esta distância (b) pode variar desde 1,0 até 5,0 mm sem causar alterações significativas na resposta do detector (para a área dos eletrodos de trabalho utilizados de 2,0 mm²), contanto que a vazão seja elevada ou o diâmetro interno do tubo de saída da solução posicionado em frente ao eletrodo de trabalho seja reduzido, como foi demonstrado pelo doutorando e colaboradores em um artigo recentemente aceito em uma revista científica [137]. Neste trabalho, os autores descrevem as vantagens e aplicação desta célula como detector eletroquímico. O “*volume morto*” da célula é definido pelo volume restante ocupado pela solução eletrolítica e é significativamente maior do que o “*volume efetivo*”. O “*volume morto*” não tem qualquer efeito na resposta eletroquímica do detector.

A Figura 9 mostra que, a célula eletroquímica pode ser conectada tanto ao sistema de análise por injeção em fluxo por meio da tubulação que transporta a solução transportadora, como ao sistema de análise cromatográfica (após a coluna de separação), por meio de um tubo

de aço inoxidável que transporta a fase móvel, o qual pode ser inserido diretamente no orifício da peça (2) da base da célula pelo tubo de aço inoxidável (3). O controle do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho é feito por meio de um potenciostato (11). A corrente que circula através da célula (resposta do detector) como resultado do processo eletroquímico que está ocorrendo no eletrodo de trabalho é monitorada pelo potenciostato e registrada por um microcomputador (12) através de uma interface por um software de aquisição.

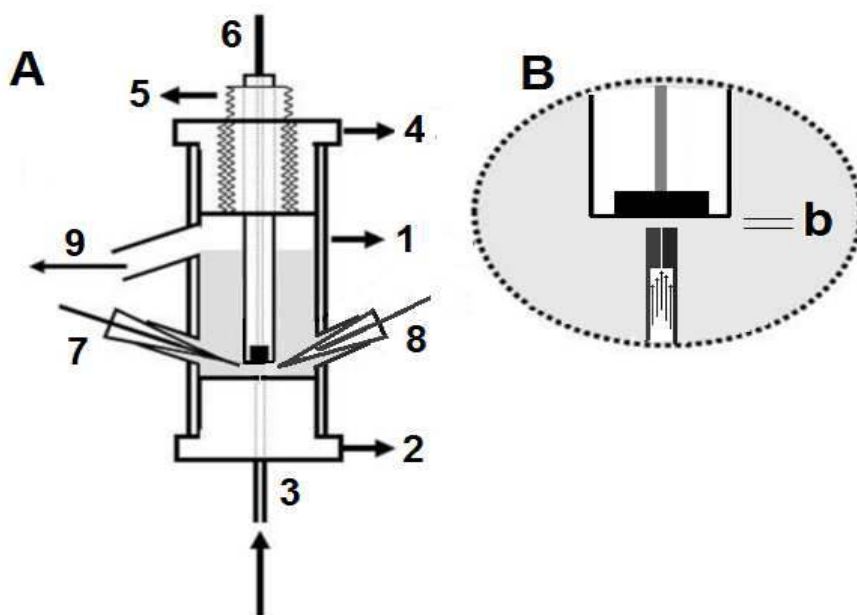


Figura 8: **A)** Célula eletroquímica do tipo “wall jet” usado no trabalho. Tubo de vidro (1) fechado na extremidade inferior por meio de uma peça de teflon (2), com um orifício longitudinal no centro. Saída do jato de solução (3), o qual está posicionado em frente ao centro do eletrodo de trabalho. Peça de teflon (4) com um orifício central longitudinal, dotado de uma rosca interna. O diâmetro deste orifício é ajustado de acordo com o diâmetro externo do tubo de teflon (5). Eletrodos de trabalho (6), auxiliar (7) e referência (8). Saída para descarte (9). **B)** vista ampliada da frente do eletrodo de trabalho e da saída do jato.

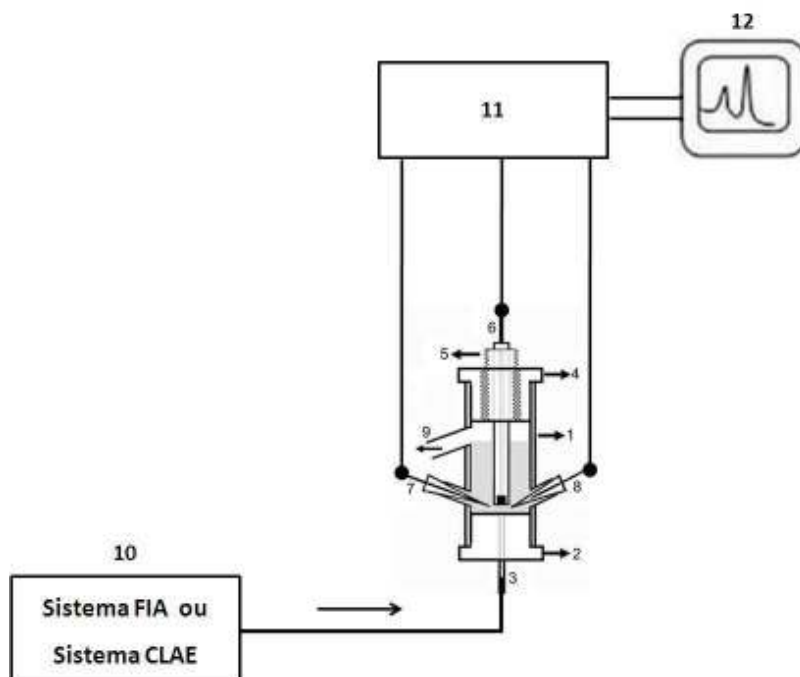


Figura 9: Esquema do sistema FIA ou CLAE em funcionamento com detecção MPA. As partes da célula eletroquímica estão indicadas na Figura 8. Sistema de análise por injeção em fluxo ou sistema de análise cromatográfica (10). Potenciostato (11) e microcomputador (12).

2.2.2 – Sistema FIA

O sistema FIA foi constituído de linha única e composto basicamente por um sistema propulsor, um injetor, um detector eletroquímico e tubos de polietileno com 0,5 e 1,0 mm de diâmetro interno e de 100 cm de comprimento. O esquema do sistema FIA com detecção eletroquímica está apresentada na Figura 10.

O sistema de propulsão foi construído no próprio laboratório, utilizando uma bomba pneumática simples (bomba de aquário), e controlando a vazão pela pressão gerada por meio de uma coluna de água. Como demonstrado pelo doutorando e colaboradores em um trabalho publicado [138], este sistema é eficiente e pode substituir o uso de bombas

peristálticas, as quais são normalmente utilizadas, mas possuem um custo muitas vezes superior ao sistema proposto. Além disso, esse sistema não tem efeitos de pulsação como apresentados pelas bombas peristálticas. A Figura 11 apresenta o esquema da montagem para utilização da pressão gerada por uma coluna de água no controle de vazão em sistemas em fluxo com bombas pneumáticas (bomba de aquário).

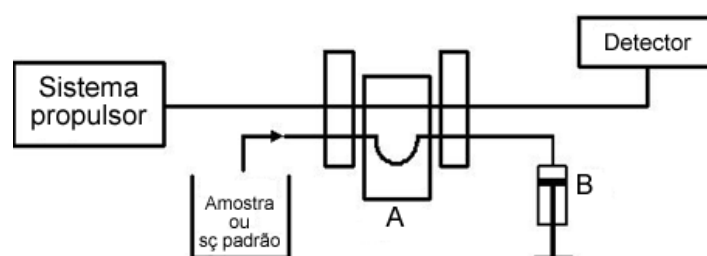


Figura 10: Esquema do sistema FIA utilizado: sistema propulsor (Fig. 11). (A) Injetor comutador de acrílico [139]; (B) Seringa utilizada para preencher a alça de amostragem do sistema; e detector amperométrico (Fig. 9).

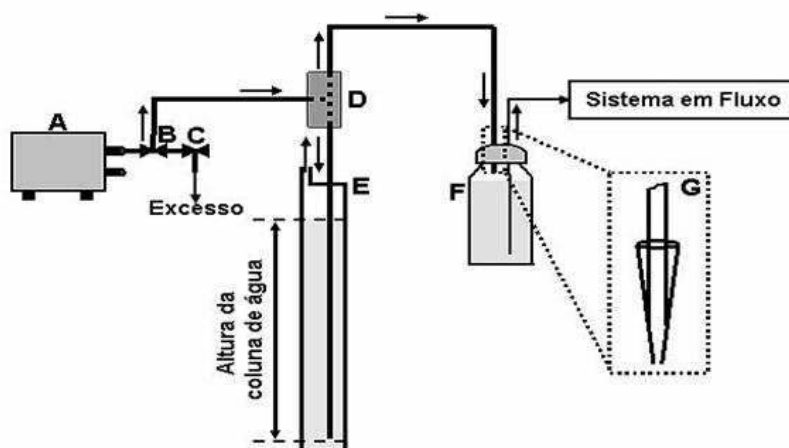


Figura 11: Esquema de montagem da utilização da pressão gerada por uma coluna de água para controle de fluxo de sistemas em fluxo. (A) Mini-compressor de ar; (B, C) Válvulas usadas em aquarismo na divisão e controle de fluxo de ar; (D) Junção de acrílico tipo T; (E) Tubo de PVC – coluna de água; (F) Reservatório do transportador; (G) Vista ampliada da conexão do tubo de polietileno ao reservatório com eletrólito.

2.2.3 – Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando uma coluna de fase reversa C₁₈ (CLC-ODS), 15 cm x 4,6 mm d.i., utilizando-se o equipamento CLAE – Shimadzu – Modelo LC-10AVP, dotado de um detector UV – Modelo SPD-10 AVP, bomba de alta pressão, válvula para gradiente quaternário e sistema injetor manual com alça de amostragem de 20 µL. Na detecção MPA foi acoplado um detector eletroquímico como demonstrado na Figura 8 e 9.

2.3- Estudos do comportamento eletroquímico e da otimização dos parâmetros da detecção amperométrica dos analitos investigados em sistema FIA

2.3.1 - Comportamento eletroquímico do ácido ascórbico (AA), dipirona (DI) e paracetamol (PC)

O comportamento eletroquímico dos analitos de interesse foi estudado por Voltametria Cíclica na faixa de trabalho de -0,6 a 1,0 V vs Ag/AgCl (KCl saturado), sobre eletrodo de ouro e carbono vítreo com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, nos eletrólitos suportes descritos no item 2.1.

2.3.2 - Avaliação do potencial aplicado na detecção por MPA em FIA

Estudos com o intuito de definir os pulsos de potenciais foram realizados em soluções contendo os analitos individualmente e misturados conforme proporções presentes em formulações disponíveis em drogarias e farmácias do mercado brasileiro. Nos estudos da análise simultânea de AA e PC, as concentrações foram de 20,0 e 125,0 mg L⁻¹,

respectivamente. No caso da DI e PC, as concentrações foram de 45,0 e 30,0 mg L⁻¹, respectivamente.

2.3.3 - Avaliação da resposta eletroquímica obtida pela detecção MPA em FIA em função da vazão e em função da alça de amostragem

Estudos para otimização da vazão e da alça de amostragem foram conduzidos com intuito de buscar as melhores condições que proporcionassem alta frequência analítica sem interferir na eficiência da análise simultânea dos compostos analisados. Os estudos da variação da vazão foram realizados mantendo a alça de amostragem constante e vice-versa.

2.3.4 - Avaliação do tempo de aplicação de cada pulso de potencial estabelecido na detecção MPA em FIA dos analitos investigados

Estudos do tempo de aplicação de cada pulso de potencial dos analitos sobre os eletrodos de trabalho foram realizados variando o tempo entre 30 e 400 ms em cada potencial. No caso do PC e DI que apresentavam processos de oxidação e redução foram realizados estudos variando o tempo de aplicação do potencial de oxidação e mantendo o de redução constante em 100 ms e vice-versa.

2.3.5 – Avaliação da determinação de PC na presença de altas concentrações de AA

Os estudos da determinação de PC na presença de altas concentrações de AA foram realizados em meio de ácido sulfúrico 0,10 mol L⁻¹. Nesses estudos fixou-se a concentração de PC em 1,0 mg L⁻¹ variando a concentração de AA de 1,0 a 1000,0 mg L⁻¹. Os potenciais e os tempos de aplicação foram novamente avaliados nessas condições.

2.3.6 - Estudos de repetibilidade e da seletividade nas análises simultâneas de AA/PC e DI/PC em função da concentração de cada analito.

Os estudos de repetibilidade foram realizados por uma série de injeções de soluções padrão contendo ambos os analitos. Na análise simultânea de AA/PC e DI/PC as concentrações foram de 20,0 e 200,0 mg L⁻¹, e 45,0 e 30,0 mg L⁻¹, respectivamente. Os desvios padrões relativos foram calculados em cada análise.

A interferência de cada analito na análise simultânea dos seus pares foi realizada variando a concentração de um dos analitos e mantendo o outro constante. Na análise de AA/PC variou-se primeiramente a concentração de PC entre 5,0 a 200,0 mg L⁻¹ e manteve-se constante a do AA em 5,0 mg L⁻¹, em seguida, variou-se a concentração de AA entre 5 a 1000,0 mg L⁻¹ e manteve-se constante a do PC em 200,0 mg L⁻¹. Na análise de DI/PC, inicialmente, a concentração de DI foi variada de 9,0 a 180,0 mg L⁻¹, mantendo-se a de PC constante em 6,0 mg L⁻¹. Em seguida, a concentração de PC foi alterada de 6 a 120,0 mg L⁻¹, mantendo-se constante a de DI em 9,0 mg L⁻¹. Todas as condições experimentais nestes estudos foram estabelecidas nos itens anteriores.

2.3.7 - Estudos do limite de detecção, de quantificação e recuperação dos analitos em amostras de formulações farmacêuticas.

Estudos de adição e recuperação com os analitos de estudo (AA, PC, DI), em formulações farmacêuticas, foram realizados em amostras adquiridas em drogarias da cidade de Uberlândia-MG. Algumas amostras analisadas continham um único princípio ativo na formulação e outras continham associações de AA/PC ou DI/PC.

Os cálculos foram realizados a partir de dados obtidos de uma curva de calibração obtida de um amperograma com detecção por MPA (injeções em triplicata) para

concentrações padrão (faixa linear) estabelecidas em cada análise simultânea em específico. Na análise simultânea de AA/PC, as concentrações padrão foram de 5,0 a 24,0 mg L⁻¹ de AA e de 50,0 a 240,0 mg L⁻¹ de PC. Na análise simultânea de DI/PC, as concentrações padrão foram de 9,0 a 45,0 mg L⁻¹ de DI e de 6,0 a 30,0 mg L⁻¹ de PC. O limite de detecção (LD) foi calculado multiplicando o desvio padrão do branco por três e dividindo esse valor pelo coeficiente angular da curva de calibração [140]. O limite de quantificação foi obtido multiplicando o LD por 3,33 [140].

2.3.8 - Comparação dos resultados obtidos por FIA com detecção amperométrica com outras métodos de análise.

Os resultados obtidos com o método proposto (FIA com detecção MPA) para análise simultânea de AA e PC foram comparados aos obtidos pelo método descrito por Lau e colaboradores [130], onde os autores propõem a determinação simultânea de AA, PC e cafeína através da voltametria de pulso diferencial sob eletrodo de carbono vítreo.

Os resultados obtidos na análise simultânea de DI e PC foram comparados aos obtidos ora com um método indicado pela farmacopéia, como no caso da determinação da dipirona por titulação iodométrica [88], ora com uma métodos previamente publicada, como no caso da determinação de paracetamol por titulação com solução de Ce⁴⁺ [123]. O método para a determinação simultânea dos dois fármacos por titulometria foi estabelecido da seguinte forma: inicialmente, uma alíquota da amostra foi analisada por titulação iodométrica em meio de tampão acetato (pH 4,7) para a quantificação seletiva de DI na presença de PC. Em seguida, outra alíquota da mesma amostra foi titulada com uma solução padrão de Ce⁴⁺. Nessa etapa, ambos os analitos são oxidados e, pela diferença entre os resultados das duas titulações é possível quantificar PC na amostra. Em ambas as

comparações foi realizado o “*teste F*” [141] para verificação dos desvios padrão entre os métodos avaliados.

2.4 - Estudos da potencialidade da detecção MPA acoplado a sistema CLAE

A otimização dos parâmetros da separação cromatográfica dos analitos investigados foram realizadas utilizando-se fase móvel constituída por acetonitrila e ácido cítrico 0,050 mol L⁻¹ em diversas proporções. As melhores condições de separação e detecção foram estabelecidas por uma eluição isocrática de 20% de acetonitrila e 80% de ácido cítrico 0,05 mol L⁻¹, sob vazão de 1,0 mL min⁻¹. A técnica MPA acoplada a CLAE foi avaliada considerando as seguintes características: comparação da resolução dos analitos em relação ao detector UV, seletividade, repetibilidade, possibilidade de utilização de vários eletrodos e aplicação de 10 pulsos de potenciais na detecção dos analitos após a eluição cromatográfica.

CAPÍTULO 3:

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1- Considerações gerais

Os resultados e discussões deste trabalho serão divididos em três partes. Na primeira e segunda parte serão apresentados os resultados e as discussões sobre a detecção simultânea de AA/PC e DI/PC, respectivamente. Ainda na primeira parte serão abordados os estudos sobre a detecção de PC na presença de altas concentrações de AA. Por fim, a potencialidade do acoplamento da detecção MPA em sistema CLAE será discutida.

3.2- Parte (I): Análise simultânea de ácido ascórbico (AA) e paracetamol (PC) em formulações farmacêuticas em FIA com detecção MPA

3.2.1- Comportamento eletroquímico do AA e PC

O comportamento eletroquímico do AA e PC foi inicialmente investigado por voltametria cíclica em função do pH e da natureza do eletrólito suporte sobre eletrodo de trabalho (E_T) de ouro e carbono vítreo. O desempenho de ambos os eletrodos foi estudado em meio de soluções tampão como ácido cítrico/citrato (pH 3,0), ácido acético/acetato (pH 4,7), dihidrogenofosfato/hidrogenofosfato (pH 7,2) e ácido bórico/borato (pH 9,2). Considerando os resultados obtidos por voltametria cíclica, os tampões acetato e fosfato (ouro ou carbono vítreo como E_T) apresentaram desempenhos satisfatórios em relação à resolução (separação entre os picos de oxidação) e ao sinal eletroquímico para determinação dos dois compostos (AA e PC). A opção pelo conjunto eletrodo de ouro e tampão ácido acético/acetato se deu devido ao parâmetro limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho, que apresentou um melhor desempenho nesta condição (FIA com detecção amperométrica). Na Figura 12 são apresentados os voltamogramas

cíclicos para uma solução tampão ácido acético/acetato sem (a) e com a adição de 1,0 mmol L⁻¹ de AA (b) ou PC (c) usando ouro como eletrodo de trabalho.

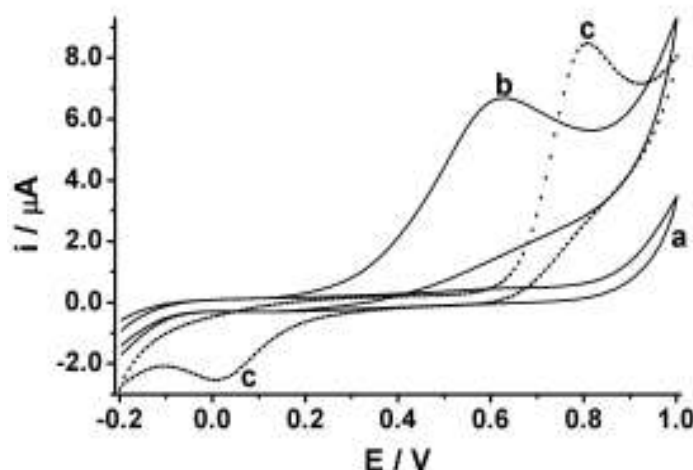


Figura 12: Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução tampão ácido acético/acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH 4,7) sem (a) e com a presença de 1,0 mmol L⁻¹ de AA (b) ou 1,0 mmol L⁻¹ de PC (c). Faixa de trabalho: -0,2 a 1,0 V vs Ag/AgCl(KCl saturado); E_T: Au; Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

Conforme mostra a Figura 12, o AA em meio de tampão ácido acético/acetato (pH 4,7) e usando ouro como eletrodo de trabalho, apresenta um pico de oxidação bem definido em cerca de 0,60 V versus eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl saturado). Este comportamento está de acordo com o relatado na literatura [142], onde o AA é oxidado a ácido dehidroascórbico (ADA) e imediatamente os grupos carbonila do ADA são hidratados, tornando-se eletroquimicamente inativos. Cabe ressaltar que a reação de hidrólise do ADA é muito rápida e o processo redox só é observado quando o potencial de redução é aplicado numa velocidade superior à da reação de hidrólise [142]. O processo de oxidação libera dois elétrons e dois íons hidrogênio. A Figura 13 mostra um esquema das

equações simplificadas que representam as etapas de oxidação (a) e hidratação (b) do AA, respectivamente.

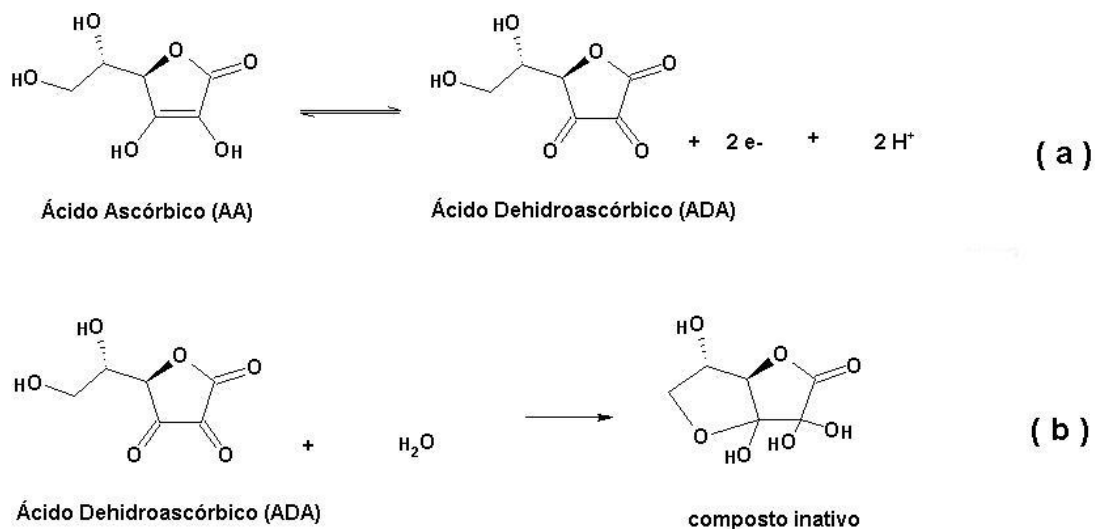


Figura 13: Esquema da reação de oxidação do AA (a) e da reação de hidrólise (b) [142].

Como demonstrado na Figura 12, o PC exibe, em meio de tampão ácido acético/acetato (pH 4,7), um pico de oxidação bem definido em torno de 0,80 V usando eletrodo de trabalho de ouro versus eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl saturado). Entretanto, este processo não é irreversível nesse meio como o processo do AA e, um pico de redução é observado por volta de 0,00 V correspondente a redução da N-acetil-p-benzoquinonaimina (NPBQ) eletroquimicamente gerada na oxidação do PC [143]. A reação redox envolvida entre PC e a NPBQ é demonstrada na Figura 14.

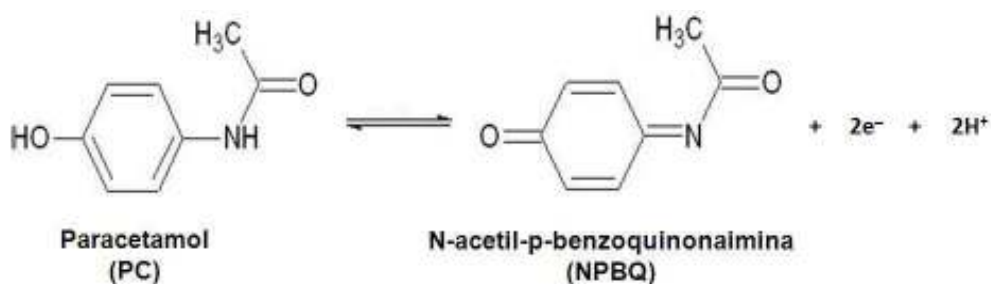


Figura 14: Esquema da equação redox do PC e NPBQ [143].

Pelos esquemas apresentados nas Figuras 13 e 14 verifica-se que o aumento da concentração de íons H^+ no meio dificulta a oxidação, tanto do AA à ADA, quanto para o PC à NPBQ, provocando o deslocamento de ambos os potenciais de pico anódico a valores mais positivos de potencial. Já na redução de NPBQ à PC, o contrário foi observado, pois quando se aumenta a concentração dos íons H^+ , os potenciais de pico catódico deslocam-se para valores menos negativos de potencial.

3.2.2- Investigação dos pulsos de potenciais na análise simultânea de AA e PC em FIA com detecção MPA

Usando o método FIA com detecção amperométrica a potencial constante é possível, em princípio, determinar AA sem interferência de PC fixando um potencial onde ocorre somente a oxidação do AA (+0,40 V). No entanto, o AA é um interferente na análise de PC por amperometria a potencial constante, pois ambas as espécies presentes (AA e PC) são eletroquimicamente oxidadas em potenciais acima de 0,65 V.

Como alternativa para quantificação simultânea de PC e AA, o presente trabalho apresenta o uso da detecção MPA acoplada a FIA com aplicação de uma sequência de

pulsos de potenciais. Primeiramente, a partir das informações obtidas na Figura 12, avaliou-se uma metodologia com a aplicação de uma sequência (cíclica) de três pulsos de potenciais em função do tempo, os quais são apresentados a seguir:

- (1) +0,40V/100ms: oxidação e quantificação seletivamente de AA sem a interferência de PC.
- (2) +0,80V/100ms: oxidação de ambos os analitos (AA e PA) e quantificação de PC por diferença do sinal de corrente medido em +0,40 V.
- (3) +0,00V/100ms: limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de ouro devido à adsorção do produto de oxidação do PC gerado no pulso de potencial anterior (0,8 V/100ms) [29].

A Figura 15 apresenta os resultados obtidos usando a técnica MPA acoplada a FIA com a aplicação dos pulsos de potenciais acima discutidos. O estudo foi realizado em meio de tampão ácido acético/acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH 4,7) sob eletrodo de trabalho de ouro com vazão e alça de amostragem otimizadas em 0,6 mL min⁻¹ e 150 µL, respectivamente. As soluções foram injetadas em triplicata na ordem: AA (25,0 mg L⁻¹); PC (120,0 mg L⁻¹); e mistura de AA e PC nas mesmas concentrações anteriores.

Conforme pode ser observado na Figura 15, no pulso de potencial de +0,80 V observou-se a oxidação de ambos os analitos (AA e PC), mas a diferença esperada entre os picos de corrente nos pulsos de potenciais de +0,80 e +0,40 V não foi satisfatória para quantificar o PC por esse método. Isto pode ser explicado pelo fato do pulso de potencial utilizado na limpeza eletroquímica (0,00 V) não ter sido suficiente para regenerar (promover a limpeza) a superfície do eletrodo. Sendo que, essa possibilidade é confirmada observando o amperograma no potencial de 0,40 V, onde inicialmente era previsto um sinal

seletivo para oxidação de AA, porém, observou-se um sinal de redução da NPBQ, gerado anteriormente na oxidação do PC em +0,80 V.

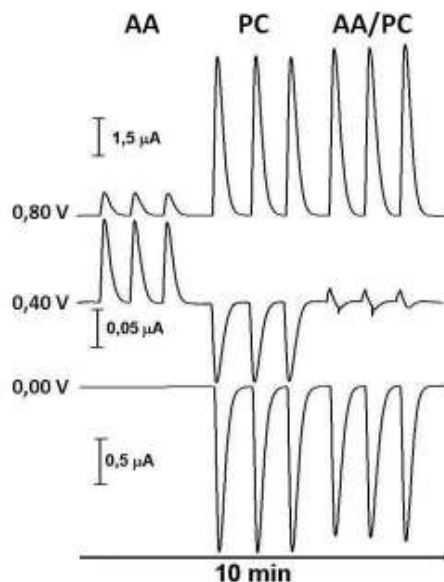


Figura 15: Amperogramas de múltiplos pulsos com a aplicação sucessiva de +0,8 V/100ms (a), +0,4 V/100ms (b) e 0,0 V/100ms (c) em função do tempo. E_T : Au. Injeções em triplicata de soluções contendo AA ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$), PC ($125,0 \text{ mg L}^{-1}$) e uma mistura de AA/PC ($20,0/125,0 \text{ mg L}^{-1}$).

Cabe destacar que na Figura 15, o amperograma obtido no pulso de potencial de 0,0 V, onde inicialmente era prevista a etapa de limpeza da superfície do eletrodo, um sinal de redução significativo para NPBQ sem a interferência de AA pode ser observado. A partir destes resultados, uma sequência de 4 (quatro) pulsos de potenciais em função do tempo passou a ser avaliada com intuito de quantificar diretamente o AA (oxidação) e o PC indiretamente pela redução da NPBQ previamente gerada em um pulso de potencial de

oxidação. Os quatro pulsos de potenciais otimizados em função do tempo foram continuamente aplicados de forma cíclica na seguinte sequência (Figura 16A):

- (1) +0,40V/100ms: o AA é oxidado e quantificado sem a interferência de PC;
- (2) +0,65V/100ms: oxidação de ambas as espécies (AA e PC), onde somente o produto eletroquimicamente gerado a partir do paracetamol (NPBQ) é eletroativo na região catódica. Como pode ser observado na Figura 12, em +0,65 V, a taxa de conversão de PC à NPBQ não é máxima, mas o suficiente para geração de NPBQ e sua detecção em 0,00V. Quando um potencial mais positivo foi selecionado (+0,80 V), o tempo de aplicação do pulso de potencial de limpeza não era suficiente para promover a regeneração da superfície do eletrodo.
- (3) 0,00V/100ms: o produto gerado eletroquimicamente na oxidação do PC é reduzido e PC é quantificado sem a interferência de AA;
- (4) -0,05V/600ms: pulso de potencial usado para completa regeneração (limpeza) da superfície do eletrodo de trabalho de ouro.

A Figura 16B mostra os amperogramas obtidos com os pulsos de potenciais de +0,40 V e 0,00 V com injeção de três soluções de composição diferentes. Os sinais dos amperogramas gerados em +0,65 V e -0,05 V não são mostrados. A primeira solução (Fig. 16Ba) contém somente AA ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$); a segunda (Fig. 16Bb) apenas PC ($125,0 \text{ mg L}^{-1}$); e a terceira (Fig. 16Bc) ambos os analitos com as respectivas concentrações anteriores. Como pode ser visto na Figura 16B, no pulso de potencial de +0,40 V somente há uma oxidação eletroquímica quando o AA está presente em solução. Por outro lado, no pulso de potencial de 0,00 V, somente ocorre uma redução eletroquímica quando PC está presente em solução. Neste caso, o PC é previamente oxidado a NPBQ no pulso de potencial de

+0,65 V. Quando a solução contendo ambos os analitos foi injetada (Fig. 16Bc), praticamente nenhuma diferença no sinal eletroquímico foi observado em comparação com os sinais das soluções contendo os analitos separadamente. Dessa maneira, é possível quantificar simultaneamente AA e PC com a sequência de pulsos apresentados.

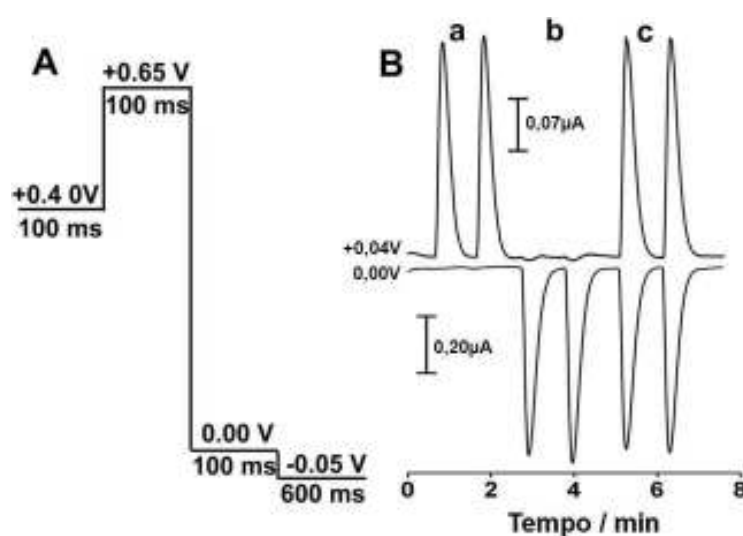


Figura 16: A) Escada de pulsos de potenciais aplicados sob eletrodo de trabalho de ouro em função do tempo. B) Amperogramas obtidos pela detecção MPA em FIA com injeções em duplicata de soluções contendo: (a) 20,0 mg L⁻¹ de AA; (b) 125,0 mg L⁻¹ de PC; (c) ambos os analitos com mesmas concentrações anteriores. Vazão: 0,6 mL min⁻¹. Alça de amostragem: 150 μL. Os amperogramas obtidos em +0,65V e -0,05V não são mostrados.

3.2.3- Variação da vazão no sistema FIA na detecção simultânea de AA e PC

O aumento da vazão do sistema, como já abordado na introdução deste trabalho, aumenta até certo ponto a magnitude do sinal na detecção dos analitos. Como a análise simultânea proposta por este trabalho realiza ao mesmo tempo a detecção direta e indireta dos analitos, os dois efeitos foram avaliados concomitantemente para a detecção dos dois

analitos com aplicação dos pulsos de potenciais otimizados no item anterior (mantendo as demais variáveis do sistema constante). As melhores condições foram obtidas em uma vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ para análise simultânea de AA e PC, como apresentado na Figura 17, pois nessa vazão a magnitude de corrente do NPBQ (●), gerado pela oxidação do PC, é máxima e, a do AA (□) é satisfatória para sua quantificação.

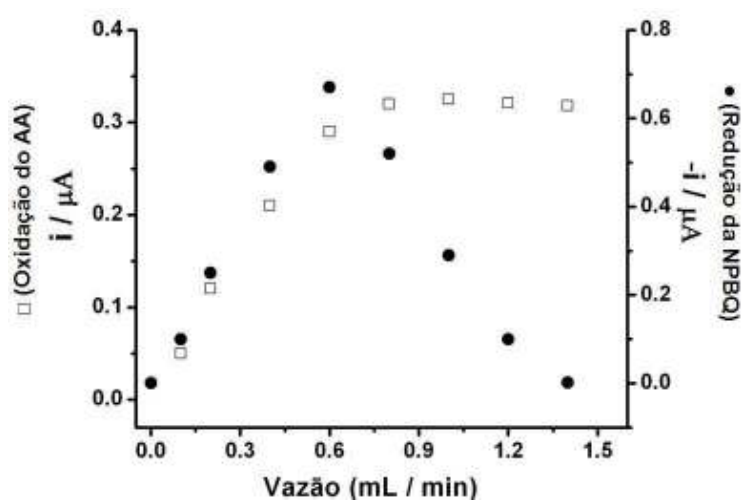


Figura 17: Magnitude da média ($n=3$) dos sinais de corrente em função da vazão da solução transportadora (tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$). Os valores do eixo da coordenada a esquerda refere-se à oxidação de (□) AA $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ e os da direita para redução de (●) NPBQ gerada pela oxidação de PC $125,0 \text{ mg L}^{-1}$. E_T : Au. Os pulsos de potenciais aplicados são os mesmos apresentados na Figura 16. Alça de amostragem de $150 \mu\text{L}$ em todas as análises. Diâmetro interno da tubulação de $0,5 \text{ mm}$.

3.2.4- Avaliação da alça de amostragem na análise simultânea de AA e PC

Como já mencionado na introdução, a detecção amperométrica em sistema FIA utiliza-se comumente a altura do pico como medida analítica, a qual é proporcional com o aumento do volume da alça de amostragem, mas atinge um limite máximo e constante após certo volume. Este comportamento é observado na Figura 18 na determinação de AA e PC utilizando as condições experimentais estabelecida nos itens anteriores.

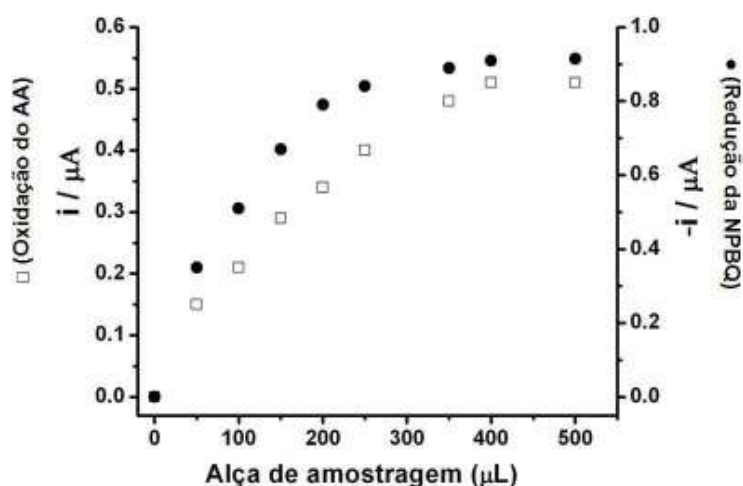


Figura 18: Magnitude da média ($n=3$) dos sinais de corrente em função do volume da alça de amostragem com soluções injetadas em triplicata de AA (□) ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$) e PC (●) ($125,0 \text{ mg L}^{-1}$). Os valores do eixo da coordenada a esquerda refere-se à oxidação de AA e os da direita para redução de NPBQ gerada pela oxidação de PC. E_T : Au. Os pulsos de potenciais aplicados são os mesmos apresentados na Figura 16. Vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. Diâmetro interno da tubulação de $0,5 \text{ mm}$.

Pelo fato das análises propostas neste trabalho serem efetuadas em amostras farmacêuticas, onde os analitos investigados estão em altas concentrações, a otimização desse parâmetro foi avaliada somente com intuito de buscar as melhores condições que proporcionassem alta frequência analítica sem interferir na eficiência da análise simultânea dos compostos analisados. Assim, a alça de amostragem que ofereceu as melhores condições para a determinação simultânea de AA e PC foi a de 150 μ L. Deve-se ressaltar que, em alças de amostragem maiores do que 150 μ L, a limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho de ouro fica comprometida.

3.2.5- Avaliação de interferentes na análise simultânea de AA e PC

Em um trabalho publicado anteriormente, Mark e colaboradores reportaram algumas considerações sobre a determinação de catecol na presença de AA usando eletrodos duplos posicionados em série [144]. Neste trabalho, os autores demonstraram que existe um desvio significativo do comportamento ideal na curva de calibração catódica quando o catecol é quantificado pela redução do dehidrocatecol (eletroquimicamente gerado no primeiro eletrodo). Segundo este trabalho, o fenômeno ocorre devido à reação química entre: dehidrocatecol (gerado eletroquimicamente) e o AA presente na solução. Ambos os compostos (catecol e paracetamol) apresentam comportamento eletroquímico semelhante (compostos fenólicos). Assim, após alguns experimentos com a técnica MPA em FIA, foi verificado que este fenômeno também ocorre quando se deseja quantificar o PC pela redução da NPBQ eletroquimicamente gerada na presença de AA. A Figura 19 mostra o esquema da reação de oxi-redução entre o NPBQ e o AA na superfície do eletrodo.

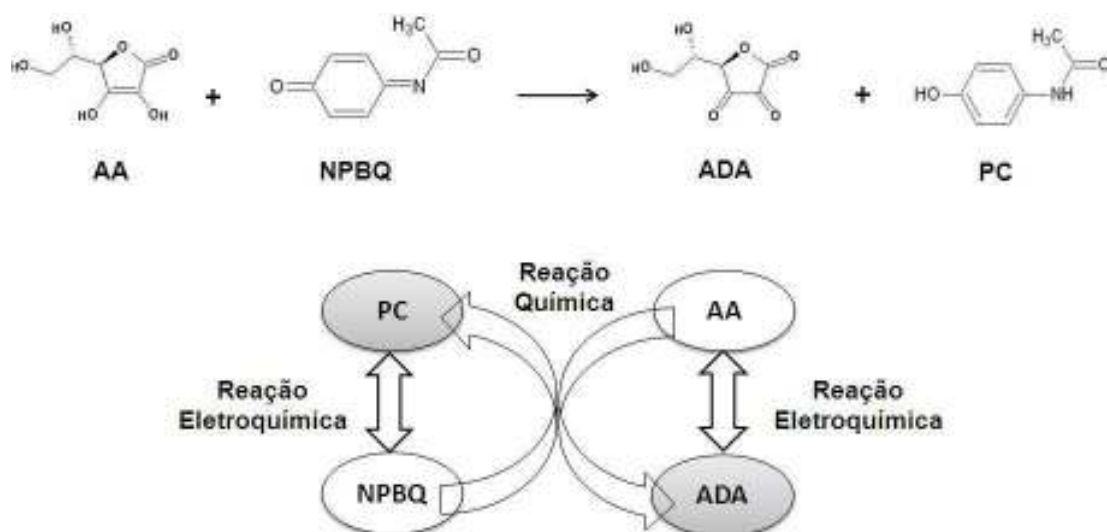


Figura 19: Esquema das reações eletroquímicas dos pares AA/ADA e PC/NPBQ e da reação química entre AA e NPBQ.

Devido ao efeito da reação química entre o AA e a NPBQ eletroquimicamente gerada, estudos foram conduzidos com o intuito de identificar o nível de interferência no sinal de redução da NPBQ em função do aumento da concentração de AA. Esses estudos foram realizados baseados nas concentrações encontradas em formulações farmacêuticas que contém esses analitos no mercado brasileiro (40 e 500 mg de AA e PC, respectivamente). A Figura 20 mostra os amperogramas obtidos das soluções injetadas em triplicata contendo PC (200,0 mg L⁻¹), com exceção da primeira solução, e incrementos de concentração de AA (a e b: 5,0, c: 10,0, d: 15,0, e: 20,0, f: 24,0, e g: 50,0 mg L⁻¹).

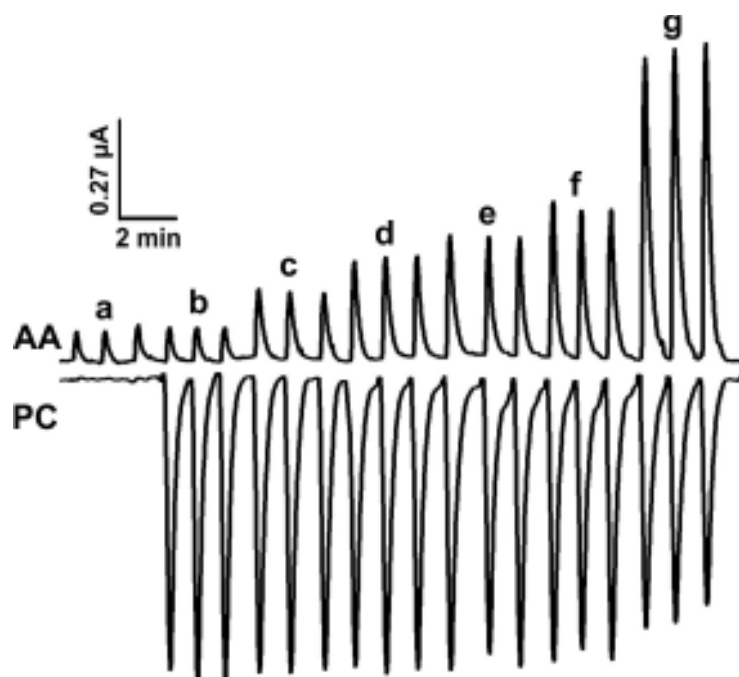


Figura 20: Resposta da detecção MPA em FIA obtidas das soluções injetadas em triplicata contendo concentrações crescentes de AA (a e b: 5,0 c: 10,0 d: 15,0 e: 20,0 f: 24,0 g: 50,0 mg L⁻¹) e constante de PC (200 mg L⁻¹) em todas soluções, exceto em (a). Pulsos de potenciais aplicados: +0,40 V para oxidação do AA e 0,00 V para redução da NPBQ gerada eletroquimicamente em +0,65 V (oxidação do PC). Todos os pulsos de potenciais foram aplicados durante 100 ms, com exceção do pulso de potencial de limpeza: -0,05 V por 600 ms. Os amperogramas obtidos em +0,65V e -0,05V não são mostrados. Vazão: 0,6 mL min⁻¹. Alça de amostragem: 150 μL. E_T: Au.

Duas conclusões podem ser obtidas pelos resultados apresentados na Figura 20. A primeira é que as soluções do AA (5,0 mg L⁻¹) sem (a) e com a presença de PC (200,0 mg L⁻¹) em (b) forneceram a mesma magnitude de sinal para oxidação do AA. Isto demonstra, como era esperado, que o PC não oferece interferência nessa concentração para análise de AA através da detecção MPA em FIA no pulso de potencial em +0,40 V. Deve-se destacar

que, as formulações farmacêuticas avaliadas contendo AA e PC possuem cerca de 12 vezes mais de PC em relação a AA, e como foi observado pela Figura 20, mesmo quando a concentração de PC está 20 vezes superior a AA não há interferência no sinal de oxidação do AA (Fig. 20a e 20b). A segunda conclusão refere-se à variação do sinal de redução da NPBQ (gerada pela oxidação das soluções contendo PC em +0,65 V), que na presença de concentrações de AA inferiores a 20,0 mg L⁻¹ (e) não sofre alterações significativas. No entanto, na presença de concentrações de AA superiores a 50,0 mg L⁻¹ (g), uma perda considerável no sinal de redução da NPBQ pode ser observado. Dessa forma, a análise simultânea destes compostos com o método proposto somente é possível quando a concentração de PC é pelo menos cinco vezes maior do que a de AA ou quando se conhece a % de erro, fazendo a correção do valor obtido.

3.2.6- Investigação dos parâmetros analíticos na análise simultânea de AA e PC

Devido às proporções entre PC e AA nas formulações farmacêuticas avaliadas serem consideravelmente diferentes das que provocam as interferências na análise simultânea desses compostos, a curva analítica foi implementada para quantificar ambos analitos (AA e PC) nesta amostra.

Dessa forma foi estudada uma curva de calibração das soluções padrão contendo AA e PC com a mesma proporção em todas as soluções (PC 10 vezes mais concentrado do que AA). Quando a relação entre AA e PC é mantida constante nas soluções padrão, o comportamento ideal na calibração catódica para determinação indireta de PC é obtido (0,00 V), bem como para detecção direta de AA em +0,40 V por FIA com detecção amperométrica. A Figura 21 apresenta as respostas usando o método proposto para injeções

de 150 μL de soluções (em triplicata) contendo, simultaneamente, concentrações crescentes de AA (a-e: 5,0 à 24,0 mg L^{-1}) e PC (a-e: 50,0 à 240,0 mg L^{-1}). Além disto, sinais transientes de uma solução amostra (em triplicata) contendo os dois analitos são mostrados em (f). A Figura 21 apresenta também (ao lado) as curvas de calibração obtidas para ambos os analitos, demonstrando a proporcionalidade entre a corrente amperométrica e as concentrações das soluções padrão dos analitos.

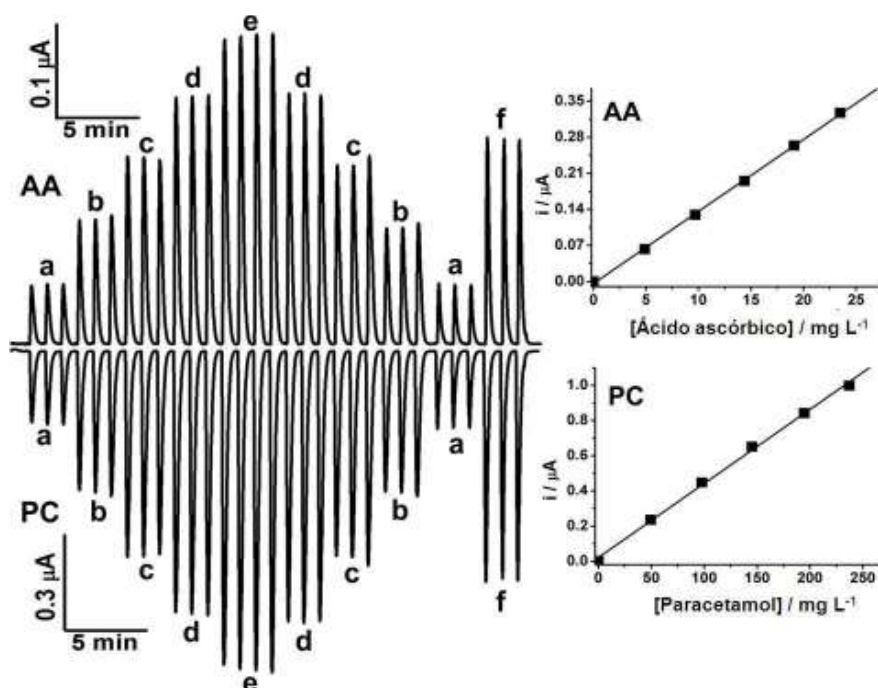


Figura 21: Resposta da detecção MPA acoplada a FIA após injeções de soluções contendo simultaneamente AA (a-e: 5,0 à 24,0 mg L^{-1}) e PC (a-e: 50,0 à 240,0 mg L^{-1}). (f) solução amostra. E_T : Au. A direita são apresentadas as curvas de calibração para ambos os analitos. Pulsos de potenciais aplicados: +0,40 V para oxidação do AA e 0,00 V para redução da NPBQ gerada eletroquimicamente em +0,65 V (oxidação do PC). Todos os pulsos de potenciais foram aplicados durante 100 ms, com exceção do pulso de potencial de limpeza: -0,05 V por 600 ms. Os amperogramas obtidos em +0,65V e -0,05V não são mostrados. As condições experimentais são as mesmas da Figura 16.

Através das curvas de calibração apresentadas na Figura 21 foram obtidos excelentes coeficientes de correlação linear ($R = 0,999 \pm 0,018$ para PC e $R = 0,999 \pm 0,003$ para AA). As equações das regressões lineares são apresentadas abaixo:

$$\mu A = 0,0208 (\pm 0,01) + 0,0042 (\pm 1,0 \times 10^{-4}) \text{ mg L}^{-1} \quad (\text{PC})$$

$$\mu A = -0,0388 (\pm 0,01) + 0,0140 (\pm 2,0 \times 10^{-4}) \text{ mg L}^{-1} \quad (\text{AA})$$

A investigação da estabilidade do sinal analítico na análise simultânea de AA e PC foi realizada através de uma série de injeções sucessivas de uma solução contendo a amostra com concentrações conhecidas (após análise prévia). A Figura 22 apresenta os amperogramas das alíquotas de amostras injetadas contendo $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AA e $200,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PC. Os resultados obtidos por este estudo demonstram que a repetibilidade do sinal foi mantida, comprovando que o método proposto para análise simultânea de AA e PC oferece uma boa performance em relação à estabilidade do sinal eletroquímico dos analitos. Isto pode ser comprovado pelos baixos desvios padrão relativo obtidos, os quais foram calculados para as 15 medidas realizadas, sendo de 0,59 % para o AA e de 1,11% para o PC. Estes resultados somente foram obtidos devido ao uso do pulso de potencial de limpeza ($-0,05 \text{ V} / 600\text{ms}$) para uma constante regeneração (limpeza) da superfície do eletrodo de trabalho de ouro.

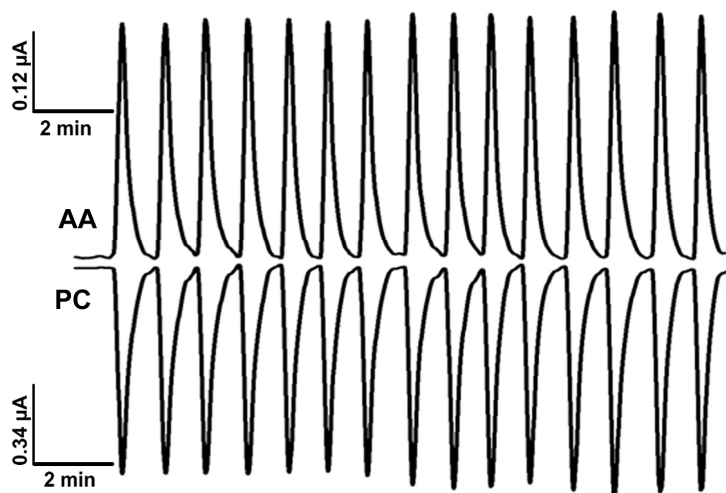


Figura 22: Resposta da detecção MPA acoplada a FIA de 15 injeções consecutivas de soluções contendo simultaneamente AA e PC (20,0 e 200,0 mg L⁻¹, respectivamente). DPR = 0,59 % para AA e 1,11 % para PC. E_T: Au. Pulsos de potenciais aplicados: +0,40 V para oxidação do AA e 0,00 V para redução da NPBQ gerada eletroquimicamente em +0,65 V (oxidação do PC). Todos os pulsos de potenciais foram aplicados durante 100 ms, com exceção do pulso de potencial de limpeza: -0,05 V por 600 ms. Os amperogramas obtidos em +0,65 V e -0,05 V não são mostrados. As condições experimentais são as mesmas da Figura 16.

O método desenvolvido para análise simultânea de AA e PC foi testado com a análise de seis formulações farmacêuticas comerciais. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para análises dessas amostras. Esta tabela contém a quantidade nominal dos analitos e as médias e desvios padrão obtidas de três determinações em cada amostra pela técnica MPA acoplada a FIA. A Tabela 4 também apresenta os resultados obtidos por um segundo método de análise, previamente proposto na literatura por voltametria de pulso diferencial [130], o qual foi utilizado na comparação dos resultados.

O teste *F* foi utilizado com objetivo de avaliar a precisão entre os dois métodos. Os valores calculados indicam que não há diferença significativa entre os desvios padrão dos dois métodos com nível de significância de 5%. Estudos de adição/recuperação também foram conduzidos nas amostras investigadas, proporcionando recuperações em torno de 100 % para todas as análises realizadas.

Tabela 4: Resultados obtidos na análise de AA e PC em formulações farmacêuticas.

Amostra	Princípio Ativo	Valor rotulado mg/comprimido	Voltametria de pulso diferencial mg/comprimido	MPA em FIA mg/comprimido
1	PC	500	502 ± 15	498 ± 5
2	PC	500	436 ± 17	442 ± 6
3	AA	1000	982 ± 20	982 ± 10
4	AA	1000	1013 ± 28	1016 ± 12
5	PC	500	533 ± 13	521 ± 7
	AA	40	47,2 ± 0,9	48,1 ± 0,6
6	PC	500	515 ± 10	504 ± 7
	AA	40	39,5 ± 1,0	45,0 ± 0,8

Desvio padrão: n = 3; Voltametria de pulso diferencial [130]

3.3- Estudos da determinação indireta de PC na presença de altas concentrações de AA

Em amostras com a presença de concentrações mais elevadas de AA, o PC não pode ser quantificado usando as condições estabelecidas no item anterior. No entanto, estudos utilizando o método de adição de padrão (com concentração de AA constante) demonstraram que há possibilidade de determinar PC por FIA com detecção por MPA. Para

alcançar esse objetivo, algumas modificações foram necessárias em relação à otimização da escada de pulsos de potenciais utilizada anteriormente na detecção simultânea de AA e PC.

Após investigações de otimização, o pulso de potencial onde a NPBQ é gerada foi alterado de +0,65 V/ 100 ms para +0,80 V/ 300 ms. Neste potencial, a taxa de conversão de PC à NPBQ é máxima, como pode ser observado nos resultados apresentados na Figura 12 (pag. 47). Outra mudança foi no tempo de aplicação dos pulsos de potenciais, tanto na região anódica (de 100 para 300 ms), como na região catódica (de 100 para 30 ms). As mudanças no tempo de aplicação dos pulsos de potenciais também contribuíram para o aumento do sinal de corrente de pico catódico. O aumento no tempo de aplicação do pulso de potencial de oxidação contribui no aumento da corrente catódica devido à adsorção da NPBQ na superfície do eletrodo durante esta etapa. A diminuição do tempo de aplicação do pulso de potencial de redução contribui para o aumento da corrente catódica devido ao fato de se tratar do pulso de potencial coletor. Quanto mais rápida a aquisição, maior é a quantidade de material ainda presente na interface eletrodo solução.

No entanto, a análise simultânea não foi possível nessas condições (concentração de AA fora da faixa linear) e a repetibilidade do sinal diminuiu significativamente em relação aos resultados apresentados na Figura 22 (pag. 62), obtendo desvios padrões relativos acima de 10% para 15 injeções consecutivas de AA e PC (amostras contendo até 10 vezes mais de AA). Além disto, o limite de detecção para o PC, nessas condições, não foi satisfatório. Isso porque, mesmo aumentando a quantidade de NPBQ gerada, o AA presente em altas concentrações ainda consumia significativamente a espécie gerada a partir do PC.

Segundo a literatura, o uso de um meio ácido (como ácido sulfúrico 0,10 mol L⁻¹) [144] ou mesmo a adição de um nucleófilo à solução tampão [71, 145] podem minimizar a

reação entre o AA e o produto gerado a partir da oxidação do catecol ou dopamina. Em soluções ácidas, como relatam os autores, o desvio negativo não é observado devido à cinética da reação entre o AA e o produto gerado a partir do catecol ser muito lenta nesse meio. Como já mencionado, o catecol apresenta um comportamento eletroquímico semelhante ao PC. Dessa forma, avaliando as alternativas disponíveis para análise de PC em altas concentrações de AA, a mais simples, acessível e de custo reduzido foi a utilização de um meio ácido como H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 23 mostra a resposta da detecção MPA em FIA (em meio de H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e nas novas condições de pulsos de potenciais estabelecidas) das injeções em triplicata de soluções padrão de PC (a-f: $100,0$ a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$) na presença de $176,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AA em todas as soluções. A Figura 24 apresenta a curva de calibração obtida a partir da magnitude de corrente de redução da NPBQ obtidas da Figura 23 na detecção indireta de PC.

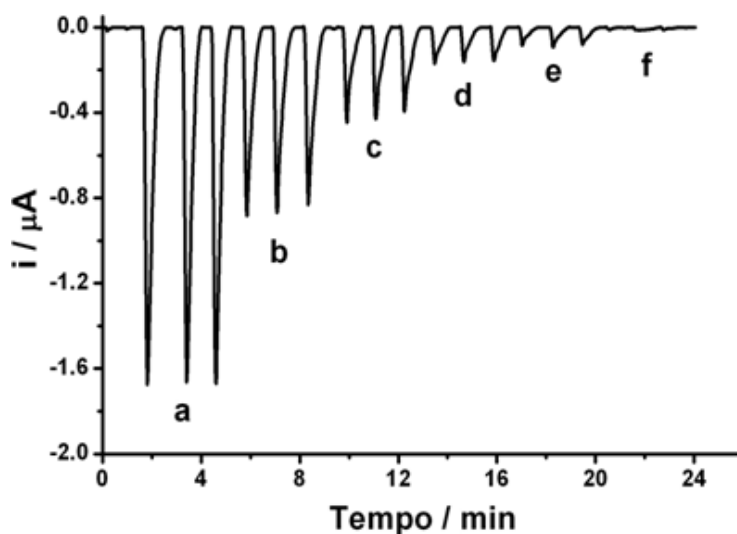


Figura 23: Resposta da detecção MPA em FIA das soluções padrão (em triplicata) de PC (a: 100,0; b: 50,0; c: 25,0; d: 10,0; e: 5,0 e f: 1,0 mg L⁻¹) contendo 176,0 mg L⁻¹ de AA. Pulsos de potenciais aplicados: 0,00 V/30 ms para redução da NPBQ gerada eletroquimicamente em 0,80 V/300 ms (oxidação do PC) e -0,05 V/600 ms para limpeza do eletrodo de trabalho de ouro..Os amperogramas obtidos em +0,80V e -0,05V não são mostrados. Solução transportadora: H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹; Vazão: 0,6 mL min⁻¹. Alça de amostragem: 150 μL.

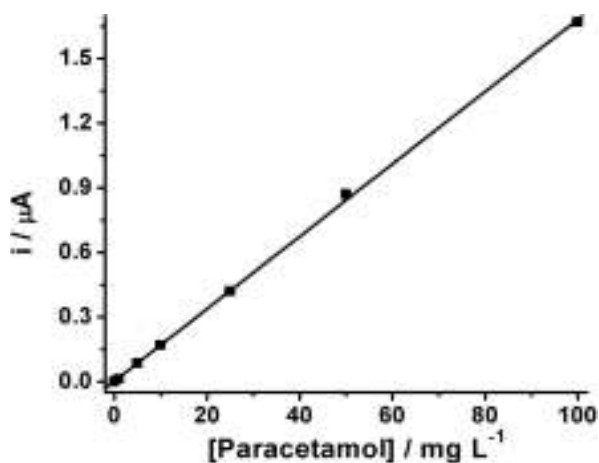


Figura 24: Curva de calibração obtida a partir de dados da Figura 23.

A curva de calibração na Figura 24 apresenta um comportamento linear com excelente coeficiente de correlação ($R = 0,999 \pm 0,019$). A equação de regressão linear para análise do PC na presença de excesso de AA é dado por:

$$\mu A = 0,0065 (\pm 0,1) + 0,0187 (\pm 3,0 \times 10^{-4}) \text{ mg L}^{-1}$$

Usando o método de adição padrão, nas condições apresentadas na Figura 23, é possível detectar PC em níveis de traço com limite de detecção de $0,20 \text{ mg L}^{-1}$ na presença de 880 vezes mais de AA. O desvio padrão relativo obtido das 15 injeções consecutivas foi menor que 1,0 % em amostras contendo até 10 vezes mais de AA do que PC. Os estudos de recuperação foram próximos a 100%. Por outro lado, a análise simultânea, não foi possível em meio de H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ devido à baixa resposta amperométrica de AA e a sobreposição quase que completa entre os picos de oxidação do AA e do PC nesse eletrólito. Deste modo, os resultados demonstraram que é possível determinar o PC na presença de altas concentrações de AA, podendo ser aplicada em amostras de interesse biológico. Os resultados apresentados no item 3.2 e 3.3 foram publicados recentemente pelo doutorando e colaboradores [146].

3.4- Parte (II): Análise simultânea de dipirona (DI) e paracetamol (PC) por FIA com detecção amperométrica de múltiplos pulsos (MPA).

3.4.1- Comportamento eletroquímico da DI e PC

Estudos preliminares com o intuito de investigar o comportamento eletroquímico de DI e PC foram realizados usando carbono vítreo e ouro como eletrodos de trabalho pela técnica de voltametria cíclica. Da mesma forma apresentada na análise de AA e PC, o desempenho de ambos os eletrodos foi estudado em meio de soluções tampão como: citrato (pH 3,0), acetato (pH 4,7), fosfato (pH 7,2) e borato (pH 9,2). As melhores condições, em relação à resolução, resposta eletroquímica e reprodutibilidade na detecção simultânea de DI e PC em FIA foram obtidas em meio de tampão ácido acético/acetato (pH 4,7) sob eletrodo de carbono vítreo. Na Figura 1 são apresentados os voltamogramas cíclicos de uma solução tampão ácido acético/acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (a) sem e com a adição de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de (b) DI e (c) PC.

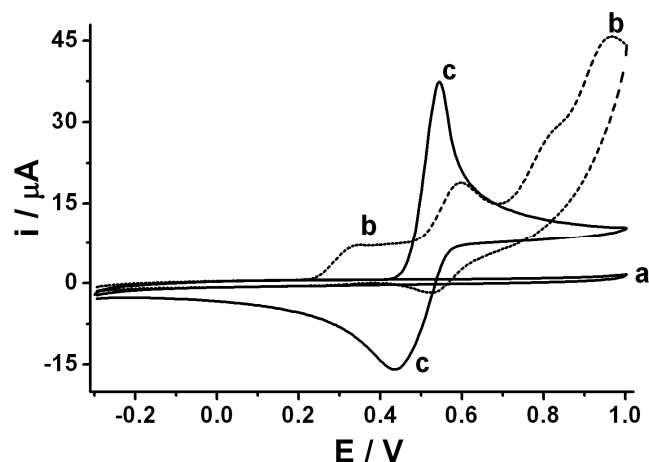


Figura 25: Voltamogramas cíclicos obtidos sob eletrodo de carbono vítreo de uma solução tampão ácido acético/acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7) sem (a) e na presença de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DI (b) e de PC (c). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

A Figura 25 mostra que nesse meio a DI apresenta um comportamento eletroquímico com quatro processos de oxidação, semelhante ao descrito anteriormente por Cavalheiro e colaboradores [92]. O primeiro pico de oxidação ocorre em $0,33 \text{ V}$, o segundo em $+0,60 \text{ V}$, o terceiro em $+0,81 \text{ V}$ e, o quarto em $0,96 \text{ V}$. Como pode ser observado, um dos produtos de oxidação da DI é reduzido em torno de $0,58 \text{ V}$. Segundo os autores, o primeiro processo de oxidação da DI é devido ao grupo metanossulfato presente na sua estrutura, sendo um processo irreversível com a liberação de dois elétrons, um íon H^+ , um ânion sulfato e um molécula de formaldeído. As demais reações eletroquímicas da DI, salvo engano, ainda não foram relatadas na literatura. A Figura 26 mostra um esquema da equação simplificada que representa a primeira etapa de oxidação da DI.

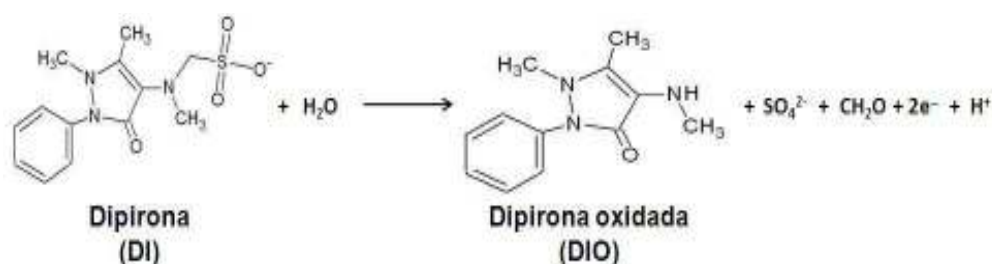


Figura 26: Esquema da primeira etapa de reação de oxidação eletroquímica da DI [92].

O PC, por sua vez, demonstrou um comportamento reversível em meio de tampão ácido acético/acetato e carbono vítreo como eletrodo de trabalho, com um pico de oxidação em +0,54 V e de redução do produto gerado, o N-acetil-p-benzoquinonaimina (NPBQ), em +0,44 V [147]. A reação redox envolvida entre PC e NPBQ foi demonstrada na Figura 14 (item 3.2.1). O aumento do pH do meio favorece, tanto a oxidação da DI quanto do PC, provocando o deslocamento de ambos os potenciais de pico anódico a valores mais positivos de potencial. O resultado obtido com eletrodo de carbono vítreo em tampão ácido acético/acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 25) proporcionou uma boa resolução (cerca 0,20 V) entre o primeiro pico de oxidação da DI e o pico de oxidação do PC. Além disto, o processo de redução da NPBQ é significativamente mais sensível que o processo de redução do produto de oxidação da DI. A partir dessas condições, estudos iniciais foram conduzidos para determinação simultânea de DI e PC em FIA com detecção MPA.

3.4.2- Investigação dos pulsos de potenciais na análise simultânea de DI e PC em FIA com detecção MPA

Usando o método FIA com detecção amperométrica à potencial constante é possível determinar DI sem interferência de PC fixando um potencial onde ocorre somente a oxidação da DI, por exemplo, em +0,40 V. No entanto, na análise de PC por esse método, a DI é um interferente. O sistema FIA com detecção MPA pode ser também utilizado para análise simultânea de DI e PC. Assim como para análise simultânea de AA e PC, a proposta é determinar seletivamente DI através de sua oxidação e indiretamente o PC através da redução da NPBQ. Os seguintes pulsos de potenciais foram otimizados (definidos após estudos prévios):

- (1) 0,40 V/100 ms: oxidação e quantificação direta de DI sem a interferência de PC;
- (2) 0,65 V/100 ms: oxidação de ambos os analitos;
- (3) 0,00 V/200 ms: quantificação indireta do PC pela redução da NPBQ;
- (4) -0,05 V/400 ms: limpeza eletroquímica do eletrodo. O esquema da aplicação desses pulsos está apresentado na Figura 27A.

Na determinação de DI, o pulso de potencial aplicado (+0,40 V) durante 100 ms foi adequado para sua quantificação sem interferência do PC. O segundo pulso de potencial (+0,65V) foi aplicado apenas para gerar eletroquimicamente a NPBQ que, posteriormente, é detectada na região catódica (sinal usado para quantificação de PC).

No terceiro pulso de potencial (0,00 V), como pode ser verificado na Figura 27B, tanto o produto de oxidação da DI (▲) como do PC (●) são eletroquimicamente reduzidos. No entanto, a corrente catódica gerada a partir do produto de oxidação da DI possui menor magnitude. Pode ser observado também, que a corrente de redução de ambos os compostos

diminui à medida que o tempo de aplicação do pulso de potencial for aumentando. A queda da corrente em função do aumento do tempo de aplicação do pulso de potencial tem origem na diminuição gradativa (até esgotamento) da concentração das espécies (NPBQ e DIO) na proximidade da superfície do eletrodo (camada estagnada de Nernst). Isto ocorre basicamente devido a três fatores: redução eletroquímica, convecção (análise em fluxo) e difusão por concentração. O artifício utilizado para a detecção seletiva de PC neste pulso de potencial (0,00 V) foi a aquisição do sinal de corrente após 200 ms a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. Conforme pode ser observado na Figura 27B, a corrente do produto de oxidação da DI, após este tempo, cai a zero e o sinal de corrente da redução da NPBQ pode então ser adquirido sem interferência do produto de oxidação da DI. Vale lembrar que este tempo de aquisição de corrente foi otimizado usando as soluções de maior concentração da curva analítica. Outro ponto a ser considerado é de que este tempo de aquisição é dependente da vazão, quanto maior a vazão, menor pode ser o tempo de aquisição e vice-versa.

Um quarto pulso de potencial necessita ser usado (-0,05V/400 ms) para a remoção total da NPBQ adsorvida no eletrodo (limpeza), cuja adsorção interferiria no sinal de oxidação da DI (sinal usado para sua detecção) e na repetibilidade dos resultados.

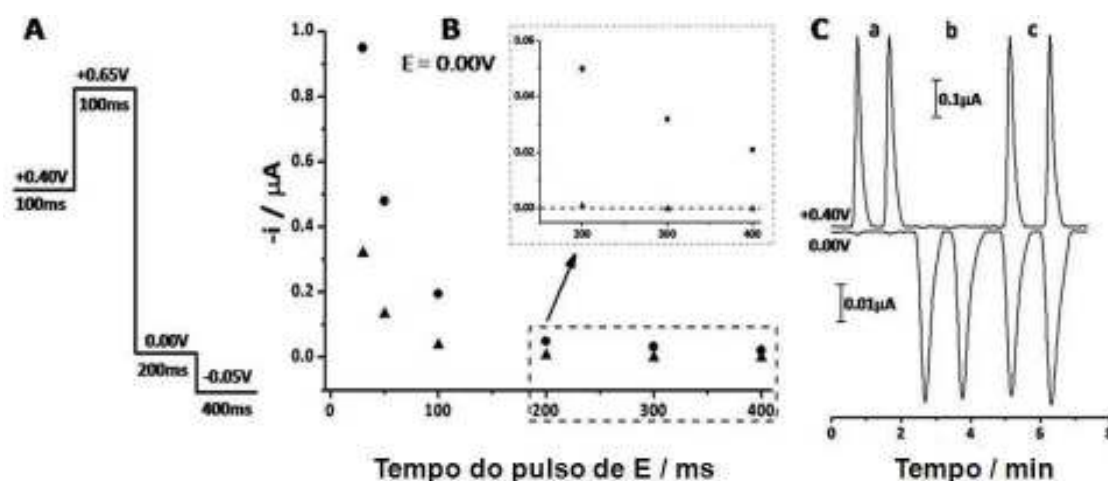


Figura 27: A) Esquema da aplicação dos pulsos de potenciais na detecção simultânea de DI e PC por MPA acoplada a FIA. B) Resposta amperométrica da redução de NPBQ (●) e do produto da oxidação da DI (▲) em função do tempo de aplicação do pulso de potencial de 0,00V. C) Sinais transientes obtidos de injeções em duplicata de soluções padrão contendo 45,0 mg L⁻¹ de DI (a); 30,0 mg L⁻¹ de PC (b) e uma mistura (45,0:30,0 mg L⁻¹) de DI e PC (c), respectivamente. Os amperogramas obtidos em +0,65V e -0,05V não são apresentados. Solução transportadora: tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH = 4,7). Vazão: 1,5 mL min⁻¹; Volume injetado: 150 μ L; E_T : carbono vítreo.

A Figura 27C mostra os amperogramas obtidos em +0,40V e 0,00V das injeções em duplicata de três soluções com composições diferentes. Os sinais amperométricos gerados em +0,65V e -0,05V não são apresentados. Na primeira injeção (Fig. 27Ca), a solução contém somente DI (45,0 mg L⁻¹), na segunda (Fig. 27Cb), apenas PC (30,0 mg L⁻¹) e na terceira (Figura 27Cc), ambos os analitos com as mesmas concentrações das soluções anteriores. Conforme pode ser observado na Figura 27C, em +0,40V, apenas DI é detectada e, em 0,00V, somente o PC é detectado, pela redução eletroquímica da NABQ sem a

interferência da DI. Deste modo, é possível quantificar simultaneamente DI e PC com a sequência de pulsos de potenciais apresentados.

3.4.3 – Variação da vazão no sistema FIA na detecção simultânea de DI e PC

O comportamento da vazão do sistema na detecção MPA foi descrito na introdução deste trabalho, o qual também foi observado para detecção de ácido ascórbico e paracetamol na parte I do Capítulo de resultados e discussão. Assim como na análise anterior, a análise simultânea proposta nesta parte do trabalho realiza ao mesmo tempo a detecção direta e indireta dos analitos. Assim, os dois efeitos foram investigados ao mesmo tempo na detecção dos dois analitos com aplicação dos pulsos de potenciais otimizados no item anterior (mantendo as demais variáveis do sistema constante). As melhores condições foram obtidas em uma vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ para análise simultânea de DI e PC, como apresentado na Figura 28, pois nessa vazão a magnitude de corrente do NPBQ (●), gerado pela oxidação do PC, é máxima. Apesar do sinal adquirido para DI (□) não possuir intensidade máxima em $1,5 \text{ mL}^{-1}$, o sinal obtido nessa vazão permite facilmente sua quantificação.

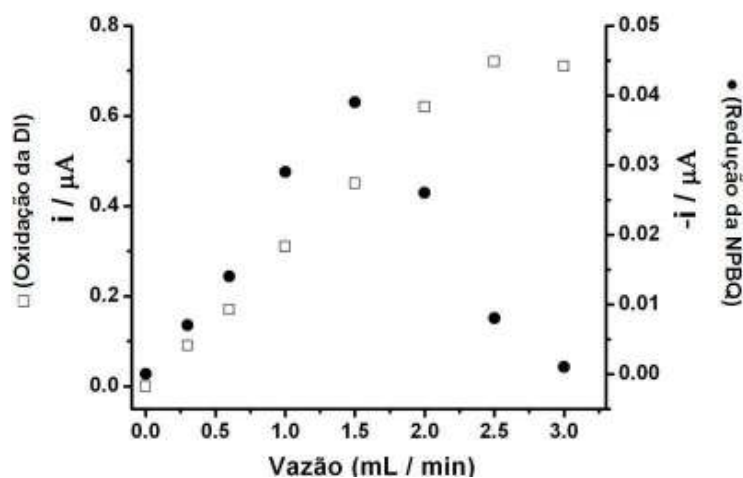


Figura 28: Magnitude da média ($n=3$) dos sinais de corrente em função da vazão da solução transportadora (tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$). Os valores do eixo da coordenada a esquerda refere-se à oxidação de (□) DI $45,0 \text{ mg L}^{-1}$ e os da direita para redução de (●) NPBQ gerada pela oxidação de PC $30,0 \text{ mg L}^{-1}$. Os pulsos de potenciais aplicados são os mesmos apresentados na Figura 27. E_T : carbono vítreo. Alça de amostragem de $150 \mu\text{L}$ em todas as análises. Diâmetro interno da tubulação de $1,0 \text{ mm}$.

Deve-se ressaltar que a vazão otimizada na análise de DI e PC foi realizada com uma tubulação de diâmetro interno de $1,0 \text{ mm}$ (2,0 vezes maior do que para análise de AA e PC). Esse fato justifica a vazão mais elevada otimizada na análise de DI e PC, pois quando se utiliza um diâmetro interno de tubulação maior ($1,0 \text{ mm}$), a pressão de saída do jato de solução (que se encontra a frente do eletrodo de trabalho) é menor comparada com diâmetros internos inferiores (no caso $0,5 \text{ mm}$ para AA e PC). Assim, comparando as duas análises simultâneas realizadas, a espessura da camada estagnada de Nernst é menor quando a pressão de saída do jato aumenta e, conseqüentemente, a vazão ótima foi estabelecida em valores menores de vazão ($0,6 \text{ mL L}^{-1}$) para AA e PC (resultados do item 3.2 e 3.3).

3.4.4 – Avaliação da alça de amostragem na análise simultânea de DI e PC

O sistema FIA com detecção amperométrica usualmente relaciona a medida analítica com a altura do pico de corrente obtida. Dessa forma, quando se aumenta a alça de amostragem a magnitude do sinal eletroquímico do sistema também aumenta, porém um limite máximo e constante é alcançado após certo volume. Esse comportamento foi apresentado na introdução e observado na primeira parte dos resultados deste trabalho para análise simultânea de AA e PC. A Figura 29 apresenta o estudo da variação da alça de amostragem com a magnitude do sinal amperométrico obtido da determinação de DI e PC utilizando as condições experimentais estabelecida nos itens anteriores.

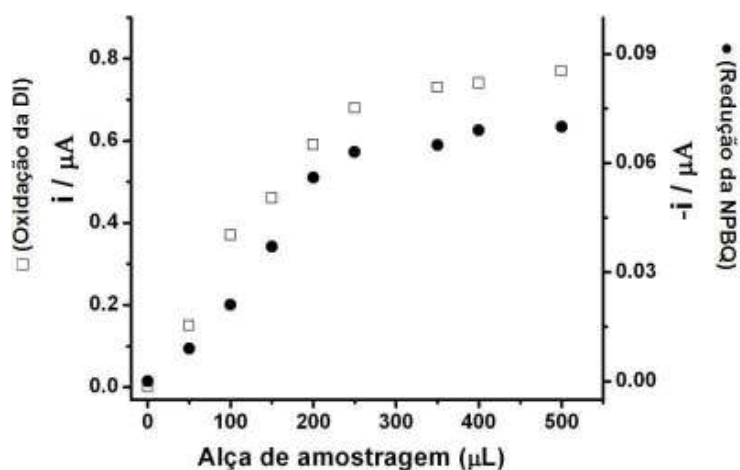


Figura 29: Magnitude da média ($n=3$) dos sinais de corrente em função do tamanho da alça de amostragem das soluções injetadas em triplicata de DI ($\square$) ($45,0 \text{ mg L}^{-1}$) e PC ($\bullet$) ($30,0 \text{ mg L}^{-1}$). Os valores do eixo da coordenada a esquerda refere-se à oxidação de DI e os da direita para redução de NPBQ gerada pela oxidação de PC. Os pulsos de potenciais aplicados são os mesmos apresentados na Figura 27. E_T : carbono vítreo. Vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Diâmetro interno da tubulação de $1,0 \text{ mm}$.

Embora a resposta eletroquímica da detecção de ambos analitos investigados (DI e PC) ter sido maior em alças de amostragem acima de 300 μL , as melhores condições em relação a estabilidade da detecção (limpeza do eletrodo de trabalho de carbono vítreo) simultânea de DI e PC foi obtida em 150 μL . A utilização da alça de 150 μL proporcionou também uma frequência analítica maior do que para alças de amostragem superiores, sem interferir na eficiência da análise simultânea dos compostos analisados.

3.4.5 – Avaliação da seletividade na análise simultânea de DI e PC em função da concentração de cada analito

Nos estudos conduzidos anteriormente foi utilizado uma concentração de DI superior em 1,5 vezes em relação a de PC. Esse valor foi previamente definido em função da relação existente entre estes princípios ativos em formulações farmacêuticas comerciais disponíveis no Brasil. No entanto, o desempenho do método também foi avaliado para situações em que a relação de concentração entre estes compostos é diferente. Para tanto, dois estudos foram realizados e os resultados obtidos são apresentados na Figura 30. Inicialmente, a concentração de DI foi variada de 9,0 à 180,0 mg L^{-1} (a-g), mantendo-se a de PC constante em 6,0 mg L^{-1} (I). Em seguida, a concentração de PC foi alterada de 6,0 à 120,0 mg L^{-1} (I a VII), mantendo-se constante a de DI em 9,0 mg L^{-1} (a).

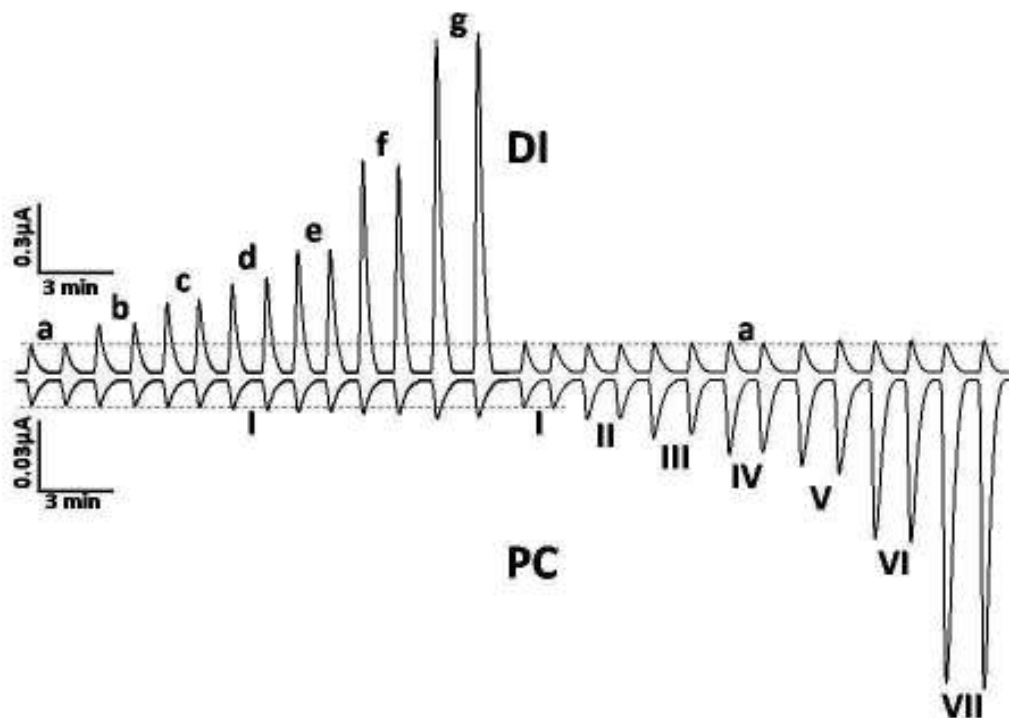


Figura 30: Resposta amperométrica obtida das injeções em duplicata de soluções contendo concentrações crescentes de DI (amperograma obtido em +0,40V) ($a = 9,0$; $b = 18,0$; $c = 27,0$; $d = 36,0$; $e = 45,0$; $f = 90,0$; $g = 180,0 \text{ mg L}^{-1}$) e constante de PC ($I = 6,0 \text{ mg L}^{-1}$) e em seguida concentrações crescentes de PC (amperograma obtido em 0,00V) ($I = 6,0$; $II = 12,0$; $III = 18,0$; $IV = 24,0$; $V = 30,0$; $VI = 60,0$; $VII = 120,0 \text{ mg L}^{-1}$) e constante de DI ($a = 9,0 \text{ mg L}^{-1}$). Os amperogramas obtidos em +0,65V e -0,05V não são apresentados. E_T : carbono vítreo. Demais condições experimentais, conforme Figura 27.

Conforme pode ser observado, quando a concentração de DI está em torno de quinze vezes maior do que a de PC (f : 6,0 e 90,0 mg L^{-1} para PC e DI, respectivamente), o sinal da redução da NPBQ começa a aumentar significativamente (cerca de 32,0 %). Isto pode ser explicado pelo retorno da contribuição da redução do produto de oxidação da DI, pois nessa

concentração, o tempo de aplicação do pulso de potencial (200 ms) não é suficientemente longo para remoção completa e prévia do produto de oxidação da DI junto a superfície do eletrodo. Sendo assim, somente em formulações farmacêuticas que contêm uma razão menor do que quinze vezes entre DI/PC poderão ser analisadas por esse método. Cabe ressaltar que, quando se aplica um tempo superior a 200 ms para impedir a interferência da DI, o sinal amperométrico da detecção indireta do PC é afetada significativamente, inviabilizando essa alternativa (Figura 27B).

Todavia, quando a concentração de PC é variada e a de DI é mantida constante, conforme Figura 30 (I a VII), nenhuma alteração no sinal de oxidação da DI é observado. Estudos exploratórios com concentrações mais elevadas de PC demonstraram que somente quando a razão PC/DI é igual a 100 observa-se uma diminuição em cerca de 10 % no sinal da DI. Essa perda de sinal pode ser justificada pela provável contaminação do eletrodo devido a presença de elevada concentração de PC, o que faz com que a limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho realizado no quarto pulso de potencial (-0,05 V/400 ms) deixe de ser eficiente. Uma maneira de contornar essa situação é aumentar o tempo de aplicação do pulso de potencial para limpeza da superfície do eletrodo, visto que essa opção não interferiria nos demais pulsos de potenciais selecionados. Dessa forma, o PC não se caracteriza como um interferente na detecção de DI.

3.4.6 – Investigação dos parâmetros analíticos na análise simultânea de DI e PC

A investigação da repetibilidade do sinal analítico na análise simultânea de DI e PC foi avaliada por uma série de injeções de soluções padrão contendo ambos os analitos. Na Figura 31 são apresentados os sinais transientes obtidos das 24 injeções consecutivas contendo 45,0 mg L⁻¹ de DI e 30,0 mg L⁻¹ de PC. Os desvios padrões relativos foram

calculados em 0,4 e 0,2 % ($n = 24$) para DI e PC, respectivamente. O resultado obtido demonstra que método não apresenta problemas de envenenamento (contaminação) da superfície do eletrodo (sem nenhuma modificação química ou eletroquímica), o que poderia causar uma perda de sinal em função do tempo. Cabe destacar que, esses resultados somente foram possíveis mediante o uso de um quarto pulso de potencial (-0,05V/400ms) responsável pela periódica limpeza da superfície do eletrodo de trabalho.

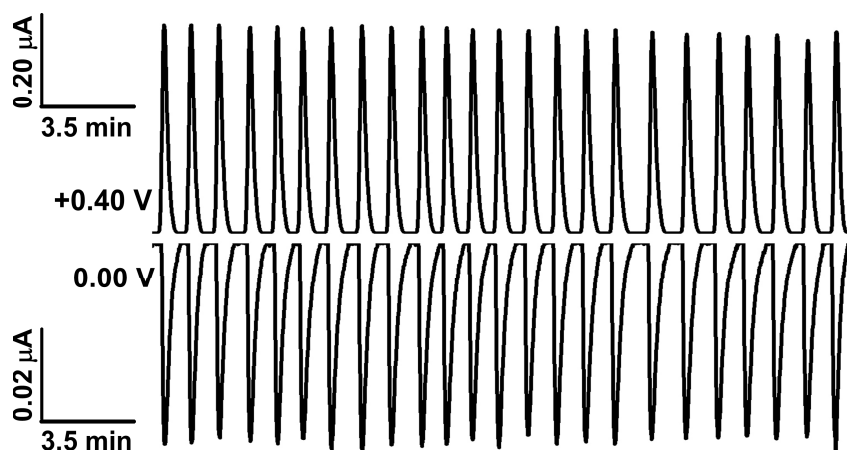


Figura 31: Respostas obtidas por detecção MPA acoplada a FIA das 24 injeções sucessivas de alíquotas de 150 μL de solução contendo simultaneamente DI e PC (45,0 e 30,0 mg L^{-1} , respectivamente). DPR: 0,4 e 0,2 % para PC e DI, respectivamente. E_T : carbono vítreo. Os amperogramas obtidos em +0,65V e -0,05V não são apresentados. Demais condições: conforme Fig. 27.

A curva analítica para quantificação simultânea de DI e PC foi implementada considerando os resultados anteriores, bem como a relação da concentração de DI e PC encontrada em formulações farmacêuticas atualmente disponíveis no Brasil (DI/PC = 1,5).

Dessa forma, todas as soluções padrão dos analitos foram mantidas nessa mesma razão. A Figura 32 apresenta os amperogramas obtidos usando o método proposto para injeções em triplicata de soluções padrão contendo simultaneamente DI (a-e: 9,0 a 45,0 mg L⁻¹) e PC (a-e: 6,0 a 30,0 mg L⁻¹) e suas respectivas curvas de calibração (à direita). Ambas as curvas apresentaram um excelente coeficiente de correlação linear nas faixas estudadas ($R = 0,999$).

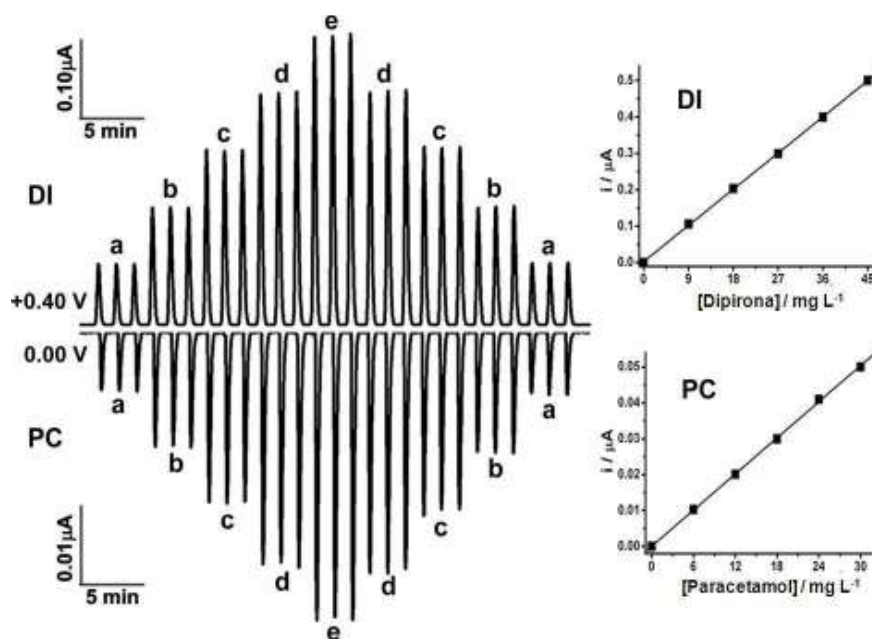


Figura 32: Amperogramas obtidos por MPA acoplada a FIA e curvas de calibração (à direita) para soluções padrão contendo simultaneamente DI (a-e: 9,0 a 45,0 mg L⁻¹) e PC (a-e: 6,0 a 30,0 mg L⁻¹). $R = 0,999$ para ambas as curvas. E_T : carbono vítreo. Os amperogramas obtidos em +0,65V e -0,05V não são apresentados. Demais condições, conforme Fig. 27.

As equações das regressões lineares obtidas pelas curvas de calibração (Fig. 32) são apresentadas abaixo:

$$\mu A = 0,0029 (\pm 0,01) + 0,0110 (\pm 1,0 \times 10^{-4}) \text{ mg L}^{-1} \quad (\text{PC})$$

$$\mu A = 0,00006 (\pm 0,001) + 0,00168 (\pm 2,0 \times 10^{-4}) \text{ mg L}^{-1} \quad (\text{DI})$$

Os limites de detecção foram calculados em 0,15 e 0,70 mg L⁻¹ para a DI e o PC, respectivamente. Os valores são bastante razoáveis, visto que esses fármacos possuem altas concentrações nas formulações farmacêuticas avaliadas. Nas condições apresentadas na Figura 32, a frequência analítica do método foi calculada em 45 determinações por hora.

O método proposto para análise simultânea de DI e PC por FIA com detecção MPA foi avaliada com a análise de cinco marcas comerciais de formulações farmacêuticas, sendo duas dessas contendo somente DI, duas apenas PC e uma com a mistura dos dois analitos. Uma mistura artificial numa razão diferente entre o PC e DI foi também avaliada. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para análise em triplicata dessas amostras. Os valores entre parênteses na Tabela 5 indicam o desvio padrão relativo das medidas. Esses resultados foram comparados com o valor nominal contida no rótulo de cada fármaco e com métodos ora indicado pela farmacopéia, como no caso da determinação da dipirona por titulação iodométrica [88], ora por métodos previamente publicados, como no caso da determinação do paracetamol por titulação com solução padrão de Ce⁴⁺ [123]. O método para determinação simultânea dos dois fármacos por titulometria foi estabelecido da seguinte forma: inicialmente, uma alíquota da amostra foi analisada por titulação iodométrica em meio de tampão acetato (pH 4,7) para a quantificação seletiva de DI na presença de PC, visto que o PC não reage com iodo nesse meio. Em seguida, outra alíquota

da mesma amostra foi titulada com uma solução padrão de Ce^{4+} . Nessa etapa, ambos os analitos são oxidados e, pela diferença entre os resultados das duas titulações, foi possível quantificar PC na amostra.

Tabela 5: Resultados obtidos para a determinação de DI e PC em formulações farmacêuticas

Amostra	Princípio Ativo	Valor tabelado mg por tablete	Método de comparação mg por tablete	MPA em FIA* mg por tablete
1	PC	750	691,3 (2,3)	676,3 (2,6)
2	PC	750	720,8 (2,5)	740,0 (2,4)
3	DI	300	220,6 (3,0)	226,9 (2,6)
4	DI	500	517,8 (3,1)	519,5 (2,5)
5	PC	325	344,0 (2,5)	337,6 (2,7)
	DI	500	482,5 (3,0)	490,1 (2,8)
Mistura artificial	PC	200	199,5 (0,6)	198,6 (0,3)
	DI	400	396,0 (1,2)	395,2 (0,4)

*Os valores em parênteses são os DPR ($n = 3$); Métodos de comparação [88, 123]

Os resultados apresentados na Tabela 5 demonstram que, não houve divergência significativa entre os resultados obtidos pelo método proposto em relação aos métodos de comparação, o que foi comprovado pela realização do “*teste F*” entre os dois métodos com nível de significância de 5%. A análise de uma amostra artificial, onde a concentração de DI é o dobro da de PC, também gerou resultados satisfatórios, com uma recuperação de sinal de 99,3 e 98,8 %, para PC e DI, respectivamente. Estudos de recuperação após adição de uma concentração conhecida a diferentes amostras também geraram recuperações próximas a 100 %.

Os estudos realizados para análise simultânea de DI e PC usando a técnica MPA acoplada a FIA demonstram novamente sua potencialidade para esse fim. Estes estudos foram recém aceitos em uma revista científica [148].

3.5- Parte (III): Acoplamento da detecção MPA em sistema CLAE

A célula eletroquímica utilizada no presente trabalho foi construída com o objetivo inicial de acoplar a detecção amperométrica a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Inicialmente, o desempenho da célula eletroquímica (detecção MPA) foi investigada em comparação a performance de um detector UV comercial, ambos acoplados (em série) a um sistema CLAE (primeiro o detector UV e em seguida o eletroquímico). Os compostos Nitrofenol (NF), Metil Paration (MP), Fenitrothion (FE) e Paration (PA) foram usados como analitos modelo nos experimentos iniciais.

Os nitrocompostos têm comportamento eletroquímico conhecido e descrito na literatura [149]. A Figura 33 mostra um exemplo do comportamento eletroquímico de um destes nitrocompostos (paration) por voltametria cíclica em meio de solução de ácido cítrico $0,050 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando carbono vítreo como eletrodo de trabalho. Três processos eletroquímicos (I, II e III) podem ser identificados, os quais correspondem, respectivamente, à redução do grupo nitro ($-\text{NO}_2$) a hidroxilamina ($-\text{NHOH}$), oxidação do grupo hidroxilamina ($-\text{NHOH}$) a nitroso ($-\text{NO}$) e redução do grupo nitroso ($-\text{NO}$) a hidroxilamina ($-\text{NHOH}$). Os voltamogramas dos outros nitrocompostos estudados (NF, MP e FE) apresentaram comportamento semelhante com leve deslocamento dos picos de oxidação e redução.

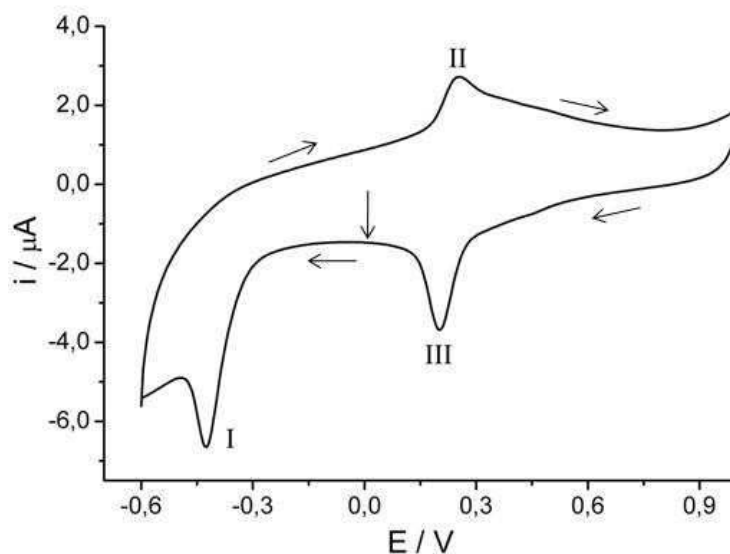


Figura 33: Voltamograma cíclico obtido de uma solução de paration $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ em meio de ácido cítrico $0,050 \text{ mol L}^{-1}$. Faixa de trabalho: $-0,6$ a $1,0 \text{ V}$ vs Ag/AgCl (KCl saturado); Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} ; E_T : carbono vítreo. As setas indicam o sentido da varredura.

Caso a opção fosse o uso de amperometria a potencial constante na detecção destes compostos após separação em coluna cromatográfica, um potencial capaz de monitorar a etapa I (redução do grupo nitro) teria que ser usado ($-0,60 \text{ V}$, por exemplo). Porém, neste processo de redução, os nitrocompostos normalmente adsorvem na superfície do eletrodo de trabalho, inviabilizando a análise devido à falta de repetibilidade na detecção em função do tempo. O uso da detecção MPA contorna a limitação da amperometria a potencial constante, pois permite a aplicação de pulsos de potenciais sequenciais rápidos, sendo um para redução e análise destes compostos ($-0,60 \text{ V}/100 \text{ ms}$) e outro ou outros para promover (ou manter) a limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho. A Figura 34 apresenta uma comparação entre o desempenho de um detector UV comercial e a célula

eletroquímica proposta na detecção de uma mistura de nitrofosforados usando MPA. A separação foi otimizada com fase móvel isocrática constituída por uma mistura de acetonitrila e ácido cítrico $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ na proporção 63:37 com uma coluna de separação de fase reversa C18 como fase estacionária.

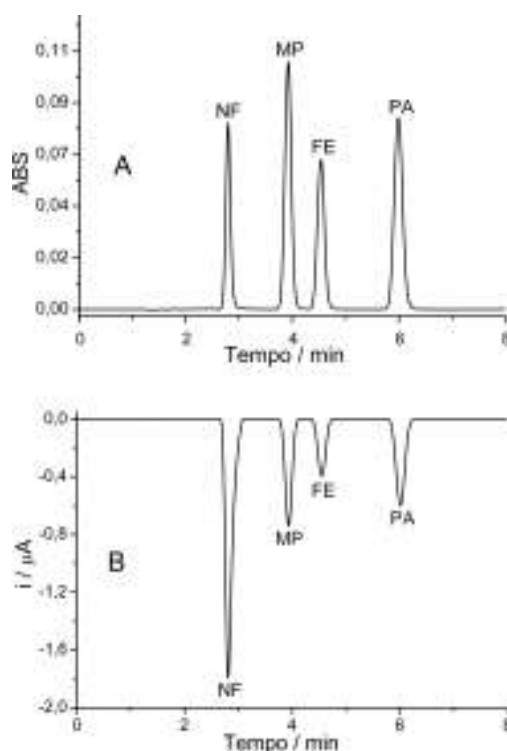


Figura 34: Cromatogramas adquiridos com (A) detector UV comercial (273 nm) e (B) detector eletroquímico (MPA) em $-0,60\text{V}/100 \text{ ms}$; $+0,70/100 \text{ ms}$ e $-0,20\text{V}/100 \text{ ms}$ (pulsos de potencial de limpeza). Analitos ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$ cada): Nitrofenol (NF), Metil Paration (MP), Fenitroion (FE) e Paration (PA). Coluna de separação: CLC-ODS, $15\text{cm} \times 4,6 \text{ mm d.i.}$; Fase móvel isocrática: acetonitrila e ácido cítrico $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ (63:37); Vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; Volume injetado: 20 μL ; E_T : carbono vítreo.

A resolução entre os picos na separação cromatográfica de NF-MP, MP-FE, e FE-PA foram calculadas, respectivamente, em 3,0; 1,4 e 2,9 para o detector UV comercial, e em 2,7; 1,5 e 3,3 para a detecção MPA com a célula eletroquímica proposta. Os resultados obtidos indicam que o detector eletroquímico tem desempenho comparável à do detector UV (apesar de estar posicionado após o detector UV), não se observando qualquer efeito de alargamento de banda. Estes resultados indicam que o detector não apresenta efeitos de residência ou de memória e que os analitos são monitorados pelo detector tão rapidamente como são eluídos da coluna cromatográfica.

O sistema CLAE acoplado a maioria dos detectores (exceto espectrometria de massa) pode somente confirmar com precisão a ausência de um determinado analito numa amostra. Na identificação precisa das espécies presentes em uma amostra, a técnica apresenta limitações. Na detecção espectrofotométrica, um artifício empregado para aumentar a seletividade e a possibilidade de identificação de compostos é o uso de redes de diodos na detecção. Um artifício semelhante pode ser introduzido quando a técnica MPA é usada na detecção de espécies que eluem de uma coluna cromatográfica. A técnica permite a aplicação e aquisição de sinal em até 10 pulsos de potenciais rápidos e sequenciais em função do tempo (software GPES – Eco Chemie). Assim, a MPA permite diferenciar analitos que tem processos eletroquímicos em regiões diferentes de potencial, o que pode auxiliar na identificação e separação de compostos eletroativos que eluem da coluna de separação. O aumento da seletividade através do uso da detecção MPA acoplada a sistema CLAE é demonstrada para uma solução contendo uma mistura de nitrocompostos, onde o monitoramento da corrente em três pulsos de potenciais é utilizado para detectar os processos eletroquímicos desses analitos. A Figura 35 apresenta a aplicação da detecção MPA acoplada a CLAE empregando a seguinte sequência de pulsos de potenciais:

- (1) -0,60V/100ms: para redução do grupo nitro (-NO₂) e geração eletroquímica do grupo hidroxilamina (-NHOH);
- (2) +0,70V/ 100ms: para oxidação do grupo hidroxilamina (-NHOH) gerado no pulso de potencial anterior e geração eletroquímica do grupo nitro (-NO);
- (3) -0,10V/ 100ms: redução do grupo nitro (-NO);
- (4) - 0,20V/200ms: limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho.

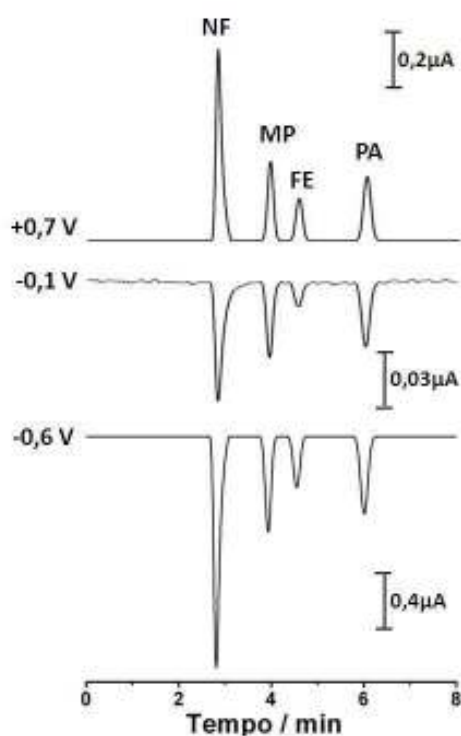


Figura 35: Cromatogramas de uma solução contendo quatro nitrocompostos detectados por MPA em uma sequência (cíclica) de pulsos de potenciais: -0,60V/ 100 ms; +0,70V/ 100 ms ; -0,10V/ 100 m (-0,20V/200ms não apresentado). Analitos (1,0 mg L⁻¹ cada): de Nitrofenol (NF), Metil Paration (MP), Fenitroton (FE) e Paration (PA). E_T: carbono vítreo. As condições cromatográficas são as mesmas da Figura 34.

Como pode ser observado na Figura 35, a seletividade do método com detecção MPA é maior, pois poucos compostos possuem tais características eletroquímicas, o que aumenta a possibilidade de identificar a presença desses compostos numa amostra.

Outro exemplo que demonstra a seletividade da detecção MPA em sistema CLAE é mostrado na Figura 36 na análise de uma mistura contendo ácido ascórbico (AA), dipirona (DI) e paracetamol. A separação cromatográfica da mistura de AA, DI e PC foi otimizada com fase móvel isocrática constituída por uma mistura de acetonitrila e ácido cítrico 0,050 mol L⁻¹ na proporção 20:80 sob uma coluna de separação de fase reversa C18 como fase estacionária. A Figura 36 mostra 10 amperogramas obtidos em pulsos de potenciais diferentes em função do tempo. A sequência cíclica da aplicação dos pulsos de potenciais em função do tempo é apresentada por um esquema de escada de potencial na Figura 37. A ordem de aplicação dos pulsos de potenciais tem como objetivo evitar o surgimento de corrente capacitiva (corrente de fundo) elevada devido a aplicação de pulsos de potenciais em intervalos elevados, o que poderia comprometer, por exemplo, o limite de detecção da análise.

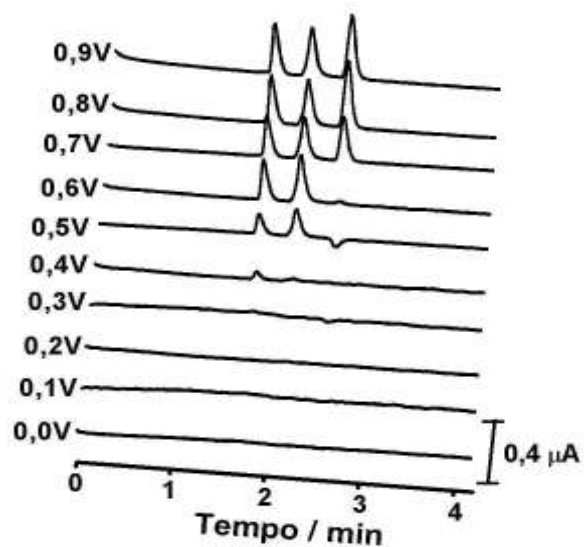


Figura 36: Cromatogramas obtidos de uma solução contendo por ordem de eluição: Ácido Ascórbico, Dipirona e Paracetamol ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ cada). A sequência de aplicação dos pulsos está apresentada na Fig. 37. E_T : carbono vítreo. Fase móvel isocrática constituída por uma mistura de acetonitrila e ácido cítrico $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ na proporção 20:80 sob uma coluna de separação de fase reversa C18.

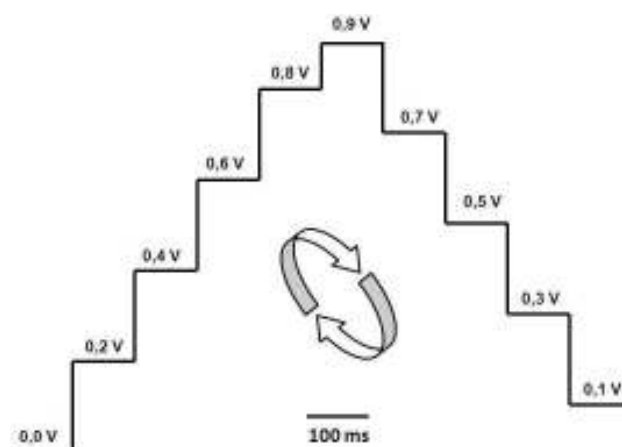


Figura 37: Esquema da sequência cíclica dos pulsos de potenciais aplicados pela detecção MPA apresentada na Figura 36.

Como apresentado na Figura 36, o monitoramento da corrente em 10 pulsos de potenciais possibilita a investigação detalhada dos processos eletroquímicos em cada potencial e, por consequência aumenta a seletividade do método de análise. Por exemplo, na Figura 36, observa-se que somente a partir de 0,40 e 0,50 V, o ácido ascórbico e dipirona apresentam, respectivamente, um sinal apreciável de corrente. Por outro lado, somente o paracetamol apresenta um processo de redução em 0,50 V do produto gerado a partir de 0,60 V. Estas particularidades eletroquímicas em relação a cada componente na mistura contribuem para uma melhor identificação dos analitos que estão presentes na amostra analisada.

A Figura 38 demonstra também a estabilidade da resposta da detecção MPA com a aplicação de quatro pulsos de potenciais sequenciais em função do tempo, tendo carbono vítreo como eletrodo de trabalho, de cinco injeções sucessivas de solução contendo ácido ascórbico, dipirona e paracetamol ($2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ cada) nas mesmas condições cromatográficas da Figura 36. A seguinte sequência de potencial foi aplicada em função do tempo:

- (1) +0,45V/100ms: oxidação do ácido ascórbico em (a) e da dipirona em (b)
- (2) +0,80V/100ms: oxidação do ácido ascórbico em (a), da dipirona em (b) e do paracetamol em (c).
- (3) -0,10V/100ms: para redução da NPBQ em (c) gerada pela oxidação do paracetamol em +0,80V/100ms.
- (4) -0,20V/200ms: para limpeza eletroquímica da superfície o eletrodo de trabalho.

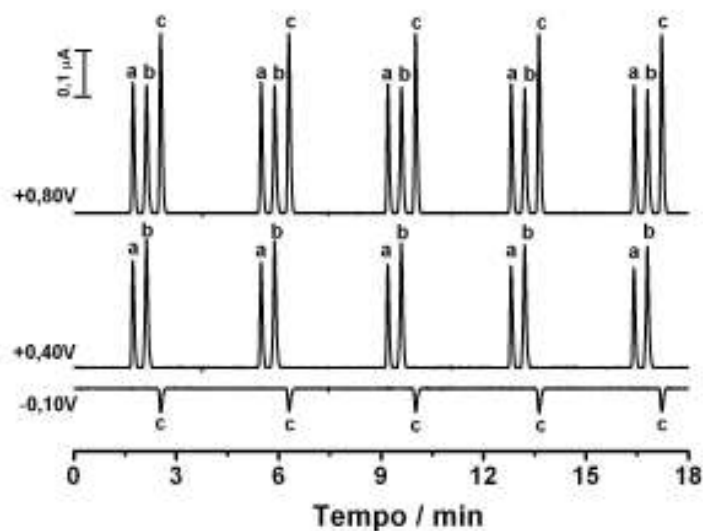


Figura 38: Cromatogramas obtidos de cinco injeções sucessivas de uma solução contendo (a) Ácido Ascórbico, (b) Dipirona e (c) Paracetamol ($2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ cada). E_T : carbono vítreo. Pulsos de potenciais aplicados: +0,40V/100ms; +0,80V/100ms; -0,10V/100ms e -0,20V/200ms (amperograma não adquirido). As condições cromatográficas são as mesmas da Figura 36.

A repetibilidade dos amperogramas apresentados na Figura 38 indicam que o tratamento eletroquímico periódico do eletrodo de trabalho com aplicação do pulso de potencial de limpeza eletroquímica (durante 200 ms), proporcionou uma resposta estável das espécies analisadas. Os desvios padrões relativos calculados das três espécies (AA, DI e PC) foram menores do que 1,0%.

Outra característica importante apresentada pela célula proposta para detecção eletroquímica é a facilidade com um eletrodo de trabalho pode ser retirado da célula, seja para realizar a limpeza mecânica (polimento) ou para ser substituído por outro eletrodo com características eletroquímicas mais adequadas pela detecção de interesse. Para tanto, basta que o eletrodo tenha dimensões adequadas para manter-se firmemente preso no interior do

tubo de teflon (5) da Figura 8 (Capítulo 2) e se mantenha posicionado a uma distância de 1 a 4 mm do ponto de saída do jato de solução.

A possibilidade de se usar eletrodos de trabalho de diferentes materiais, ou de substituir tal eletrodo quando as limpezas eletroquímica e/ou mecânica não são suficientes para recuperar a área eletroquimicamente ativa, diminui as limitações da detecção eletroquímica e amplia as aplicações desse modo de detecção para uma diversidade de analitos eletroativos. A Figura 39 apresenta os sinais cromatográficos obtidos com a célula eletroquímica proposta para uma solução contendo uma mistura de Ácido Ascórbico, Dipirona e Paracetamol ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ cada), utilizando três eletrodos de trabalho diferentes: pasta de carbono (EPC) confeccionado em laboratório, e eletrodos comerciais de carbono vítreo (ECV) e de ouro (EAu). As condições da separação cromatográfica foram as mesmas utilizadas na Figura 36. Os sinais cromatográficos foram obtidos pela aplicação de pulsos sucessivos de +0,80 V e -0,10 V vs Ag/AgCl (KCl saturado), durante 100 ms, sendo o primeiro para a detecção das espécies separadas na coluna cromatográfica e o segundo para a limpeza eletroquímica do eletrodo.

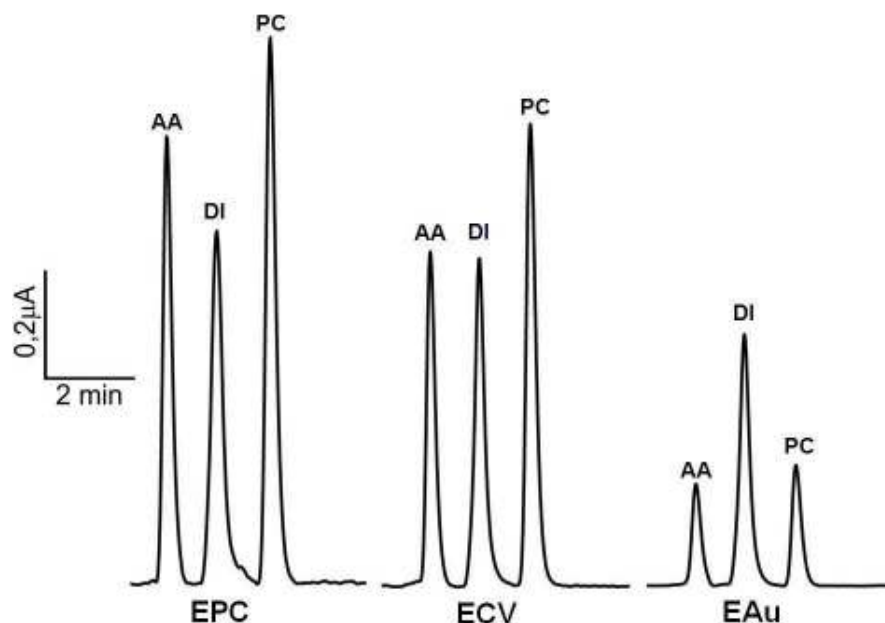


Figura 39: Cromatogramas obtidos de uma solução contendo Ácido Ascórbico (AA), Dipirona (DI) e Paracetamol (PC). Concentração: $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ cada. E_T : pasta de carbono (EPC), carbono vítreo (ECV) e ouro (EAu). Coluna de separação: CLC-ODS, 15cm x 4,6 mm d.i.; Fase móvel: acetonitrila e ácido cítrico $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ (20:80); Vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Volume injetado: $20 \mu\text{L}$.

Observa-se pelos sinais cromatográficos da Figura 39 que o tipo de eletrodo de trabalho afeta somente a magnitude do sinal eletroquímico, mantendo praticamente inalterada a resolução na separação cromatográfica dos analitos. Os estudos realizados pela detecção MPA acoplada a CLAE foram introduzidos num trabalho recentemente aceito para publicação [137].

CAPÍTULO 4:

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

4.1- Conclusões e perspectivas

O presente trabalho demonstrou a potencialidade da detecção eletroquímica por Amperometria de Múltiplos Pulsos (MPA) acoplada a sistemas FIA para quantificação simultânea de dois pares de princípios ativos presentes em fármacos: ácido ascórbico/paracetamol e dipirona/paracetamol. A detecção MPA acoplada a FIA possibilitou também a análise de paracetamol na presença de altas concentrações de ácido ascórbico (880 vezes superior) em meio de H_2SO_4 0,10 mol L⁻¹.

Os métodos propostos baseados em FIA com detecção por MPA são simples, rápidas (~50 determinações por hora), de baixo custo e necessitam de etapas simples de preparação da amostra (dissolução e diluição). Além disso, a método proposta apresentou boa sensibilidade, seletividade e repetibilidade para os analitos investigados usando eletrodos de trabalho sem qualquer modificação química ou eletroquímica de sua superfície, o que torna a método mais atraente para aplicações em análises de rotina em laboratórios. O procedimento proposto pode ser estendido com grande probabilidade de obtenção de sucesso em diversas amostras com compostos eletroativos que possuam comportamentos eletroquímicos semelhantes aos pares investigados.

O modo de detecção MPA acoplada à CLAE através de uma célula eletroquímica construída em laboratório apresentou diversas vantagens, tais como: resposta rápida, alta estabilidade e seletividade na resposta analítica. A célula com detecção MPA não apresenta efeitos de alargamento de banda e nem efeitos de memória, possibilitando o monitoramento dos analitos separados na coluna cromatográfica com resolução comparável a do detector UV comercial. Além disso, a solução na célula flui sob pressão atmosférica, eliminando problemas relacionados à pressão (vazamentos). A geometria da célula permite que a

limpeza mecânica do eletrodo de trabalho seja facilmente executada, além de possibilitar o uso de eletrodos de trabalho comerciais e confeccionados em laboratório.

Portanto, a detecção amperométrica de múltiplos pulsos (MPA) acoplado a sistemas em fluxo (FIA ou CLAE) demonstra ser uma poderosa ferramenta analítica para desenvolvimento de novos métodos de análise. As vantagens apresentadas pela MPA possibilitam ampliar as aplicações desse modo de detecção para uma diversidade de analitos eletroativos.

CAPÍTULO 5:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2008) 390.
- [2] K. Mervartova, M. Polasek, J.M. Calatayud, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45 (2007) 367.
- [3] O. Chailapakul, P. Ngamukot, A. Yoosamran, W. Siangproh, N. Wangfuengkanagul, *Sensors*, 6 (2006) 1383.
- [4] M. Miro, W. Frenzel, *Microchimica Acta*, 148 (2004) 1.
- [5] A.F. Dunec, M. Cheregi, J.M. Calatayud, J.V.G. Mateo, H.Y.A. Enein, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 33 (2003) 57.
- [6] E.H. Hansen, J.H. Wang, *Analytical Letters*, 37 (2004) 345.
- [7] A.F. Danet, M. Cheregi, J.M. Calatayud, J.V.G. Mateo, H.Y.A. Enein, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31 (2001) 191.
- [8] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Analytica Chimica Acta*, 78 (1975) 145.
- [9] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Analytica Chimica Acta*, 99 (1978) 37.
- [10] E.V. Alonso, A.G. de Torres, J.M.C. Pavon, *Talanta*, 55 (2001) 219.
- [11] O.Y. Begak, A.V. Borodin, *Industrial Laboratory*, 64 (1998) 371.
- [12] T. Perez-Ruiz, C.M. Lozano, V. Tomas, E. Ruiz, *Microchimica Acta*, 158 (2007) 299.
- [13] T. Takayanagi, H. Yamashita, S. Motomizu, J. Musijowski, M. Trojanowicz, *Talanta*, 74 (2008) 1224.
- [14] M.R. Baezzat, M. Izadpanah, *Luminescence*, 23 (2008) 59.
- [15] J. Yu, C. Zhang, Y. Tan, S. Ge, P. Dai, Y. Zha, *Luminescence*, 23 (2008) 107.
- [16] C. Couto, M. Montenegro, *Quimica Nova*, 23 (2000) 774.
- [17] A. Hu, R.E. Dessy, A. Graneli, *Analytical Chemistry*, 55 (1983) 320.
- [18] A. Ivaska, T.H. Ryan, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 46 (1981) 2865.
- [19] L. Agui, A. Guzman, M. Pedrero, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingarron, *Electroanalysis*, 15 (2003) 601.
- [20] I. Shitanda, S. Takamatsu, K. Watanabe, M. Itagaki, *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 4933.
- [21] Y.Y. Wei, Y. Li, Y.H. Qu, F. Xiao, G.Y. Shi, L.T. Jin, *Analytica Chimica Acta*, 643 (2009) 13.
- [22] R.P. Baldwin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19 (1999) 69.
- [23] A. Kotani, F. Kusu, K. Takamura, *Analytica Chimica Acta*, 465 (2002) 199.
- [24] D.C. Johnson, S.G. Weber, A.M. Bond, R.M. Wightman, R.E. Shoup, I.S. Krull, *Analytica Chimica Acta*, 180 (1986) 187.
- [25] M. Trojanowicz, M. Szewczynska, M. Wcislo, *Electroanalysis*, 15 (2003) 347.
- [26] Y.I. Yashin, A.Y. Yashin, *Journal of Analytical Chemistry*, 59 (2004) 1121.
- [27] A. Galli, D. De Souza, G.S. Garbellini, C.F.B. Coutinho, L.H. Mazo, L.A. Avaca, S.A.S. Machado, *Quimica Nova*, 29 (2006) 105.
- [28] R.I.L. Catarino, A.C.L. Conceicao, M.B.Q. Garcia, M.L.S. Goncalves, J. Lima, M.M.C. dos Santos, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33 (2003) 571.
- [29] R.M. de Carvalho, R.S. Freire, S. Rath, L.T. Kubota, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34 (2004) 871.
- [30] D.A.H. Skoog, F. J.; Nieman, T. A.; , *Princípios de Análise Instrumental*, 5 ed. Porto Alegre, 2002, p. 270.

- [31] T.R.L.C. Paixao, R.C. Matos, M. Bertotti, *Electroanalysis*, 15 (2003) 1884.
- [32] R.C. Matos, L. Angnes, M.C.U. Araujo, T.C.B. Saldanha, *Analyst*, 125 (2000) 2011.
- [33] S. Palaharn, T. Charoenraks, N. Wangfuengkanagul, K. Grudpan, O. Chailapakul, *Analytica Chimica Acta*, 499 (2003) 191.
- [34] C. Giuriati, S. Cavalli, A. Gorni, D. Badocco, P. Pastore, *Journal of Chromatography A*, 1023 (2004) 105.
- [35] A. Guzman, L. Agui, M. Pedrero, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingarron, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33 (2003) 923.
- [36] Y.E. Cai, Y.Q. Cai, Y.L. Shi, S. Mou, Y.Q. Lu, *Journal of Chromatography A*, 1118 (2006) 35.
- [37] D.C. Johnson, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 182 (1981) 42.
- [38] M.L. Agui, E. Calavia, P. Yanezsedeno, J.M. Pingarron, *Analytica Chimica Acta*, 305 (1995) 324.
- [39] J.W. Dilleen, C.M. Lawrence, J.M. Slater, *Analyst*, 121 (1996) 755.
- [40] J.W. Lee, I.H. Yeo, C.H. Pyun, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 18 (1997) 316.
- [41] J.A. Polta, D.C. Johnson, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 1373.
- [42] G.G. Neuburger, D.C. Johnson, *Analytical Chemistry*, 59 (1987) 203.
- [43] L.A. Larew, D.A. Mead, D.C. Johnson, *Analytica Chimica Acta*, 204 (1988) 43.
- [44] M.B. Jensen, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 222 (2001) 379.
- [45] G. Weber, G. Neumann, V. Romheld, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373 (2002) 767.
- [46] X.N. Cao, J.H. Li, H.H. Xu, L. Lin, Y.Z. Xian, K. Yamamoto, L.T. Jin, *Biomedical Chromatography*, 18 (2004) 564.
- [47] T. Charoenraks, S. Chuanuwatanakul, K. Honda, Y. Yamaguchi, O. Chailapakul, *Analytical Sciences*, 21 (2005) 241.
- [48] F.B. Gonzaga, C.F. Pereira, A.J.M. Guarita-Santos, J.R.S. De, *Electroanalysis*, 17 (2005) 2084.
- [49] V.P. Hanco, J.S. Rohrer, H.H. Liu, C. Zheng, S. Zhang, X. Liu, X. Tang, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47 (2008) 828.
- [50] J.S. Jeong, H. Kwon, H.R. Yoon, Y.M. Lee, T.Y. Choi, S.P. Hong, *Analytical Biochemistry*, 376 (2008) 200.
- [51] K.M. Joo, C.W. Park, H.J. Jeong, S.J. Lee, I.S. Chang, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 865 (2008) 159.
- [52] H.J. Kwon, J.S. Jeong, Y.M. Lee, S.P. Hong, *Journal of Chromatography A*, 1185 (2008) 251.
- [53] M. Raessler, B. Wissuwa, A. Breul, W. Unger, T. Grimm, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008) 7649.
- [54] T. Toropainen, P. Jarho, M. Lehtonen, P. Keski-Rahkonen, H. Raatikainen, T. Jarvinen, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 867 (2008) 90.
- [55] M.H. Jeon, H.J. Kwon, J.S. Jeong, Y.M. Lee, S.P. Hong, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 4568.

- [56] H.J. Kwon, J.S. Jeong, H.J. Sim, Y.M. Lee, Y.S. Kim, S.P. Hong, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 4445.
- [57] L. Hlabangana, S. Hernandez-Cassou, J. Saurina, *Current Pharmaceutical Analysis*, 2 (2006) 127.
- [58] D. Tomsu, M.C. Icardo, J.M. Calatayud, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36 (2004) 549.
- [59] L.K. Shpigun, Y.V. Shushenachev, P.M. Kamilova, *Analytica Chimica Acta*, 573 (2006) 360.
- [60] Y.Q. Li, J.M. Hu, J.G. Yang, B. Zheng, Y.Q. Ha, *Analytica Chimica Acta*, 461 (2002) 181.
- [61] M. Azubel, F.M. Fernandez, M.B. Tudino, O.E. Troccoli, *Analytica Chimica Acta*, 398 (1999) 93.
- [62] Y. Zhou, Y.Q. Li, J.G. Yang, B. Zheng, *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 23 (2003) 374.
- [63] X.F. Yue, Z.Q. Zhang, *Journal of Analytical Chemistry*, 62 (2007) 992.
- [64] Y.S. Li, Y. Muo, H.M. Xie, *Analytica Chimica Acta*, 455 (2002) 315.
- [65] K. Suvardhan, K.S. Kumar, S.H. Babu, B. Jayaraj, P. Chiranjeevi, *Talanta*, 75 (2008) 1148.
- [66] W. Surareungchai, W. Deepunya, P. Tasakorn, *Analytica Chimica Acta*, 448 (2001) 215.
- [67] C.M. Chang, H.J. Huang, *Analytical Chemistry*, 75 (2003) 6368.
- [68] R. Possari, R.F. Carvalhal, R.K. Mendes, L.T. Kubota, *Analytica Chimica Acta*, 575 (2006) 172.
- [69] K. Sato, J.Y. Jin, T. Takeuchi, T. Miwa, Y. Takekoshi, S. Kanno, S. Kawase, *Analyst*, 125 (2000) 1041.
- [70] A. Walcarius, V. Vromman, J. Bessiere, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 56 (1999) 136.
- [71] W.L. Yeh, Y.R. Kuo, S.H. Cheng, *Electrochemistry Communications*, 10 (2008) 66.
- [72] D.S. Austinharrison, D.C. Johnson, *Electroanalysis*, 1 (1989) 189.
- [73] E. Wolyniec, A. Kojlo, *J. Trace Microprobe Tech.*, 21 (2003) 217.
- [74] R.W. Fox, A.T. McDownald, *Introdução à Mecânica de Flúidos* Ed. Guanabara dois, 1981, pag 578.
- [75] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, 1^a ed. , New York, 1980, p. 391.
- [76] Y.K. Loke, *J. Clin. Pharm. Ther.*, 34 (2009) 247.
- [77] B.J. Anderson, *Pediatric Anesthesia*, 18 (2008) 915.
- [78] R. Pânico, W.H. Powell, J.C. Richer, *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds - Recomendations* 1993.
- [79] M.E. Bosch, A.J.R. Sanchez, F.S. Rojas, C.B. Ojeda, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42 (2006) 291.
- [80] A. Korolkovas, J.H. Burckhalter, *Química Farmacêutica*, Rio de Janeiro, 1988, p. 191.
- [81] N. Pakravan, D.N. Bateman, J. Goddard, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 64 (2007) 824.
- [82] H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, P.K. Moore, *Farmacologia*, 3 ed, Rio de Janeiro, 2004, p. 829.
- [83] a.e. Sigma Production - A7085 - disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com>

- [84] R.A. Granberg, A.C. Rasmuson, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 44 (1999) 1391.
- [85] Y. Bentur, O. Cohen, *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology*, 42 (2004) 261.
- [86] H. Ergun, D.A.C. Frattarelli, J.V. Aranda, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35 (2004) 479.
- [87] M.P. de Andrade, *Prática hospitalar*, 7 (2005) 145.
- [88] *Farmacopeia Brasileira* 3rd Ed., Atheneu Editora, São Paulo, 1977, p. 406.
- [89] *European Pharmacopeia*, Ed. Council of Europe, Paris, 2005, p. 2002.
- [90] I. Baranowska, P. Markowski, J. Baranowski, *Analytica Chimica Acta*, 570 (2006) 46.
- [91] H.Z. Senyuva, I. Aksahin, S. Ozcan, B.V. Kabasakal, *Analytica Chimica Acta*, 547 (2005) 73.
- [92] M.F.S. Teixeira, L.H. Marcolino-Junior, O. Fatibello, E.R. Dockal, E.T.G. Cavaleiro, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15 (2004) 803.
- [93] F. Belal, *Electroanalysis*, 4 (1992) 589.
- [94] A.P. do Nascimento, M.G. Trevisan, E.R.M. Kedor-Hackmann, R.J. Poppi, *Analytical Letters*, 40 (2007) 975.
- [95] J. Lima, S.M.O. Sa, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32 (2003) 1011.
- [96] A.V. Pereira, L. Penckowski, M. Vosgerau, M.F. Sassa, O. Fatibello, *Quimica Nova*, 25 (2002) 553.
- [97] R.A.A. Munoz, R.C. Matos, L. Angnes, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90 (2001) 1972.
- [98] D. Daniel, I.G.R. Gutz, *Analytica Chimica Acta*, 571 (2006) 218.
- [99] L.H. Marcolino, V.G. Bonifacio, O. Fatibello-Filho, M.F.S. Teixeira, *Quimica Nova*, 28 (2005) 783.
- [100] E.P. Medeiros, S.L. Castro, F.M. Formiga, S.R.B. Santos, M.C.U. Araujo, V.B. Nascimento, *Microchemical Journal*, 78 (2004) 91.
- [101] a.e. Sigma Production - D8890 - disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com>
- [102] J.K. Lodge, *Curr. Top. Nutraceutical Res.*, 6 (2008) 1.
- [103] O. Arrigoni, M.C. De Tullio, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1569 (2002) 1.
- [104] A. KorolKovas;, J.H. Burckhalter, *Química Farmacêutica*, Rio de Janeiro 1988, p. 663.
- [105] N. Smirnov, *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (2000) 229.
- [106] O.A. Zaporozhets, E.A. Krushinskaya, *Journal of Analytical Chemistry*, 57 (2002) 286.
- [107] M.C. Yebra-Biurrun, *Talanta*, 52 (2000) 367.
- [108] J.P. Barthelemy, *Analisis*, 24 (1996) 95.
- [109] E. Kleszczewska, *Pharmazie*, 55 (2000) 640.
- [110] S.G. Park, J.E. Park, E.I. Cho, J.H. Hwang, T. Ohsaka, *Res. Chem. Intermed.*, 32 (2006) 595.
- [111] A.R.B. de Quiros, M. Fernandez-Arias, J. Lopez-Hernandez, *Food Chemistry*, 116 (2009) 509.
- [112] M. Pandurangachar, B.E.K. Swamy, U. Chandra, O. Gilbert, B.S. Sherigara, *International Journal of Electrochemical Science*, 4 (2009) 672.

- [113] S. Shahrokhian, M. Ghalkhani, M.K. Amini, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 137 (2009) 669.
- [114] Q.H. Meng, W.C. Irwin, J. Fesser, K.L. Massey, *Annals of Clinical Biochemistry*, 42 (2005) 475.
- [115] F. Martinello, E.L. da Silva, *Clinica Chimica Acta*, 373 (2006) 108.
- [116] F. Martinello, E.L. da Silva, *Clinical Biochemistry*, 39 (2006) 396.
- [117] D. Nagel, D. Seiler, E.F. Hohenberger, M. Ziegler, *Clinical Laboratory*, 52 (2006) 149.
- [118] S.R. Ali, R.R. Parajuli, Y. Ma, Y. Balogun, H. He, *Journal of Physical Chemistry B*, 111 (2007) 12275.
- [119] a.e. Sigma Production - A5960 - disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com>
- [120] A.M.D. Ramirez, G.P.H. Delgadillo, R.V. Martinez, M.I.D. Reval, F.J. Lopez-Munoz, *Drug Development Research*, 51 (2000) 260.
- [121] X.X. Yang, Z.P. Hu, W. Duan, Y.Z. Zhu, S.F. Zhou, *Current Pharmaceutical Design*, 12 (2006) 4649.
- [122] The United States Pharmacopoeia, in: U.S.P. 25 rev. (Ed.), The United States Pharmacopoeia, Convention: Rockville, 2002.
- [123] M.K. Srivastava, S. Ahmad, D. Singh, I.C. Shukla, *Analyst*, 110 (1985) 735.
- [124] M.L. Altun, *Turkish Journal of Chemistry*, 26 (2002) 521.
- [125] G.B. Golubitskii, E.V. Budko, V.M. Ivanov, *Journal of Analytical Chemistry*, 60 (2005) 961.
- [126] I. Muszalska, M. Zajac, K. Czajkowski, M. Nogowska, *Chemia Analityczna*, 45 (2000) 825.
- [127] B.R. Thomas, X.G. Fang, P. Shen, S. Ghodbane, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 12 (1994) 85.
- [128] J. Krzek, M. Starek, *Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc*, 12 (1999) 356.
- [129] R. Thomis, E. Roets, J. Hoogmartens, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73 (1984) 1830.
- [130] O.W. Lau, S.F. Luk, Y.M. Cheung, *Analyst*, 114 (1989) 1047.
- [131] E. Dinc, A. Ozdemir, *Pharmazie*, 59 (2004) 700.
- [132] A. Ruiz-Medina, M.L. Fernandez-de Cordova, M.J. Ayora-Canada, M.I. Pascual-Reguera, A. Molina-Diaz, *Analytica Chimica Acta*, 404 (2000) 131.
- [133] M.G.Zarbiele, A. L. Mendes, *Infarma*, 19 (2007) 17.
- [134] ANVISA, http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/67_081007rdc.htm, a.e. 01/08/2009.
- [135] U.S.P. The United States Pharmacopoeia, Editor. 2002: Convention: Rockville.
- [136] J.J. Pedrotti, L. Angnes, I.G.R. Gutz, *Electroanalysis*, 8 (1996) 673.
- [137] W.T.P. Santos, Azevedo, E.F.; Albuquerque, Y.D.T., Richter, E.M., , *Química Nova*, no prelo (2009).
- [138] W.T.P. dos Santos, M.P. Ceolin, Y.D.T. de Albuquerque, E.M. Richter, *Química Nova*, 30 (2007) 1754.
- [139] B.F. Reis, B.H. F, *Química Nova* 6(1993) 570.
- [140] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed. Porto Alegre, Bookman, 2002, p. 137.
- [141] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed. Porto Alegre, Bookman, 2002, p. 97.

- [142] T.R.L.C. Paixao, E.M. Richter, J.G.A. Brito-Neto, M. Bertotti, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 596 (2006) 101.
- [143] K. Waterston, J.W.J. Wang, D. Bejan, N.J. Bunce, *Journal of Applied Electrochemistry*, 36 (2006) 227.
- [144] H.B. Mark, H. Zhang, S.K. Lunsford, O. Ceylan, A.I. Khaskelis, N. Atta, A. Galal, S. Hausner, J.F. Robinson, G.C. Russell, H. Zimmer, G.P. Kreishman, *Analytica Chimica Acta*, 385 (1999) 281.
- [145] T. Luczak, *Electroanalysis*, 20 (2008) 1639.
- [146] W.T.P. dos Santos, E.G.N. de Almeida, H.E.A. Ferreira, D.T. Gimenes, E.M. Richter, *Electroanalysis*, 20 (2008) 1878.
- [147] D.J. Miner, J.R. Rice, R.M. Riggan, P.T. Kissinger, *Analytical Chemistry*, 53 (1981) 2258.
- [148] W.T.P. Santos;, D.T. Gimenes;, E.G.N.d. Almeida;, S.d.P. Eiras;, Y.D.T. Albuquerque;, E.M. Richter, *J. Braz. Chem. Soc*, 00 (2009) 1.
- [149] J.M. Zen, J.J. Jou, A.S. Kumar, *Analytica Chimica Acta*, 396 (1999) 39.