



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

**Determinação simultânea de paracetamol e cafeína em
formulações farmacêuticas usando análise por injeção
em fluxo com detecção amperométrica**

Mestrando: Wesley Cadena da Silva

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Área de Concentração: Química Analítica

Uberlândia
Fevereiro / 2011



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

**Determinação simultânea de paracetamol e cafeína em
formulações farmacêuticas usando análise por injeção em fluxo
com detecção amperométrica**

Aluno: WESLEY CADENA DA SILVA

**Texto apresentado ao Programa de Pós-Graduação
do Instituto de Química da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito de defesa de dissertação
de mestrado.**

Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter
Orientador

Uberlândia
Fevereiro / 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – MESTRADO
E-mail: ppgquimica@ufu.br - Fone: 3239-4385

ALUNO(A): WESLEY CADENA DA SILVA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 97150

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica”

ORIENTADOR(A):

PROF. DR. EDUARDO MATHIAS RICHTER

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada na Sala 202 do Bloco 5O, no Campus Santa Mônica, no dia 4 de fevereiro de 2011, às 14h00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter
(IQUFU)

Prof Dr. Thiago Régis Longo César da Paixão
(USP)

Profª Dra. Aline Carlos de Oliveira
(IQUFU)

Uberlândia, 4 de fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

- ✓ *A Deus, em primeiro lugar por ter concedido mais essa oportunidade em minha vida*
- ✓ *À minha mãe, Nair, pelo apoio, confiança, carinho, dedicação e por me amar tanto sempre intercedendo por mim em suas orações.*
- ✓ *Ao meu pai, Alfredo, pelo apoio, amor, carinho e conselhos de vida.*
- ✓ *À minha Tia, Maria e todos os meus familiares pelo amor e carinho, sempre acreditando e orando por mim durante toda minha vida.*
- ✓ *À minha esposa Elce Lene, 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.*
- ✓ *Aos meus grandes amigos e colegas de laboratório: Rodrigo (Cabeça), Denise, Joice, Tatielli, Polyanna, Lucas e todos os demais, a minha eterna gratidão pelo apoio e pelos bons momentos que passamos.*
- ✓ *Aos grandes amigos e mestres, que mesmo de longe sempre torceram pelo meu sucesso: Rodrigo Muñoz, Manuel, Reinaldo, Otávio, Waldomiro, e a todos os demais o meu muito obrigado.*
- ✓ *Ao Prof. Dr Reinaldo Ruggiero, pelo empréstimo do equipamento de CLAE 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 Otávio, Buiate, Edmar, Aníbal, Edmilson, Ildo 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.*

“Porque há homem cujo trabalho é feito com sabedoria, conhecimento e destreza; contudo deixará o seu trabalho como porção de quem nele não trabalhou; também isto é vaidade e grande mal”.

Eclesiastes 2:21

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Espécies Analíticas.....	2
1.1.1- Paracetamol (PA).....	2
1.1.2- Cafeína (CA).....	3
1.1.3- Associações de CA e PA em fármacos.....	4
1.2 Metodologias para determinação de PA.....	6
1.3 Metodologias para determinação de CA.....	7
1.4 Análise simultânea de CA e PA em FIA com detecção (AMP) e eletrodo DDB.....	8
1.5 Técnicas Utilizadas.....	11
1.5.1 Análise por injeção em fluxo (FIA).....	11
1.5.2 Amperometria.....	12
1.5.3 FIA com detecção Amperometrica de Múltiplos Pulsos (FIA-AMP).....	13
1.6 - Eletrodo de Diamante Dopado com boro (DDB).....	17
1.6.1 Pré-tratamento do eletrodo de DDB.....	19
1.7 – Objetivos.....	20
1.7.1– Objetivo Geral.....	20
1.7.2–Objetivos Específicos.....	20
CAPÍTULO 2 – EXPERIMENTAL.....	22

2.1- Soluções e reagentes.....	23
2.2- Preparo das amostras.....	23
2.3- Instrumentação.....	24
2.3.1- Sistema eletroquímico.....	24
2.3.2- Análises cromatográficas.....	24
2.3.3- Eletrodo DDB e célula eletroquímica.....	24
2.3.4- Limpeza eletroquímica do eletrodo de DDB.....	27
2.3.5- Eletrodo de referência.....	27
2.3.6- Sistema FIA.....	28
 CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	 30
3.1 - Comportamento eletroquímico da CA e do PA.....	31
3.2. Investigação para identificação dos pulsos de potenciais para análise simultânea de PA e CA em FIA com detecção por AMP.....	34
3.3. Estudo do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais.....	37
3.4. Estudo da vazão.....	43
3.5. Estudo do volume de injeção.....	44
3.6. Definição das faixas lineares de resposta para PA e CA.....	45
3.7. Estudo de repetibilidade.....	51
3.8. Curvas analíticas para quantificação simultânea de PA e CA.....	53
 CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES.....	 60
4.1 – Conclusões.....	61
 CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Etapas envolvidas na construção do eletrodo DDB.....	25
Figura 2: Imagem do detector usado no sistema FIA com (A) e sem (B) a tampa.....	26
Figura 3: Esquema do sistema FIA utilizado.....	28
Figura 4: Esquema do sistema de controle de vazão usado no trabalho.....	29
Figura 5: Imagem parcial do sistema FIA-AMP usado no presente trabalho.....	29
Figura 6: Voltamogramas cíclicos obtidos sob eletrodo de diamante dopado com boro em solução tampão ácido acético/acetato 0,10 mol L ⁻¹	31
Figura 7: Mecanismo de oxidação eletroquímica do PA.....	32
Figura 8: Mecanismo de oxidação eletroquímica da cafeína.....	32
Figura 9: Escada de pulsos de potenciais aplicados de forma cíclica em função do tempo e os respectivos amperogramas obtidos para injeção em FIA de uma solução contendo 34,3 mg L ⁻¹ de PA e 4,9 mg L ⁻¹ de CA usando diamante dopado com boro (DDB) como eletrodo de trabalho.....	33
Figura 10: Gráfico obtido a partir das correntes detectadas no experimento da Fig. 9....	34
Figura 11: Amperograma obtido para injeções em triplicata de soluções contendo somente 60 mg L ⁻¹ de PA, somente 8 mg L ⁻¹ de CA e ambas as substâncias nas mesmas concentrações anteriores nos pulsos de potenciais de +1,22 V (A) e +1,55 V (B).....	36
Figura 12: Estudo do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais com injeções em duplicata de três soluções, uma contendo somente 60 mg L ⁻¹ de PA, outra somente 8 mg L ⁻¹ de CA e a terceira simultaneamente PA+CA (60 + 8 mg L ⁻¹) no tempo de (A) 50 ms, (B) 100 ms, (C) 200 ms e (D) 300 ms no pulso de potencial de +1,20 V.....	38
Figura 13: Estudo do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais com injeções em duplicata de três soluções, uma contendo somente 60 mg L ⁻¹ de PA, outra somente 8	

mg L ⁻¹ de CA e a terceira simultaneamente PA+CA (60 + 8 mg L ⁻¹) no tempo de (A)	
50 ms, (B) 100 ms, (C) 200 ms e (D) 300 ms pulso de potencial de +1,55 V.....	39
Figura 14: Estudo do número de pontos de aquisição de corrente em função do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais.....	42
Figura 15: Estudo da vazão com injeções em duplicata de soluções contendo 60,0 e 8,0 mg L ⁻¹ de PA e PA, respectivamente. Variação da vazão entre 0,5 e 6,0 mL min ⁻¹ nos potenciais de +1,22 V (A) e +1,55 V (B).....	43
Figura 16: Estudo do volume de injeção com injeções em duplicata de soluções contendo 60,0 e 8,0 mg L ⁻¹ de PA e CA, respectivamente nos potenciais de +1,22 V(A) e +1,55 V(B). Vazão: 4,5 ml min ⁻¹	44
Figura 17: Amperograma obtido para injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes de PA (+1,2 V / 50 ms).....	45
Figura 18: Amperograma obtido para injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes de PA (+1,55 V/50 ms).....	46
Figura 19: Curva analítica obtida para PA no pulso de potencial de +1,2 V/50 ms.....	46
Figura20: Curva analítica obtida para PA no pulso de potencial de +1,55 V/50 ms.....	47
Figura 21: Amperograma obtido para injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes de CA (+1,55 V/50 ms).....	48
Figura 22: Curva analítica obtida para CA no pulso de potencial de +1,55V/50 ms.....	48
Figura 23: Amperograma obtido nos pulso de potencial de +1,20 V para 31 injeções sucessivas de 300 µL de uma solução contendo simultaneamente CA e PA (6,8 e 52,0 mg L ⁻¹ , respectivamente).....	51
Figura 24: Amperograma obtido nos pulso de potencial de +1,55V para 31 injeções sucessivas de 300 µL de uma solução contendo simultaneamente CA e PA (6,8 e 52,0 mg L ⁻¹ , respectivamente).....	52

Figura 25: Amperograma obtido em +1,20 V para injeções em triplicatas de soluções contendo somente PA (a, b, l, m), PA e CA (c, d, e, f, g) e amostras (h, i, j, k).....	54
Figura 26: Amperograma obtido em e +1,55 V para injeções em triplicatas de soluções contendo somente PA (a, b, l, m), PA e CA (c, d, e, f, g) e amostras (h, i, j, k).	54
Figura 27: Curva analítica obtida para PA a partir dos dados experimentais da Fig. 25..	55
Figura 28: Curva analítica obtida para CA a partir dos dados experimentais das Fig. 25 e 26.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais características físico-químicas e estruturais do PA.....	2
Tabela 2: Principais características físico-químicas e estruturais da CA.....	3
Tabela 3: Métodos eletroquímicos disponíveis na literatura sobre análise simultânea de PA e CA.....	10
Tabela 4: Corrente de oxidação de PA, CA e PA + CA em função do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais.....	40
Tabela 5: Variação do fator ($i_{PA+1,55\text{ V}}/i_{PA+1,20\text{ V}}$) em função da concentração de PA.....	50
Tabela 6: Estudo da repetibilidade do método em função do volume injetado no sistema FIA.....	52
Tabela 7: Resultados obtidos na análise simultânea de CA e PA em 04 formulações farmacêuticas usando o método proposto e pelo método comparativo (CLAE).....	57
Tabela 8: Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação na análise simultânea de PA e CA em formulações farmacêuticas usando o método proposto.....	58
Tabela 9: Métodos eletroquímicos disponíveis na literatura sobre análise simultânea de PA e CA com a inclusão dos resultados obtidos usando o método proposto.....	59

LISTA DE ABREVIações

- AA** – Ácido ascórbico
- AdSDPV** – Voltametria adsortiva com redissolução catódica e pulso diferencial
- CA** – Cafeína
- CLAE** – Cromatografia de Líquida de Alta Eficiência
- VC** – Voltamograma cíclico ou voltametria cíclica
- CV** – Eletrodo de Carbono Vítreo
- DI** – Dipirona
- DDB** – Diamante Dopado com Boro
- DPR** – Desvio Padrão Relativo
- DPV** – Voltametria de pulso diferencial
- EA** – Eletrodo Auxiliar
- ER** – Eletrodo de Referência
- EIS** – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
- EPNTCs** – Eletrodo de Pasta de Nanotubos de Carbono Modificado com Surfactante
- ET** – Eletrodo de Trabalho
- E_p** – Pico de Potencial
- FIA** – Flow Injection Analysis (Análise por injeção em fluxo)
- FIA-AMP** – FIA com detecção amperométrica de múltiplos pulsos
- I_C** – Corrente Capacitiva
- I_F** – Corrente Faradaica
- IUPAC** – União Internacional de Química Pura e Aplicada
- LD** – Limite de Detecção
- LQ** – Limite de Quantificação
- MPA** – Multiple Pulse Amperometry (Amperometria de Múltiplos Pulsos)
- NPBQ** – N-acetil-p-benzoquinonaimina
- PAD** – Pulsed Amperometric Detection (Amperometria pulsada)
- PA** – Paracetamol
- PVC** – Policloreto de Vinila
- THF** – Tetraidrofurano
- R** – Coeficiente de correlação linear
- SNC** – Sistema Nervoso Central
- VOQ** – Voltametria de Onda Quadrada

RESUMO

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação simultânea de paracetamol (PA) e cafeína (CA) em formulações farmacêuticas usando Análise por Injeção em Fluxo com detecção Amperométrica de Múltiplos Pulsos (FIA-AMP). O sistema FIA utilizado é de linha única com adaptação dos três eletrodos em uma célula eletroquímica do tipo “wall-jet”. O eletrodo de trabalho usado é um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB; ~8000 ppm). A estratégia usada para determinação simultânea de PA e CA por FIA-AMP foi à aplicação de três pulsos de potenciais sequenciais (de uma forma cíclica) em função do tempo: (1) +1,20 V/50ms: oxidação do PA e quantificação seletiva de PA; (2) +1,55 V/50ms: oxidação de ambos os analitos (CA e PA) e quantificação da CA através da subtração do sinal de corrente medido em + 1,20V (relacionado somente com PA). Antes, porém, a corrente detectada em +1,20 V necessita ser multiplicada por um fator de correção; (3) +0,40V/100ms: limpeza eletroquímica ou manutenção da superfície do eletrodo de DDB (provável adsorção de PA ou CA ou seus respectivos produtos de oxidação). O uso de um fator de correção foi necessário, pois a corrente de oxidação do PA não é igual em ambos os pulsos de potenciais utilizados (+1,55 V e +1,20 V). Uma simples subtração de sinais não dá acesso à corrente de oxidação da CA. Um fator foi calculado com a injeção de uma solução contendo somente PA ($fator = i_{PA+1,55} v / i_{PA+1,2} v$) e, posteriormente, este fator foi usado para determinar a corrente de oxidação proveniente somente da CA no pulso de potencial de +1,55 V usando a seguinte equação: $[i_{CA} = i_{+1,55} v - (fator \times i_{+1,20} v)]$.

Além disto, vários parâmetros do sistema FIA-AMP foram estudados e/ou otimizados: tempo de aplicação dos pulsos de potenciais, número de aquisições de corrente por pico transiente, vazão e volume de injeção. Ambos os compostos apresentaram boa linearidade em extensa faixa de concentração (1,0–755 mg L⁻¹ para PA e 1,0–315 mg L⁻¹

para CA), com excelentes coeficientes de correlação para ambos os analitos ($R = 0,999$). O fator de correção é constante em uma faixa de concentração elevada ($9,9 - 177,0 \text{ mg L}^{-1}$; fator de correção = $0,771 \pm 0,012$; $n = 13$). O método proposto foi aplicado na determinação simultânea de PA e CA em formulações farmacêuticas sendo que resultados obtidos foram similares aos obtidos por cromatografia líquida. Estudos de adição e recuperação também foram realizados ($\sim 100 \%$).

Palavras Chave: Amperometria de Múltiplos pulsos, FIA, Análises simultâneas, Cafeína, Paracetamol.

ABSTRACT

This work reports the development of a quick and easy method for simultaneous determination of paracetamol (PA) and caffeine (CA) in pharmaceutical formulations using Flow Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric detection (FIA-MPA). A single-line flow injection system was employed using a home-made electrochemical wall-jet cell in the three electrode configuration. Boron-doped diamond electrode (BDD; ~8000 ppm) was used as the working electrode. The strategy used in the simultaneous determination of PA and CA by FIA-MPA was the application of three sequential and cyclic potential pulses in function of the time: (1) +1.20 V/50ms: oxidation of PA and selective quantification of PA; (2) +1.55 V/50ms: oxidation of both analytes (CA e PA) and quantification of CA through the subtraction of the current signal detected at + 1.20 V. However the current detected at +1.20 V should be multiplied for a correction factor; (3) +0.40V/100ms: potential pulse applied in order to avoid contamination of BDD working electrode (probably due to the adsorption of PA or CA or oxidations products). The PA oxidation current detected at +1.20 V is greater than the PA current detected at +1.55 V, a simple subtraction between currents detected at the two potential pulses does not directly yield the CA oxidation current. To circumvent this problem, we applied a *correction factor* ($fator = i_{PA+1,55\text{ V}}/i_{PA+1,2\text{ V}}$) that corresponds to the exact difference between the current detected for PA at +1.20 V and +1.55 V. Then, the current originating from CA oxidation detected at +1.55 V can be calculated using the following equation: $[i_{CA} = i_{+1,55\text{ V}} - (fator \times i_{+1,20\text{ V}})]$.

Besides this, several parameters of the FIA-MPA system were studied and/or optimized: potential pulses times, current sampling in each transient signal, flow rate and injection volume. Both compounds displayed good linearity over a large concentration range (1.0–755 mg L⁻¹ for PA and 1.0–315 mg L⁻¹ for CA), with excellent correlation coefficients for both analytes (R = 0.999). The correction factor is constant over a large PA concentration range

(9.9-177.0 mg L⁻¹; correction factor = 0.771 ± 0.012; n = 13). The proposed method was used for the determination of PA and CA in pharmaceutical formulations and the obtained results were similar to those obtained by HPLC. Recovery studies were also carried out (~ 100 %).

Keywords: *Multiple pulse amperometry, FIA, Simultaneous analysis, Caffeine, Paracetamol.*

Capítulo 1

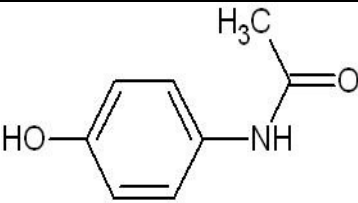
Introdução

1.1 - ESPÉCIES ESTUDADAS

1.1.1 – Paracetamol

O paracetamol (PA) ou N-acetil-p-aminofenol ou acetaminofeno é um pó cristalino branco ligeiramente solúvel em água, facilmente solúvel no álcool, muito pouco solúvel no cloreto de metileno e no éter. É um composto estável e está entre as drogas mais extensivamente empregadas no mundo. Não é cancerígeno e é um substituto eficaz da aspirina para pacientes com sensibilidade a ela [1]. É utilizado nas seguintes formas de apresentação: cápsulas, comprimidos, gotas, xaropes e injetáveis. Entretanto, apesar de ser extensamente utilizado é altamente perigoso para o fígado devido ao seu alto potencial hepatotóxico, não devendo ser utilizado mais que 4 gramas diárias [2]. A Tabela 1 apresenta algumas características do composto.

Tabela 1: Principais características físico-químicas e estruturais do PA[3]

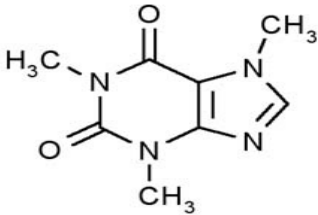
Estrutura	
Fórmula molecular	C ₈ H ₉ NO ₂
Massa molar	151,163 g mol ⁻¹
Nomenclatura da IUPAC	N-(4-hidroxifenil)etanamida
Solubilidade em água	12,75 mg mL ⁻¹ (20 °C)
Ponto de Fusão	170 °C
Densidade	1,26 g cm ⁻³

1.1.2 - Cafeína

A cafeína (CA) ou (3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona) é um N-metil alcalóide, de fórmula $C_8H_{10}N_4O_2$, do grupo das xantinas identificado como 1,3,7-trimetilxantina, cuja estrutura contém um esqueleto de purina. As xantinas (que incluem a teofilina e a teobromina) são substâncias capazes de estimular o sistema nervoso central (SNC), produzindo estado de alerta de curta duração [4-6].

A CA é extensamente distribuída em produtos naturais e é geralmente adicionada em bebidas. Tem muitos efeitos fisiológicos, tais como a secreção gástrica, diurese, e estimulação do SNC [7]. Usada terapeuticamente em combinação com a ergotamina no tratamento da enxaqueca ou em combinação com drogas anti-inflamatórias em formulações analgésicas. É incluída em preparações analgésicas devido à sua ação diurética. Embora uma parcela pequena da população consuma CA na forma de fármacos, como os antigripais, grande parte deste alcalóide é ingerida na forma de bebidas. A Tabela 2 apresenta algumas características do composto.

Tabela 2: Principais características físico-químicas e estruturais da Cafeína[8]

Estrutura	
Fórmula molecular	$C_8H_{10}N_4O_2$
Massa molar	$194,19 \text{ g mol}^{-1}$
Nomenclatura da IUPAC	1,3,7-trimetil-1H-purino-2,6(3H-7H)-diona
Solubilidade em água	$2,17 \text{ g/100 mL (25}^{\circ}\text{C)}$
Ponto de Fusão	236°C
Densidade	$1,23 \text{ g cm}^{-3}$

Em face do seu largo campo de ação fisiológica, existe, de fato, um grande interesse da comunidade científica no estabelecimento de níveis seguros de ingestão de CA para diversos subgrupos populacionais humanos. Além disso, a CA é uma droga estimulante que pode ser usada indevidamente em atividades esportivas oficiais e, portanto, necessita ser monitorada continuamente durante as competições.

1.1.3- Associações de CA e PA em formulações farmacêuticas

Diversas formulações farmacêuticas estão disponíveis no mercado onde o PA e a CA são usados como substâncias ativas. Em função disto, estudos comparativos de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade foram realizados entre formulações contendo simultaneamente CA e PA e contendo somente PA. Os efeitos dessa associação no fígado não revelaram nenhuma informação sugestiva de um aumento clínico significativo na hepatotoxicidade. Estes estudos também reportam que a CA não contribui para a nefrotoxicidade [9]. Quando o PA é oxidado pelo citocromo P450, um metabólito tóxico é gerado. A oxidação do PA por esse citocromo pode ser detectado pela formação de um aduto da glutathione. O grupo acetamido do PA tem maior afinidade pelo heme (um anel tetrapirrólico com um íon central de ferro) desse citocromo. A adição de CA diminui a habilidade do PA em coordenar-se com o heme do citocromo, reforçando, assim, a taxa de oxidação ao metabólico tóxico do PA. Por esse motivo, o interesse na toxicologia da combinação destas substâncias no homem foi retomado [10].

O mecanismo de ação do PA ainda não foi devidamente elucidado, mas estudos recentes indicam que seu efeito preliminar é a inibição da síntese das prostaglandinas [11, 12]. Individualmente, a CA não é considerada um analgésico, mas em doses de 65 mg ou superior é usada como um auxiliador analgésico [13]. Em um estudo envolvendo mais de 10.000 pacientes [14], uma maior atividade analgésica foi relatada quando a CA foi usada

em combinação com analgésicos (por exemplo, AAS e PA). A obtenção do mesmo efeito analgésico sem CA exige uma dose do analgésico aproximadamente 40% maior do que a dose administrada com CA. Tem-se sugerido previamente que 65 mg ou mais de CA pode realçar o alívio da dor de cabeça, mas em outros tipos de dor (pós parto, dental e pós operatória), estes efeitos analgésicos auxiliares são menos conclusivos [15]. Atualmente, a combinação de doses fixas de ácido acetilsalicílico (aspirina), PA e CA é a mistura analgésica de uso mais geral a nível mundial [16], com eficácia demonstrada na administração da tensão-tipo dor de cabeça [17, 18] e enxaqueca [19, 20].

Em outro estudo para determinar o efeito analgésico do PA comparado a uma combinação de ambos (CA e PA) ou ainda a CA sozinha utilizando a estimulação da dor, 24 pessoas foram tratadas oralmente com 1000 mg de PA ou 130 mg de CA ou uma combinação de ambos. O alvo deste estudo era investigar a atividade analgésica de 1000 mg do PA comparado com a CA sozinha e a combinação de ambos usando modelos experimentais de dor em humanos. O efeito analgésico do fármaco contendo somente PA e do fármaco contendo PA combinado com CA foi semelhante, sendo que ambos causaram uma redução significativa da intensidade da dor (30 minutos após a administração do fármaco) [21, 22]. Estatisticamente houve redução significativa na intensidade da dor após a estimulação durante a administração do PA com CA. Além disso, a combinação de PA e CA era significativamente superior comparado com PA e CA sozinhos na redução da dor durante o intervalo de tempo estudado (entre 1 e 4 horas). Diversos estudos clínicos indicaram que a CA pode realçar a atividade analgésica de inibidores da ciclo-oxigenase em pacientes [14, 21-23]. Por outro lado, todas as tentativas de mostrar um efeito analgésico direto da CA em estudos humanos fracassaram [24, 25]. Nesses estudos, o tratamento com CA não mostrou por si mesmo nenhum efeito analgésico, mas aumentou o efeito do PA. Há evidências de uma intensificação do efeito analgésico da CA quando administrada com PA.

1.2 - Metodologias para determinação de PA

A determinação de PA em formulações farmacêuticas vem sendo realizada por um número considerável de técnicas analíticas. Conforme artigo de revisão publicado em 2006, os métodos de análise de PA foram divididos em quatro categorias: métodos ópticos, eletroanalíticos, cromatográficos e eletroforéticos [1].

Entre os métodos ópticos destacam-se a análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica, espectrofotometria com calibração multivariada, espectrofotometria derivativa, espectrofotometria no infravermelho (NIR e FTIR), espectrofluorimetria e quimiluminescência. Dentre os métodos cromatográficos são citados cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida micelar e cromatografia com injeção sequencial [1].

Entre os métodos eletroanalíticos, um número considerável de trabalhos podem ser localizados onde estes métodos foram usados na determinação de PA. Métodos polarográficos foram usados inicialmente na análise de PA em fluidos biológicos [26] e formulações farmacêuticas [27]. Outra técnica eletroanalítica explorada para este fim foi a voltametria de pulso diferencial sendo usada na análise de PA em plasma sanguíneo [28], em urina [29] e formulações farmacêuticas [30, 31]. Também foi empregada a técnica de amperometria para a determinação direta de PA em plasma sanguíneo [32]. Neste caso, uma membrana de acetato de celulose modificada com dimetildiclorosilano (permeação seletiva de PA) foi usada para impedir o contato dos demais constituintes da matriz com o eletrodo de trabalho usado (platina). Em outro estudo, um eletrodo de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (fonte da enzima peroxidase) foi utilizado na determinação de PA em produtos farmacêuticos [33]. A pasta de carbono é uma mistura de pó de grafite e aglutinante. O pó de grafite deve ter tamanho uniforme, alta pureza química e baixa

capacidade de adsorção de oxigênio e impurezas eletroativas. O aglutinante é geralmente um líquido orgânico quimicamente inerte, de baixa volatilidade, livre de impurezas, eletroinativo, imiscível com a solução do analito e deve preencher os interstícios entre as partículas do grafite. O desenvolvimento do eletrodo de pasta de carbono modificado com enzimas (biossensores) possui a vantagem de diminuir o limite de detecção do analito de interesse e aumentar a seletividade das determinações. O procedimento é simples e a regeneração da superfície é feita através da renovação da pasta da ponta do biossensor. A peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio catalisa a oxidação de alguns substratos doadores de prótons como mono e difenóis, polifenóis, aminofenóis entre outros. Essa enzima é termoestável e pode ter sua atividade regenerada após tratamento térmico. Diversas são as fontes vegetais de peroxidase inclusive a abobrinha (*Cucurbita pepo*).

Entre 2007 e 2010, diversos artigos foram publicados onde técnicas eletroquímicas foram usadas na análise de PA. Na maioria dos trabalhos, o enfoque principal foi o desenvolvimento de novos materiais e a determinação de PA foi usada como um exemplo de aplicação deste material [34-36].

1.3- Metodologias para determinação de CA

Entre os métodos descritos na literatura para a análise de CA, as técnicas mais empregadas foram espectrofotometria e cromatografia [37]. Geralmente, estes métodos são mais caros, demorados e complicados do que os eletroanalíticos, principalmente em relação ao preparo da amostra. Entretanto, o inconveniente principal da determinação eletroquímica de CA usando os materiais comuns de eletrodo (ouro, platina e carbono vítreo) é que sua oxidação ocorre em um potencial muito positivo, sobrepondo-se assim com o potencial de oxidação da água, ou do material de eletrodo utilizado, tornando os resultados menos exatos.

Diversas soluções foram propostas, incluindo o uso de eletrodos com uma faixa de potencial anódico maior (diamante dopado com boro) [7] ou carbono vítreo com modificação superficial com Nafion/pirocloro-óxido de rutênio [38], somente Nafion [39], compósito de platina e nanotubos de carbono [40] e Nafion com nanotubos de paredes múltiplas [41]. Por último, devemos mencionar o uso de biossensores enzimáticos para dosagem de CA. Nesse contexto, Pizzariello *et al.*[42] desenvolveram um biossensor prático e de baixo custo para detecção de CA em café. Nesse caso, um eletrodo potenciométrico sensível a variações de pH foi usado para detectar mudanças de pH resultantes da inibição, pela CA, da ação da fosfodiesterase de nucleotídeo 3',5'-cíclico sobre a hidrólise do AMP cíclico.

1.4 - Análise simultânea de CA e PA

A determinação simultânea destes dois componentes (PA e CA) e outros compostos adicionais é descrita na literatura mediante o uso de diversas metodologias analíticas. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) é o método cromatográfico mais popular na separação de misturas de drogas analgésicas e compostos similares, inclusive para PA e CA [43-52]. A vantagem da CLAE na análise destes compostos inclui alta eficiência, sensibilidade e especificidade. Além disso, a técnica de CLAE permite a quantificação de diversos compostos numa única corrida cromatográfica e normalmente é considerada método padrão pela farmacopéia americana. A técnica de eletroforese capilar [53] também foi utilizada na análise simultânea de PA e CA, mas somente a técnica de eletrocromatografia micelar permite a separação destes compostos, pois a CA não pode ser convertida em um íon nos eletrólitos normalmente usados em EC.

Outra técnica utilizada com frequência na análise simultânea de PA e CA é a espectrofotometria UV/vis. A detecção direta e simultânea não é possível devido a

sobreposição parcial dos espectros de absorção, mas a análise é viável tratando os resultados por derivação [54, 55], calibração multivariada [52] e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) [56, 57]. Além disso, um método usando espectrofluorimetria com calibração multivariada de segunda ordem também foi localizado na literatura [58].

A determinação simultânea de CA e PA usando métodos eletroquímicos é possível, pois ambos são oxidados em potenciais diferentes, o que propicia seletividade na determinação destes compostos. Entretanto, poucos métodos são descritos na literatura visando à determinação simultânea desses compostos empregando métodos eletroquímicos. Provavelmente isto ocorre porque a CA oxida em potenciais muito positivos (próximo à oxidação da água ou do material do eletrodo).

Apesar disso, alguns métodos foram localizados na literatura onde estes compostos foram quantificados utilizando métodos eletroquímicos. Em um estudo realizado por Lau *et al.*, a análise simultânea de PA e CA em formulações farmacêuticas foi implementada por voltametria de pulso diferencial (DPV). No método proposto, carbono vítreo foi utilizado com eletrodo de trabalho e ácido perclórico/metanol como eletrólito (1:1) [30]. Zen *et al.* também desenvolveram um método para determinação simultânea de PA e CA em formulações farmacêuticas utilizando voltametria de onda quadrada e Nafion/pirocloreóxido de rutênio como eletrodo de trabalho. Os autores elaboraram um estudo comparativo entre o eletrodo proposto e o de carbono vítreo onde ficou evidente que o eletrodo proposto apresenta um efeito catalítico na oxidação do PA e da CA, fato que, segundo os autores, o torna bastante seletivo [59]. Em outro estudo, a técnica de voltametria adsortiva com redissolução catódica por pulso diferencial foi empregada por Sanghavi *et al.* na análise simultânea de PA e CA. Nesse trabalho, os autores descreveram como esses compostos são determinados simultaneamente em amostras de urina e soro sanguíneo utilizando eletrodo de pasta de nanotubos de carbono modificado com surfactante [60].

Um trabalho que merece destaque foi recentemente publicado por Lourenção *et al.* [61]. Os autores relatam a possibilidade da análise simultânea de CA e PA por VPD ou VOQ utilizando eletrodo de diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho e ácido acético/acetato como eletrólito suporte. A escolha dos autores por esse eletrodo deve-se a sua larga janela de potencial, inércia química e presença de baixas correntes residuais. O método é bastante simples e apresenta baixos limites de detecção quando comparado com o método relatado por Zen *et al.* [38]

As características individuais de cada método foram reunidas na Tabela 3.

Tabela 3. Métodos eletroquímicos disponíveis na literatura sobre análise simultânea de PA e CA.

Técnica	Eletrodo	Eletrólito	Faixa linear (mol L⁻¹)	LD (mol L⁻¹)	Ref.
VPD e VOQ	DDB	HAc/Ac pH = 4,5	PA: 5,0×10 ⁻⁷ a 8,3×10 ⁻⁵ CA: 5,0×10 ⁻⁷ a 8,3×10 ⁻⁵	PA: 4,9×10 ⁻⁷ CA: 3,5×10 ⁻⁸	[61]
AdSDPV	EPNTCs	Fosfato pH = 7,0	PA: 2,91×10 ⁻⁷ a 6,27×10 ⁻⁵ CA: 2,91×10 ⁻⁷ a 6,27×10 ⁻⁵	PA: 2,58×10 ⁻⁸ CA: 8,83×10 ⁻⁸	[60]
VOQ	CME	HClO ₄	PA: 1,0×10 ⁻⁵ a 2,5×10 ⁻⁴ CA: 5,0×10 ⁻⁶ a 2,5×10 ⁻⁴	PA: 1,2×10 ⁻⁶ CA: 2,2×10 ⁻⁶	[59]
VPD	CV	HClO ₄ /CH ₃ OH	PA: 0 a 3,64×10 ⁻⁴ CA: 0 a 2,57×10 ⁻⁴	PA: Não Inf. CA: Não Inf.	[30]

***Amostras:** Formulações farmacêuticas; **DDB:** Eletrodo de Diamante Dopado com Boro; **EPNTCs:** eletrodo de pasta nanotubos de carbono modificado com surfactante; **CME:** eletrodo de nafion/pirocloro-óxido de rutênio; **CV:** eletrodo de carbono vítreo; **VPD:** Voltametria de pulso diferencial; **VOQ:** Voltametria de onda quadrada; **AdSDPV:** Voltametria adsorptiva com redissolução catódica e pulso diferencial.

A informação apresentada pelos autores na referência [30] em relação a faixa linear pode ser considerada como equivocada, pois nenhuma metodologia de análise apresenta comportamento linear até concentração igual a zero.

Segundo nosso conhecimento, não existe trabalho na literatura onde PA e CA são quantificados simultaneamente usando FIA com detecção amperométrica.

1.5 - Técnicas utilizadas no trabalho

1.5.1 Análise por injeção em fluxo (FIA)

A Análise por Injeção em Fluxo é um processo que combina um conjunto de características, como: menor tempo de análise, maior sensibilidade e seletividade, simplicidade de manuseio, baixo custo e potencialidade adequada para automação. Em função disto constitui-se num campo de pesquisa amplo e em constante expansão na área de química analítica. 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, elevada frequência analítica, consumo reduzido de reagentes e amostras e, conseqüentemente, redução na geração de resíduos [62-65].

A análise por injeção em fluxo pode ser facilmente acoplada a diversos tipos de detectores, tais como: absorção atômica [66], fluorescência [67], quimiluminescência [68], potenciometria [69], voltametria [70], amperométricos [71], o que a torna extremamente versátil. Quando os analitos são eletroativos, os detectores eletroquímicos apresentam geralmente sensibilidade e seletividade superiores à detecção espectrofotométrica. Além disso, também apresentam vantagens em relação à detecção fluorimétrica, em especial no caso de compostos que requerem um procedimento de derivatização, o que em geral é uma etapa trabalhosa (quando não complexa) de uma análise [72].

1.5.2 - Amperometria

Os detectores eletroquímicos mais utilizados em sistemas em fluxo são os amperométricos [73]. Nesta técnica (amperometria convencional), o eletrodo de trabalho é normalmente mantido num potencial constante adequado, no qual ocorre a oxidação ou redução eletroquímica de compostos eletroativos de interesse. Estes detectores apresentam maior sensibilidade, sendo que a medição de correntes baixíssimas (e portanto de baixas concentrações) está associada à virtual ausência de corrente capacitiva e menor efeito na contaminação da superfície do eletrodo de trabalho devido ao menor tempo de contato da amostra e dos produtos do processo redox com o eletrodo (comparado aos processos estacionários) [74]. Com isso, uma maior estabilidade na resposta do detector pode ser alcançada, proporcionando alta reprodutibilidade nos resultados obtidos.

A amperometria também pode ser usada no modo pulsado. Esta técnica pode diminuir ou evitar 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 aplicar 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 [75]. Superfícies de eletrodo constantemente limpas e eletroquimicamente ativas no transcorrer da análise podem aumentar consideravelmente a obtenção de respostas estáveis, reprodutíveis e relacionáveis com a concentração do analito na solução (faixa linear de trabalho).

A amperometria pulsada (PAD ou AMP) foi utilizada por autores na detecção em sistemas FIA [76, 77], eletroforese capilar (EC) [2, 78] e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo esta última responsável pelo maior número de artigos sobre o assunto na literatura [70, 79-82]. Em CLAE, a principal função da detecção pulsada é promover a constante

limpeza eletroquímica e ativação da superfície do eletrodo de trabalho. Apesar dos métodos de limpeza eletroquímica serem muito úteis para se manter a estabilidade da resposta de um detector amperométrico durante a análise, estes procedimentos não substituí totalmente a limpeza mecânica do eletrodo após certo período, especialmente quando as espécies analisadas adsorvem fortemente sobre a superfície desse eletrodo.

1.5.3 – FIA com detecção Amperometrica de Múltiplos Pulsos (FIA-AMP)

A técnica AMP, também conhecida por amperometria pulsada (PAD “pulsed amperometric detection”) é utilizada no meio científico como sistema de detecção em sistemas em fluxo. Apesar de não muito difundida, esta técnica permite a análise simultânea e indireta de compostos eletroativos, o que minimiza sua desvantagem frente aos métodos cromatográficos.

Análise Indireta

Segundo a literatura, a análise indireta de compostos eletroativos usando AMP-FIA pode ser considerada como tal quando uma espécie é quantificada pelo monitoramento do produto de oxidação ou redução gerado na superfície de um eletrodo de trabalho. Um trabalho foi apresentado na literatura por Kubota *et al.* [83], onde descrevem a determinação de cisteína sob eletrodo de trabalho de ouro e tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH = 10,0) como solução transportadora. Os pulsos de potenciais usados na detecção de cisteína através da técnica AMP em FIA foram os seguintes: +0,10V/700ms: oxidação da cisteína e adsorção do produto gerado na superfície do eletrodo de trabalho (ouro sem modificação química); -0,60V/30ms: detecção e quantificação indireta de cisteína pela redução do produto adsorvido; -1,30V/2000ms: renovação e limpeza da superfície do eletrodo de trabalho. O método baseia-se em reações de quimissorção de parte do enxôfre da cisteína em eletrodos policristalinos de ouro. A faixa linear de resposta foi de 1,0 x 10⁻⁶ a 6,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ com o limite de detecção calculado em 5,0 x

10^{-7} mol L⁻¹. A frequência analítica do métodos foi de 23 injeções hora. A metodologia desenvolvida foi usada com sucesso para a determinação de cisteína em amostras comerciais de alimentos.

Recentemente, outro estudo foi publicado onde a determinação indireta foi explorada [84]. Os autores descrevem a determinação indireta de dopamina em FIA na presença de altas concentrações de ácido ascórbico, aplicando a seguinte sequência de pulsos de potenciais usando carbono vítreo como eletrodo de trabalho: (+0,80V/700ms) ácido ascórbico e dopamina são oxidados, gerando, respectivamente, o-dopaminoquinona (composto eletroquimicamente reduzível) e ácido dehidroascórbico (composto normalmente inativo eletroquimicamente); (+0,35V/30ms) quantificação indireta da DP pela redução eletroquímica da o-dopaminoquinona; (0,00V/500ms) pulso de potencial aplicado para promover a limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de carbono vítreo. Testes de repetibilidade apresentaram um DPR de 1,2 % (n=24), o que demonstra um bom desempenho do método. A faixa linear de resposta para a DP ficou entre 1,0 e 100,0 μ mol L⁻¹ e os limites de detecção e quantificação em 50 e 170 nmol L⁻¹, respectivamente. Estudos de adição/recuperação em uma amostra farmacêutica contendo DP geraram recuperações na ordem de 96,3 %.

Existe um número considerável de trabalhos na literatura que usam eletrodos sólidos modificados para este fim [36,85-94], pois relatam que sem modificação, a análise não é possível. Porém, em ambos os estudos citados acima, o uso do sistema FIA com detecção amperométrica pulsada permitiu a análise destes compostos sem a modificação química dos eletrodos sólidos utilizados.

Análise Simultânea

Geralmente, a análise de dois compostos simultaneamente em sistemas em fluxo com detecção amperométrica somente é possível mediante uma etapa prévia de separação, como uma coluna de separação disposta previamente ao detector. Entretanto, essa opção demanda, na maioria dos casos, o uso de sistemas cromatográficos. O inconveniente principal disso é a necessidade de uma etapa de preparação da amostra (geralmente bastante trabalhosa) o que pode comprometer o tempo da análise e produzir quantidades significativas de resíduos. A análise simultânea em fluxo sem utilização de colunas de separação vem sendo aplicada em sistemas FIA com detecção espectrofotométrica [95-97]. Mesmo apresentando um custo inferior aos métodos cromatográficos, esta metodologia necessita de etapas de tratamento prévio da amostra e, além disto, os dados gerados geralmente podem requerer tratamentos quimiométricos.

Usando AMP como detector em FIA, o primeiro trabalho disponibilizado na literatura para análise simultânea foi proposto por Surareunchai *et al* [98]. Eles demonstraram ser possível a análise simultânea de glicose e frutose utilizando eletrodo de carbono vítreo recoberto com Nafion nos seguintes pulsos de potenciais: (-0,50V/240ms) o grupo aldeído presente na glicose é oxidado e usado para quantificação seletiva da glicose (+0,20V/180ms) glicose e frutose são oxidadas. A diferença entre as respostas amperométricas entre os dois pulsos de potenciais fornece a corrente de oxidação da frutose; (+1,00V/180ms) pulso de potencial usado para a limpeza da superfície do eletrodo de trabalho; (-0,80V/300ms) pulso de potencial usado para reativação da superfície do eletrodo de trabalho.

Posteriormente, a técnica AMP-FIA foi explorada na análise simultânea de paracetamol (PA) e ácido ascórbico (AA) usando carbono vítreo como eletrodo de trabalho [99] e dipirona (DI) e paracetamol (PA) [74] usando ouro como eletrodo de trabalho. Em ambos os trabalhos, a mesma sequência de pulsos de potenciais foi utilizada. Na análise de AA e PA a seguinte sequência de pulsos de potenciais foram aplicados: (+0,40V/100ms) o AA é oxidado e

quantificado sem a interferência de PA; (+0,65V/100ms) oxidação de ambas as espécies; (0,00V/100ms) o produto gerado eletroquimicamente pela oxidação do PA é reduzido e quantificado sem a interferência de AA; (-0,05V/600ms) pulso de potencial usado para completa regeneração (limpeza) da superfície do eletrodo de trabalho.

No segundo trabalho, a seguinte sequência de pulsos de potenciais foram aplicados (análise de DI e PA): (+0,40V/100ms) oxidação e quantificação direta de DI sem a interferência de PA; (+0,65V/100ms) oxidação de ambos os analitos; (0,00V/200ms) quantificação indireta do PA pela redução do produto gerado no pulso de potencial anterior; (-0,05V/400ms) limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho.

Apesar dos potenciais aplicados nos dois estudos serem iguais, o terceiro pulso de potencial usado na quantificação indireta de PA no segundo trabalho demandou um estudo do tempo de aplicação deste pulso de potencial. O problema para determinação indireta do PA neste potencial foi provocado pelo fato do produto de oxidação da DI (gerado em +0,65 V) também gerar um produto eletroquimicamente ativo em potenciais catódicos, implicando em uma interferência na análise indireta de PA. A estratégia usada na detecção seletiva de PA neste pulso de potencial foi a aquisição do sinal de corrente após 200 ms sob uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. Isto foi possível porque a corrente de redução gerada a partir dos produtos de oxidação do PA e DI diminui à medida que o tempo de aplicação do pulso de potencial vai aumentando. Como a corrente catódica para o produto de oxidação da DI possui menor intensidade, a corrente cai a zero para este analito nesse tempo (200 ms) na interface eletrodo-solução e o sinal de corrente para a redução da NBPQ pôde então ser adquirido sem interferência da DI.

1.6. Eletrodo de diamante dopado com boro (DDB)

Os materiais de diamante representam uma nova classe de carbono que possuem um futuro promissor, particularmente, em aplicações eletroanalíticas [100]. Estudos eletroquímicos com esse material tiveram seu início relativamente tardio, aproximadamente 20 anos atrás. O diamante apresenta uma alta dureza e consequentemente, sua etapa de preparação requer alta temperatura e pressão. Outro inconveniente é o fato de ser um isolante elétrico, ou seja, não é um bom condutor de eletricidade, o que o torna inaplicável como material de eletrodo [101].

No entanto, quando o diamante é dopado com boro ou outro agente dopante, torna-se um material semicondutor. A melhora nas características de condutividade elétrica (a partir de um nível de dopagem da ordem de 10^{20} cm^{-3} confere a este material propriedades eletroquímicas atraentes. Além disto, este material apresenta outras características importantes, tais como: boa transparência óptica, inércia química, baixo coeficiente de fricção, estabilidade morfológica e microestrutural a altas temperaturas (em torno de 1800°C), alta resistência química, ampla janela de potencial de trabalho e baixa corrente capacitiva [102].

Atualmente, na maioria dos casos, boro é utilizado como dopante obtendo-se como resultado da dopagem semicondutores do tipo p. Se fósforo ou nitrogênio são utilizados como dopante um semicondutor do tipo n é produzido[103]. Os dois métodos mais empregados para a síntese do diamante são a deposição química a partir da fase vapor (Chemical Vapor Deposition – CVD) e o crescimento a alta pressão/alta temperatura (High-Pressure/High-Temperature-HPHT), o que mais se assemelha ao processo de formação do diamante natural é o HPHT que foi desenvolvido pela General Eletric em 1995. [103-106].

Em 1986, usando o processo CVD, Fujimori *et al.* [107] cresceram um filme policristalino dopado com boro sobre substrato de silício e obtiveram resultados semelhantes

aos obtidos por Pofertl *et al.* [108] anteriormente usando um reator assistido por plasma de microondas. As contribuições dadas por estes autores foram as seguintes: (1) aumento na taxa de crescimento para $2,5 \times 10^{-4} \mu\text{m/h}^{-1}$ e, (2) determinação da resistividade elétrica como função da concentração de boro usado como dopante[109]. Com a melhora na tecnologia de fabricação de filmes de diamante a partir da fase vapor, métodos efetivos para o crescimento de filmes de diamante sintético começaram a ser desenvolvidos. Através da dopagem com boro, filmes semicondutores começaram a ser fabricados, o que fez aumentar a procura por este material para fins eletroquímicos [101, 103, 110].

Os eletrodos de DDB possuem um número importante de propriedades eletroquímicas distinguíveis de outros eletrodos comumente utilizados, tais como carbono vítreo, grafite pirolítico e pasta de carbono. Algumas destas propriedades são [104]:

- a) Estabilidade à corrosão em meios muito agressivos;
- b) Baixa e estável corrente de fundo;
- c) Estabilidade de respostas em longo prazo;
- d) Fraca adsorção de moléculas polares e
- e) Larga janela de potencial em meio aquoso e não aquoso.

Neste eletrodo a evolução de hidrogênio começa em -1,5 V e a evolução de oxigênio em +2,3 V versus Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

Em função dessas propriedades únicas, o eletrodo de diamante dopado com boro está sendo cada vez mais utilizado no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de compostos orgânicos [61, 111-113] e inorgânicos [114, 115] em diversas matrizes [116, 117].

1.6.1 Pré-tratamento do eletrodo de DDB

As superfícies dos filmes de DDB recém preparadas apresentam hidrogênios terminais. Entretanto, conforme Yagi *et al.* [118], esta terminação pode ser facilmente substituída por oxigênio, por exposição da superfície a um plasma de oxigênio ou a uma solução de ácido forte em ebulição; para isso também se passou a usar polarizações anódicas. Assim, podem-se ter eletrodos de DDB com terminações superficiais tanto de hidrogênio como de oxigênio [3, 8, 119]. Neste contexto, muitos estudos mostram que as propriedades eletroquímicas dos eletrodos de DDB são bastante sensíveis à terminação superficial [61, 120].

Suffredini *et al.* [121] utilizando um eletrodo de DDB, estudaram o comportamento eletroquímico de pesticidas após um pré-tratamento catódico da superfície do eletrodo. O tratamento do eletrodo de área igual a $0,62 \text{ cm}^2$ foi feito utilizando ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando-se $-3,0 \text{ V}$ por 30 minutos. Os resultados destas investigações demonstraram que a resposta eletroquímica do eletrodo de DDB é extremamente afetada pelo tipo de pré-tratamento aplicado à superfície do eletrodo sendo que esse tratamento promoveu o aumento de sua atividade eletroquímica.

Com o aparecimento do eletrodo de DDB foram surgindo publicações nas mais diversas áreas da eletroquímica, evidenciando o interesse de pesquisadores por esta ferramenta [122]. Apesar disso, os resultados obtidos com eletrodos de DDB em diferentes laboratórios não podem ser comparados totalmente, pois dependem de diversas variáveis, tais como: propriedades físicas, químicas e eletrônicas inerentes do material, além disso, não existe uma padronização nas características dos filmes do diamante comercial. Tais propriedades são afetadas pela quantidade e tipo de dopante, fatores morfológicos e defeitos no filme, presença de impurezas (carbono sp^2), orientação cristalográfica e terminação da superfície (hidrogênio, oxigênio, entre outros) [123]. A terminação superficial do eletrodo de

DDB pode ser modificada por tratamentos eletroquímicos (redução da água para produzir terminações de hidrogênio e oxidação da água para produzir terminações oxigênio).

A cinética das possíveis reações que ocorrerão na superfície do eletrodo é diretamente influenciada pela terminação superficial do eletrodo (oxigênio ou hidrogênio). Granger e Swain [124, 125] estudaram a influencia das terminações superficiais do eletrodo de DDB na velocidade de transferência eletrônica do par reversível ferro/ferricianeto. Os autores observaram que há uma especificidade nas interações do par $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ com hidrogênios na superfície do eletrodo de diamante e tais interações são bloqueadas quando a superfície contém terminações oxigênio “efeito de bloqueio de sítios” produzidos por espécies carbono-oxigênio.

1.7. Objetivos

1.7.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método simples e rápido para análise simultânea de paracetamol (PA) e cafeína (CA) em formulações farmacêuticas usando Análise por Injeção em Fluxo com detecção Amperométrica de Múltiplos Pulsos (FIA-AMP).

1.7.2 Objetivos Específicos

- Adaptação de um eletrodo de DDB em uma célula em fluxo do tipo “*wall-jet*”;
- Investigar a melhor condição para a limpeza eletroquímica do eletrodo;

- Investigar os pulsos de potenciais utilizados na análise simultânea de PA e CA em FIA com detecção amperométrica;
- Otimização de parâmetros do sistema FIA: vazão, volume de injeção, tempo de aplicação dos pulsos de potenciais;
- Validação da metodologia proposta: linearidade, repetibilidade, limites de detecção e quantificação, estudos de adição e recuperação, frequência analítica e comparação dos resultados obtidos com o método proposto aos obtidos por HPLC;

Capítulo 2

Parte Experimental

2. Parte Experimental

2.1- Soluções e reagentes

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada (resistividade $> 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$) obtida de sistema de purificação Milli-Q.plus (Millipore). As soluções padrão de paracetamol (Synth) e cafeína (Synth) foram preparadas com reagentes de grau analítico. Soluções tampão de ácido acético/acetato de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em (pH 4,7) foram utilizadas como eletrólito suporte nos experimentos usando voltametria cíclica e em FIA com detecção amperométrica. Soluções estoque contendo 1940 mg L^{-1} de CA e 1510 mg L^{-1} de PA dos respectivos fármacos foram preparadas e posteriormente diluídas em eletrólito suporte previamente ao uso.

2.2 - Preparo das amostras

As amostras foram adquiridas em drogarias da cidade de Uberlândia. Vinte comprimidos de quatro caixas diferentes foram macerados utilizando-se um almofariz e pistilo de porcelana. As soluções dos fármacos foram preparadas a partir da solubilização de $0,9277 \text{ g}$ em água desionizada (balão de 25 mL). Todas as soluções foram levadas ao ultrassom durante 40 minutos para solubilização completa. Na análise das amostras por FIA-AMP, uma simples diluição em meio do eletrólito foi realizada. Na análise por CLAE, uma filtração prévia foi necessária (filtros de porosidade $0,45 \mu\text{m}$)

2.3- Instrumentação

2.3.1- Sistema eletroquímico – FIA com detecção amperométrica

As medidas amperométricas e de voltametria cíclica foram realizadas utilizando-se o potenciostato/galvanostato μ Autolab type III (Eco Chemie - Metrohm). Uma célula eletroquímica do tipo “wall-jet” com os três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) posicionados foi utilizada nos estudos em sistema em fluxo. Como eletrodos de referência, auxiliar e trabalho foram usados Ag/AgCl (KCl saturado) [126], um fio de platina e diamante dopado com boro (DDB), respectivamente.

2.3.2. Análises cromatográficas

As análises comparativas por CLAE foram realizadas utilizando o equipamento Shimadzu LC-10VP equipado com um detector espectrofotométrico UV/vis (SPD-10AV), uma coluna LC (Lychrispher 100 A° RP18-C18, 250 mm x 4,6mm, 5 μ m), um degaseificador (DGU-20A5), um injetor e uma bomba (LC-10AD-VP). A fase móvel foi composta de acetonitrila e água (20:80, v/v) com o pH ajustado em 2,1 com ácido fosfórico. A vazão utilizada foi de 1,0 mL min⁻¹. O detector foi fixado em 207 nm [45].

2.3.3 - Construção do Eletrodo DDB

O substrato para construção do eletrodo de trabalho utilizado no presente estudo foi adquirido da empresa Adamant Technologies (La Chaux-de-Fonds – Suíça). Trata-se de um substrato condutor de silício de 1mm de espessura coberto em um dos lados com um filme de diamante dopado com boro (~ 8000 ppm) de 1,2 μ m de espessura. O lado oposto não é metalizado.

Os estudos iniciais foram realizados com o eletrodo de DDB construído conforme apresentado na Figura 1.

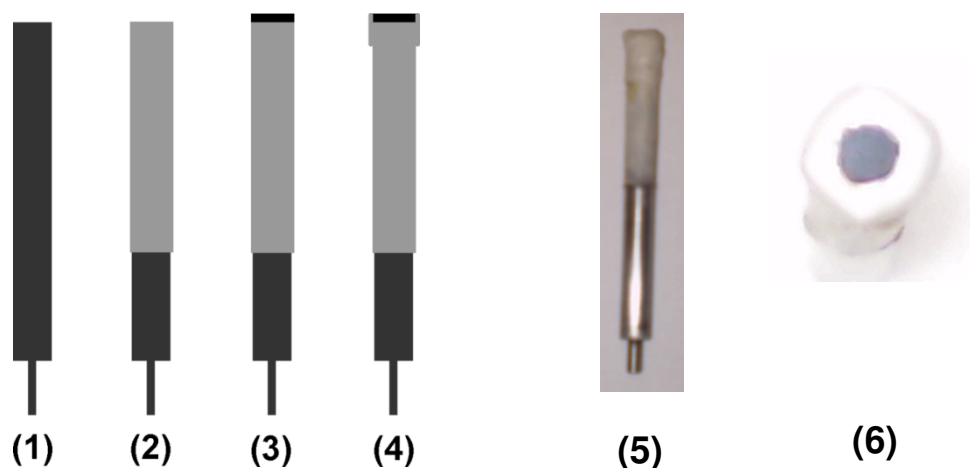


Figura 1: (1-4) Etapas envolvidas na construção do eletrodo DDB; (5) Imagem do eletrodo; (6) Imagem da área de DDB definida com o filme de PVC.

As etapas envolvidas na construção do eletrodo de DDB são as seguintes:

- (1) Bastão cilíndrico de aço (9,0 cm de comprimento e 0,8 cm de diâmetro);
- (2) Isolamento elétrico do bastão com uma emulsão de PVC previamente dissolvido em THF em um béquer com agitação magnética (sucessivos mergulhos);
- (3) Remoção do filme de PVC da extremidade superior e fixação do substrato de DDB com cola de prata;
- (4) Uma emulsão de PVC foi aplicada com pincel para isolamento das extremidades do substrato deixando exposta somente a parte superior do substrato de DDB.

Este eletrodo foi construído neste formato para que fosse possível inserir o mesmo em uma célula em fluxo desenvolvida em nosso laboratório [127]. Este eletrodo foi usado com sucesso nos estudos iniciais deste trabalho. Porém, após algum tempo de uso, o eletrodo passou a apresentar correntes residuais elevadas. Provavelmente devido a um problema de infiltração da solução em estudo entre o filme de PVC (adesividade limitada) e a superfície de DDB. Devido a isto, uma nova célula em fluxo foi construída. A Figura 2 apresenta a imagem da célula com (A) e sem (B) tampa.

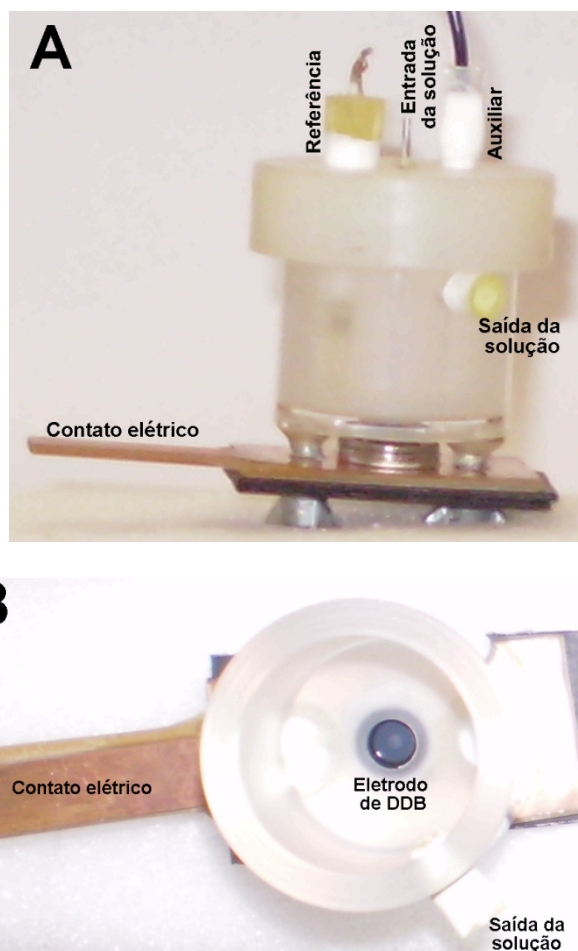


Figura 2. Imagem do detector usado no sistema FIA com (A) e sem (B) a tampa.

A célula consiste em tubo de acrílico com um orifício interno de diâmetro igual a 2,3 cm. Na parte inferior, uma peça de DDB foi posicionada com auxílio de um anel de borracha com diâmetro de 5,4 mm. A peça retangular de DDB (8 x 8 mm) é pressionada sobre o anel de borracha com auxílio de uma peça retangular de circuito impresso de cobre e dois parafusos colados no fundo do tubo de acrílico. Na parte superior (na tampa) são posicionados o eletrodo de referência, auxiliar (platina) e um tubo de aço inoxidável utilizado para introdução da solução transportadora até a face do eletrodo. Nesta nova configuração, o eletrodo de DDB passou a apresentar correntes residuais menores e reprodutíveis. Procedimentos de limpeza e ativação passaram a ser mais simples e rápidos,

sendo que 30 minutos eram suficientes para limpeza e ativação do eletrodo. Nesta célula, a área do eletrodo é de 22,9 mm².

2.3.4 - Limpeza eletroquímica do eletrodo de DDB

Como o substrato condutor é coberto com uma fina película de DDB, procedimentos de limpeza mecânica (polimento) não são possíveis com este tipo de eletrodo. A opção disponível para este material é a limpeza eletroquímica (eletropolimento). Neste trabalho, os melhores resultados foram obtidos utilizando um pré-tratamento catódico aplicando - 3,0 V versus Ag/AgCl durante uma hora em solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, conforme descrito na literatura [61]. Finalmente o eletrodo é imerso em etanol por 15 minutos e está pronto para ser usado. Antes de ser usado, o eletrodo era testado em solução de ácido acético 0,1 mol L⁻¹ com voltamogramas cíclicos (0,0 a +1,7 V) sucessivos até estabilização da corrente em níveis baixos (na ordem de alguns microamperes).

2.3.5 - Construção do eletrodo de referência

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 oxidação (0,3 V versus Ag/AgCl) do fio de prata em meio de HCl 0,1 mol L⁻¹ durante uma hora. Após a eletrodeposição, o fio de Ag/AgCl foi inserido em uma ponteira de micro pipeta de 100 µL, a qual foi obstruída na sua extremidade menor por meio de uma junção porosa (separador de bateria) e preenchida com uma solução saturada de KCl e Ag, constituindo dessa forma o mini-referência [126].

2.3.6 - Sistema FIA

O sistema FIA utilizado é constituído de linha única e composto basicamente por um sistema propulsor, um injetor, um detector eletroquímico e tubos de polietileno com 1,0 mm de diâmetro interno de 100 cm de comprimento. O esquema do sistema FIA com detecção eletroquímica está apresentada na Figura 4.

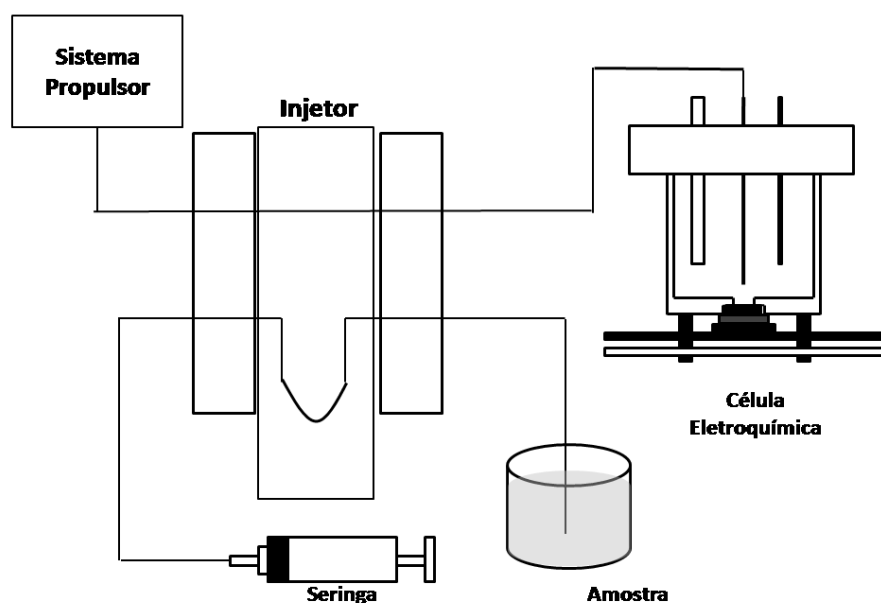


Figura 3: Esquema do sistema FIA utilizado.

O sistema de propulsão foi construído no próprio laboratório, utilizando uma bomba pneumática simples (bomba de aquário) e controlando a vazão pela pressão gerada através de uma coluna de água [128]. Este sistema é eficiente e pode substituir o uso de bombas peristálticas, que 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 4 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).

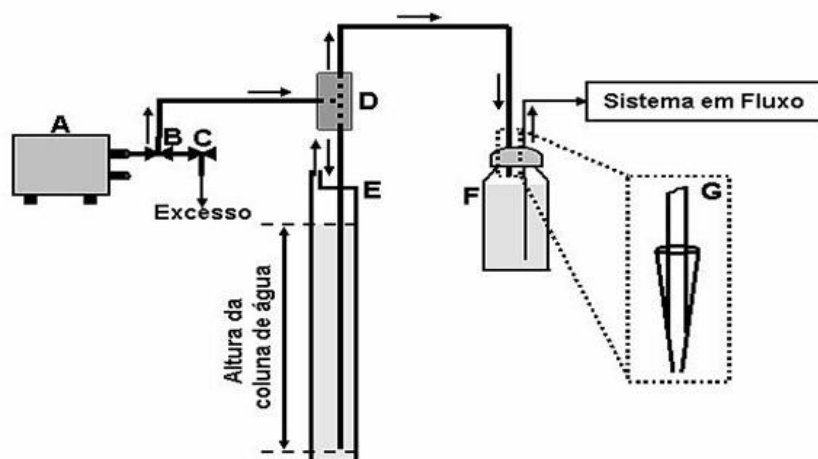


Figura 4: Esquema do sistema de controle de vazão usado no trabalho. (A) Mini-compressor de ar; (B, C) Válvulas usadas em aquarismo; (D) Junção de acrílico tipo T; (E) Tubo de PVC – coluna de água; (F) Reservatório do eletrólito transportador; (G) Vista ampla

Na Figura 5 é apresentada uma imagem parcial do sistema FIA-AMP usado no presente trabalho.

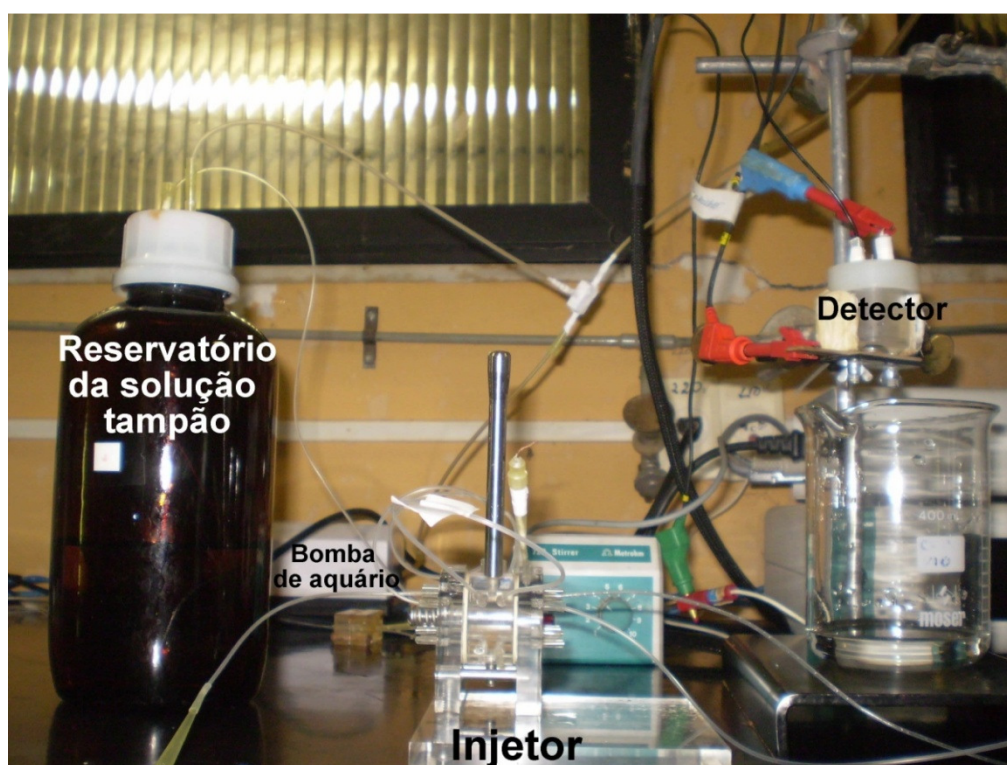


Figura 5. Imagem parcial do sistema FIA-AMP usado no presente estudo.

Capítulo 3

Resultados e Discussões

3.1. Comportamento eletroquímico da CA e PA

Inicialmente, o comportamento eletroquímico da CA e do PA foi estudado usando a técnica de voltametria cíclica (VC) e DDB como eletrodo de trabalho. A varredura foi registrada na faixa de trabalho entre -1,0 a 1,8 V vs Ag/AgCl em meio de solução de ácido acético/acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,7). A opção inicial por este conjunto (eletrodo e eletrólito) se deve a um trabalho publicado recentemente onde PA e CA foram quantificados simultaneamente em formulações farmacêuticas por voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial [61]. A Figura 6 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrólito sem (a) e com a adição de 7,5 mmol L⁻¹ de PA (b) e 9,6 mmol L⁻¹ de CA (c).

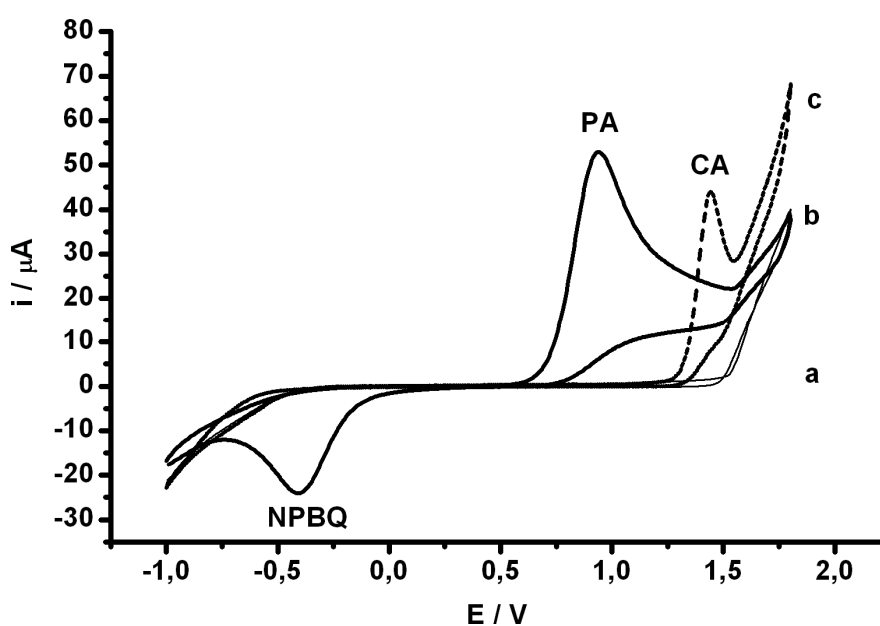


Figura 6: Voltamogramas cíclicos obtidos sob eletrodo de DDB em solução tampão ácido acético/acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH 4,7) sem (a) e com a adição de 7,5 mg L⁻¹ PA (b) e de 9,6 mg L⁻¹ de CA (c). Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

O PA apresenta um comportamento quase-reversível neste sistema, com um pico de oxidação máximo em +0,95 V e de redução do produto gerado, o N-acetil-p-

benzoquinonaimina (NPBQ), em -0,40 V [12]. A Figura 7 apresenta o mecanismo de oxidação/redução eletroquímica do PA.

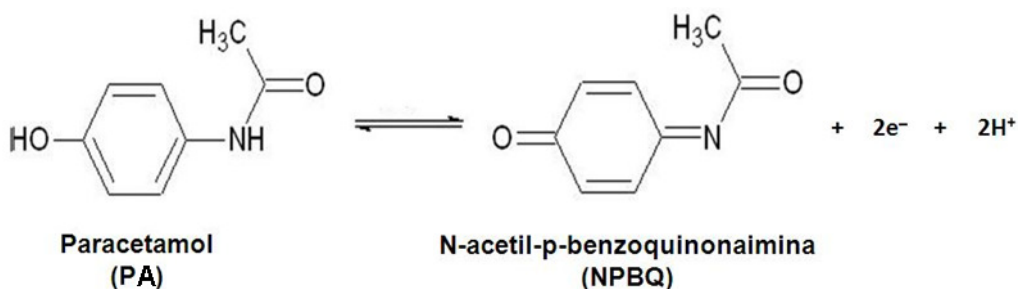


Figura 7: Mecanismo de oxidação/redução eletroquímica do PA.

A Figura 8 apresenta o mecanismo de oxidação eletroquímica da CA [129, 130]. A primeira etapa envolve $2e^-/2H^+$ na oxidação do C₈ e redução do N₉ formando o ácido úrico substituído. Imediatamente ocorre uma segunda oxidação envolvendo novamente $2e^-/2H^+$ originando o 4,5-diol (análogo do ácido úrico), o qual se fragmenta rapidamente e se torna eletroquimicamente inativo. Desta forma, a CA apresenta um comportamento irreversível com apenas um pico de oxidação em torno de +1,45 V (Fig. 6).

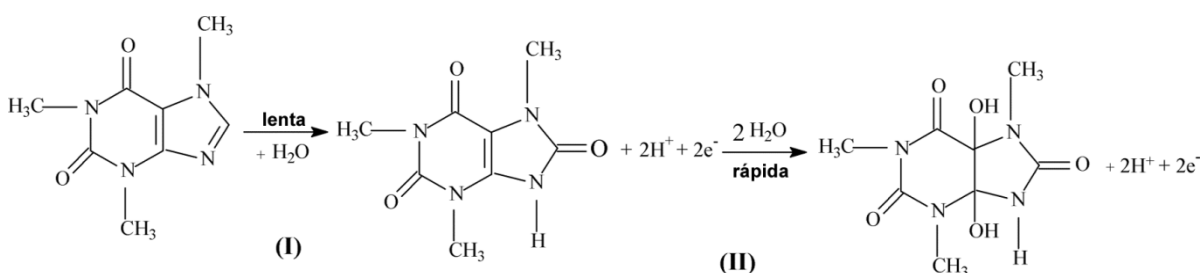


Figura 8: Mecanismo de oxidação eletroquímica da cafeína[129].

Como pode ser observado, existe uma boa separação (cerca 0,45 V) entre os picos de oxidação do PA (+1,10 V) e da CA (1,55 V) usando o eletrodo de DDB em meio de tampão ácido acético/acetato 0,10 mol L⁻¹.

Os estudos realizados até aqui foram no modo estacionário, sendo que o objetivo do trabalho é adaptar a análise simultânea de PA e CA em fluxo (condições hidrodinâmicas). Diante disto, outro experimento foi realizado para avaliar o comportamento eletroquímico do PA e CA com a aplicação de 12 pulsos de potenciais crescentes, sequenciais e cíclicos em função do tempo usando FIA-AMP. O experimento foi dividido em duas etapas, pois o programa do equipamento utilizado aplica no máximo de 10 pulsos de potenciais em função do tempo. O resultado obtido após a injeção de uma solução contendo somente PA e de outra contendo somente CA é apresentado na Figura 9.

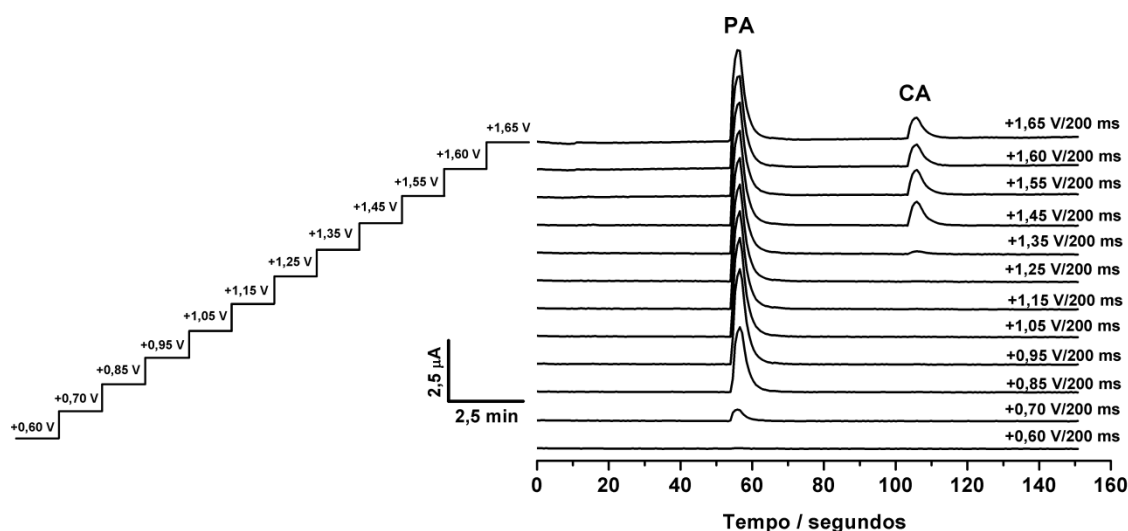


Figura 9: Escada de pulsos de potenciais aplicados de forma cíclica em função do tempo (a esquerda) e os respectivos amperogramas (a direita) obtidos para injeção em FIA de uma solução contendo $34,3 \text{ mg L}^{-1}$ de PA e $4,9 \text{ mg L}^{-1}$ de CA usando diamante dopado com boro (DDB) como eletrodo de trabalho. Eletrólito: Tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Vazão: $3,8 \text{ mL min}^{-1}$. Volume injetado: $300 \mu\text{L}$.

A partir dos resultados obtidos por FIA-AMP (Fig. 9) foi possível montar um gráfico semelhante ao que seria obtido por voltametria linear hidrodinâmica (Figura 10).

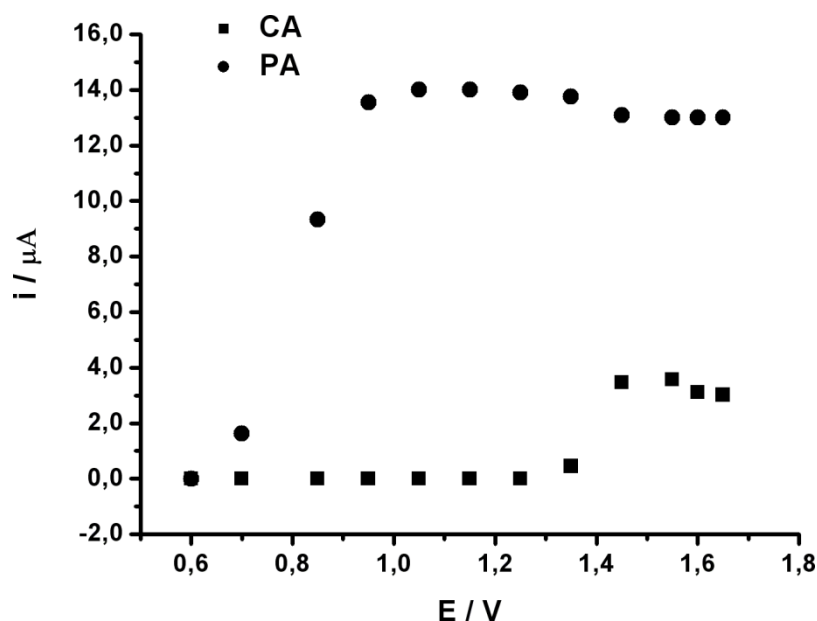


Figura 10: Corrente em função do potencial obtido plotando as correntes de pico com seus respectivos pulsos de potenciais. Dados obtidos a partir dos amperogramas da Fig. 9. Eletrólito: Tampão acetato 0,1 mol L⁻¹. Vazão: 3,8 mL min⁻¹. Volume injetado: 300 μL.

Como pode ser observado, em condições hidrodinâmicas, a oxidação do PA se inicia em torno de +0,70 V atingindo a corrente limite máxima em +1,10 V e a oxidação da CA se inicia em torno de +1,35 V atingindo a corrente limite máxima em +1,45 V versus Ag/AgCl. Vale salientar que este experimento é mais rápido de ser efetuado, pois duas injeções são suficientes para obtenção do resultado.

3.2. Investigação para identificação dos pulsos de potenciais para análise simultânea de PA e CA em FIA com detecção por AMP

Usando o método FIA com detecção amperométrica a potencial constante é possível, em princípio, determinar PA sem interferência de CA fixando um potencial onde ocorre somente a oxidação do PA (+1,20 V). Em potenciais acima de 1,30 V, ambas as espécies presentes (CA e PA) são eletroquimicamente oxidadas.

Como alternativa para quantificação simultânea de PA e CA, o enfoque do presente trabalho foi direcionado ao uso da detecção AMP acoplada a FIA com aplicação de uma sequência cíclica de pulsos de potenciais em função do tempo. A partir das informações obtidas nas Figuras 9 e 10 e após estudos exploratórios, a aplicação de uma sequência cíclica de três pulsos de potenciais em função do tempo foram otimizados, os quais são relacionados a seguir:

(1) +1,20 V/50ms: oxidação e quantificação seletiva de PA.

(2) +1,55 V/50ms: oxidação de ambos os analitos (CA e PA) e quantificação da CA através da subtração do sinal de corrente medido em + 1,20V (relacionado somente com PA).

(3)+0,40V/50ms: limpeza eletroquímica ou manutenção da superfície do eletrodo de diamante devido à provável adsorção do produto de oxidação do PA ou CA gerado nos pulsos anteriores (1,20 e 1,55 V).

Os pulsos de potenciais adotados na determinação de PA (+1,20 V/50ms) e de CA (+1,55 V/50ms) estão situados após a região de potencial na qual a corrente limite máxima é atingida. Nesta região, pequenas variações no potencial de eletrodo de referência não alteram a corrente detectada e o método tende a ser mais reprodutível

A Figura 11 apresenta o resultado obtido na injeção de uma solução contendo somente PA, outra contendo somente CA e uma terceira contendo ambas as substâncias usando a técnica AMP acoplada a FIA com a aplicação dos pulsos de potenciais relacionados acima. Este experimento foi realizado em meio de tampão ácido acético/acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH 4,7) sob eletrodo de trabalho de DDB com vazão e alça de amostragem em 3,8 mL min⁻¹ e 100 µL, respectivamente. As soluções foram injetadas em triplicata.

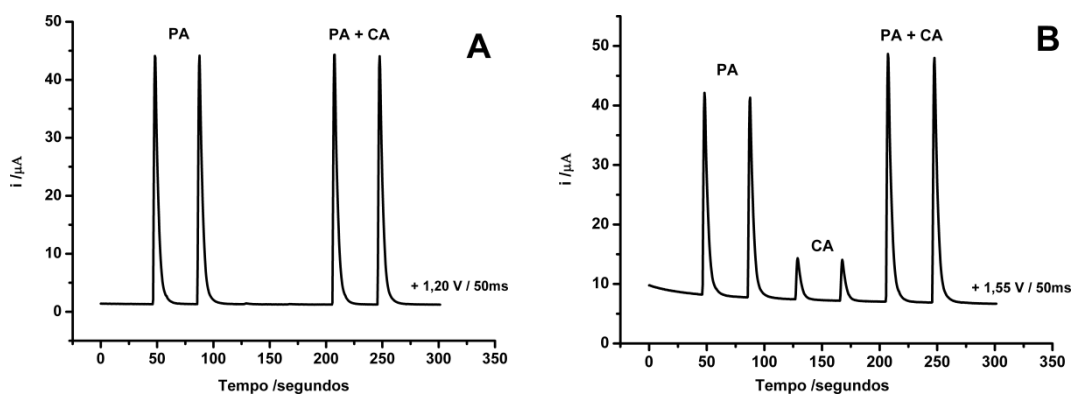


Figura 11: Amperogramas obtidos para injeções em duplicata de soluções contendo somente 60 mg L^{-1} de PA, somente 8 mg L^{-1} de CA e ambas as substâncias nas mesmas concentrações anteriores nos pulsos de potenciais de +1,22 V (A) e +1,55 V (B). Eletrólito: tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7). Eletrodo de trabalho: DDB; Vazão: $3,8 \text{ mL min}^{-1}$; Volume injetado: $100 \mu\text{L}$

Como pode ser observado, o PA é oxidado em ambos os pulsos de potenciais (+1,20 e +1,55 V). No entanto, a CA somente é oxidada em +1,55 V. Outro fenômeno que pode ser observado é que o PA não gera a mesma magnitude de corrente em ambos os pulsos de potenciais, o que impede o uso de uma subtração simples de sinal para ter acesso ao sinal de oxidação relacionado somente com a CA. Uma opção adotada neste trabalho por apresentar resultados satisfatórios foi a seguinte: soluções contendo somente PA são injetadas para determinar a intensidade de corrente deste composto nos dois pulsos de potenciais utilizados (+1,20 e +1,55 V). Desta forma, um fator pode ser calculado:

$$(fator = i_{\text{PA}+1,55 \text{ V}} / i_{\text{PA}+1,2 \text{ V}})$$

Este *fator* é usado para determinar a corrente de oxidação da CA no pulso de potencial de +1,55 V.

$$i_{\text{cafeína}} = i_{+1,55 \text{ V}} - (fator \times i_{+1,20 \text{ V}})$$

3.3. Estudo do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais

Na amperometria de múltiplos pulsos, o tempo de aplicação dos pulsos de potenciais necessitam ser estudados, pois duas componentes de corrente distintas são simultaneamente detectadas: corrente capacitiva, I_C (decorrente do carregamento da dupla camada elétrica) e a corrente faradaica, I_F (devido ao processo eletroquímico no próprio eletrodo) [131]. Na aplicação de pulsos de potenciais rápidos e de elevada amplitude, a I_C gerada pode ser elevada (muito superior a faradaica). A I_C é alta no início da aplicação do pulso de potencial e decresce rapidamente (forma exponencial) em função do tempo. Como a medida da corrente sempre é realizada no final do tempo de aplicação do pulso de potencial, a I_C é consideravelmente menor no momento da leitura (mas ainda existe). No entanto, no mesmo amperograma (tempo de aplicação dos pulsos de potenciais constantes), a contribuição da I_C é constante, antes, durante e após a passagem da zona da amostra que contém o analito de interesse. Consequentemente, durante a passagem da zona da amostra é possível monitorar apenas a contribuição da I_F para o sinal amperométrico. A intensidade da I_F também tende a diminuir em função do aumento no tempo de aplicação do pulso de potencial, mas quanto maior a vazão do sistema ou menor o tempo de aplicação do pulso de potencial, menor é esta queda. Portanto, um estudo de corrente versus tempo de aplicação dos pulsos de potenciais foi realizado. Neste estudo, a vazão foi fixada em $4,5 \text{ mL min}^{-1}$.

As Figuras 12 e 13 apresentam, respectivamente, os resultados obtidos na oxidação de três soluções diferentes, uma contendo somente PA, outra somente CA e uma terceira PA+CA em função dos tempos de aplicação dos pulsos de potenciais de +1,20 V e +1,55 V.

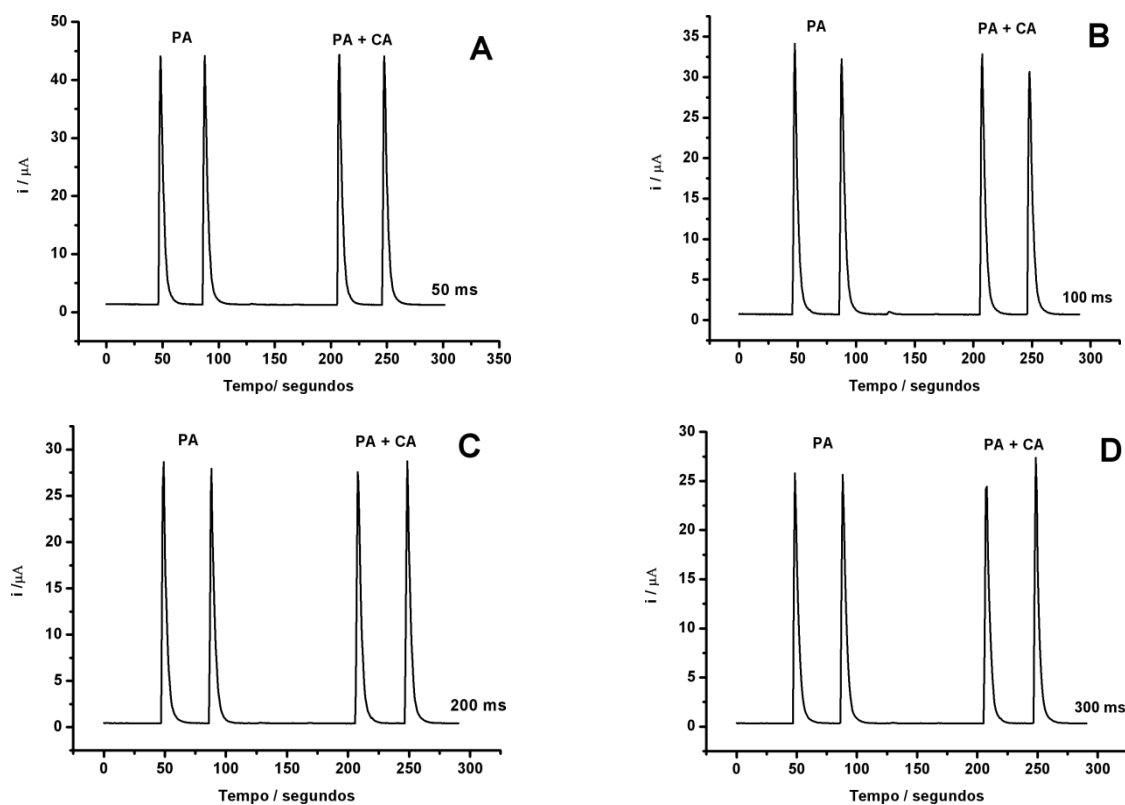


Figura 12: Estudo do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais com injeções em duplicata de três soluções, uma contendo somente 60 mg L^{-1} de PA, outra somente 8 mg L^{-1} de CA e a terceira simultaneamente PA+CA ($60 + 8 \text{ mg L}^{-1}$) no tempo de (A) 50 ms, (B) 100 ms, (C) 200 ms e (D) 300 ms no pulso de potencial de $+1,20 \text{ V}$. Eletrólito: tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7). Eletrodo de trabalho: DDB; Vazão: $4,5 \text{ mL min}^{-1}$; Volume injetado: $100 \mu\text{L}$.

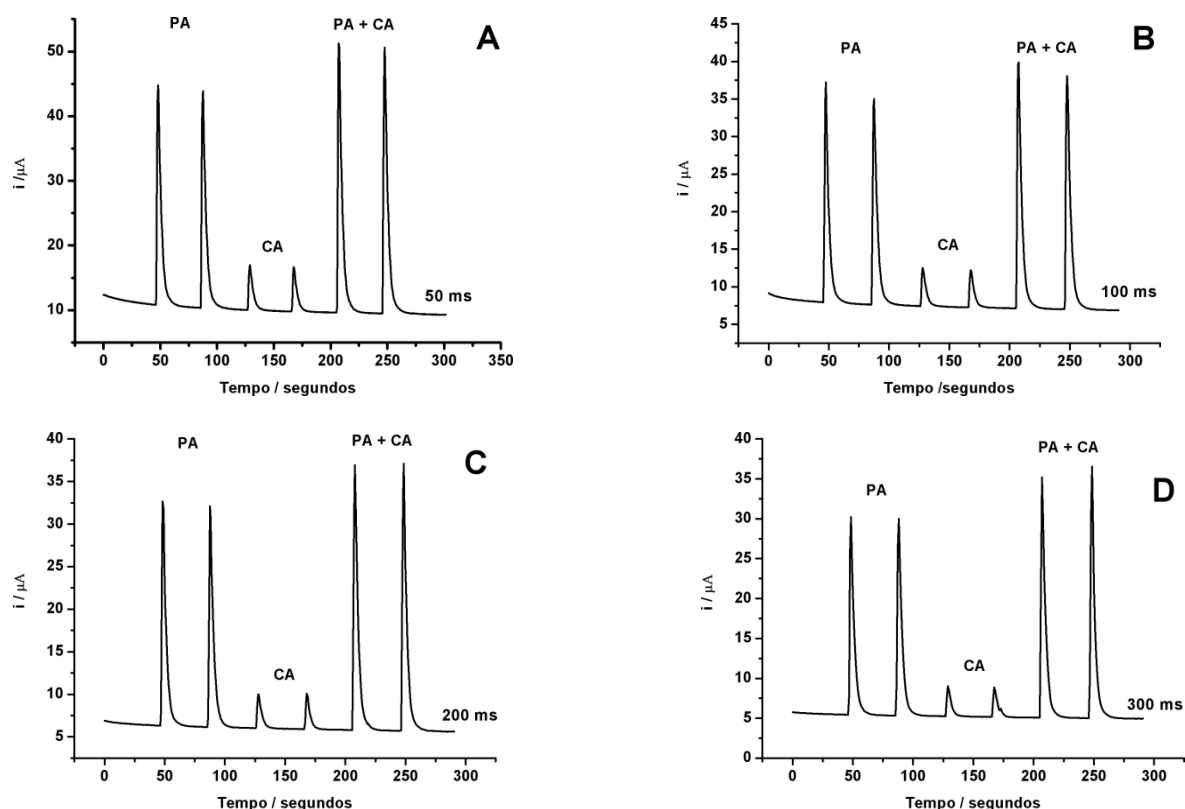


Figura 13: Estudo do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais com injeções em duplicata de três soluções, uma contendo somente 60 mg L^{-1} de PA, outra somente 8 mg L^{-1} de CA e a terceira simultaneamente PA+CA ($60 + 8 \text{ mg L}^{-1}$) no tempo de (A) 50 ms, (B) 100 ms, (C) 200 ms e (D) 300 ms pulso de potencial de $+1,55 \text{ V}$. Demais condições: idem Fig. 12.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a corrente de oxidação de PA, CA e PA+CA em função do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais ($+1,20$ e $+1,55 \text{ V}$). A Tabela também apresenta o *fator* (razão) entre as correntes de oxidação do PA detectadas nos pulsos de potenciais de $+1,55$ e $+1,20 \text{ V}$ ($i_{\text{PA em } +1,55 \text{ V}}/i_{\text{PA em } +1,20 \text{ V}}$).

Tabela 4: Corrente de oxidação de PA, CA e PA+CA em função do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais.

	1,20 V			1,55 V			Fator
Tempo/ms	PA	CA	PA+CA	PA	CA	PA+CA	$i_{PA+1,55\text{ V}}/i_{PA+1,20\text{ V}}$
50	43,1	0	43,1	34,2	7,0	42,0	0,793
100	31,6	0	31,3	27,5	5,1	32,8	0,870
200	28,1	0	28,8	26,4	4,2	31,6	0,939
300	25,5	0	25,2	25,2	4,8	30,5	0,988

Unidade de corrente: μA

Apesar da vazão do sistema FIA ser relativamente alta ($4,5\text{ ml min}^{-1}$), o aumento no tempo de aplicação dos pulsos de potenciais (entre 50 e 300 ms) gerou queda na corrente de oxidação de PA e CA em ambos os potenciais, com exceção para a oxidação da CA entre 200 e 300 ms. Provavelmente isto ocorre devido a área do eletrodo de trabalho ser relativamente grande ($22,9\text{ mm}^2$) e/ou da configuração da célula em fluxo. A vazão do sistema não repõe o material na superfície do eletrodo na mesma velocidade com que está sendo eletroquimicamente consumido. Além disso, para tempos relativamente curtos a corrente capacitiva é alta. Provavelmente em tempos de pulsos maiores, a corrente tende a estabilizar em um valor constante. Tempos maiores não foram estudados por apresentarem restrição em relação ao seu uso na prática, conforme será discutido posteriormente (número de pontos de corrente adquiridos).

Outra informação obtida a partir destes estudos é a relação (*fator*) existente entre as correntes de oxidação do PA nos pulsos de potenciais de +1,55 e 1,20 V. Como pode ser observado, a corrente de oxidação do PA é menor em +1,55 V nos tempos de pulso de 50, 100 e 200 ms. No tempo de 300 ms, ambas as correntes são iguais. Este fenômeno ocorre devido ao fluxo da solução (em 50, 100 e 200 ms) não ser suficientemente alta para repor integralmente o PA consumido em +1,20 V. No entanto, em tempos de pulso maiores que 200 ms (300 ms) há tempo hábil para que a reposição ocorra, uma vez que as correntes

medidas são iguais. Nesse caso, o transporte de massa torna-se o limitante do processo e não mais a cinética. Na hipótese do tempo de 300 ms ser utilizado, uma simples subtração de corrente ($i_{1,20V} - i_{1,55V}$) permite a obtenção da corrente de oxidação da CA em +1,55 V. Posteriormente, a opção pelo tempo de 50 ms será devidamente discutida.

Além da influência na magnitude da corrente amperométrica, o tempo de aplicação dos pulsos de potenciais também define o número de vezes que a corrente é adquirida pelo programa que controla o potenciostato durante o tempo que um pico transiente é gerado numa injeção de amostra ou solução padrão. Em um estudo de otimização prévio ficou definido que um pico é adquirido sem deformação significativa quando este apresentar no mínimo 20 pontos. 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, consideremos os seguintes pulsos de potenciais utilizados no experimento apresentado da Fig. 12 na injeção de 100 μL de solução com a aplicação dos seguintes pulsos de potenciais:

- (1) +1,20 V / 50 ms: oxidação do PA;
- (2) + 1,55 V / 50 ms: oxidação simultânea de PA e CA;
- (3) +0,40 V / 300 ms: limpeza eletroquímica do eletrodo de DDB.

A soma total do tempo dos pulsos de potenciais é de 400 ms, o que significa que um ponto é adquirido (medida de corrente) em cada amperograma (3 no total) a cada 400 ms (software GPES – Eco Chemie). A Figura 14 apresenta os picos transientes obtidos em função da variação no tempo de aplicação dos pulsos de potenciais na injeção de 100 μL de solução a uma vazão de 4,5 ml min^{-1} aplicando a seguinte sequência de pulsos de potenciais:

- 50 ms: (+1,20 V / 50 ms; + 1,55 V / 50 ms; +0,40 V / 300 ms);
- 100 ms: 1,20 V / 100 ms; + 1,55 V / 100 ms; +0,40 V / 300 ms);
- 200 ms: (+1,20 V / 200 ms; + 1,55 V / 200 ms; +0,40 V / 300 ms);

- 300 ms: (+1,20 V / 300 ms; + 1,55 V / 300 ms; +0,40 V / 300 ms).

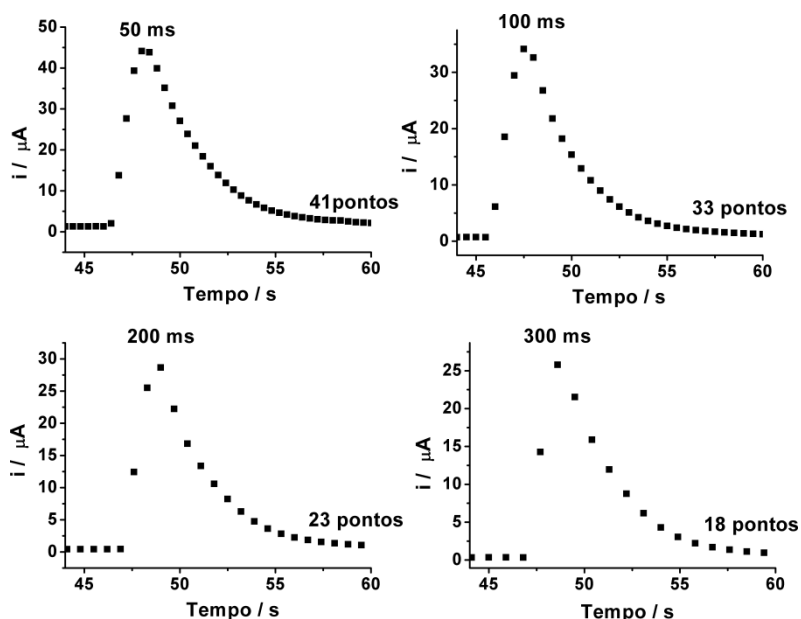


Figura 14. Estudo do número de pontos de aquisição de corrente em função do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais. Vazão: $4,0 \text{ ml min}^{-1}$; Volume injetado: 100 μL .

Como pode ser observado, o número de pontos adquiridos vai diminuindo (vazão e volume de injeção constante) em função do aumento no tempo de aplicação dos pulsos de potenciais. Quando o tempo de aplicação dos pulsos de potenciais (+1,20 e +1,55 V) foi de 300 ms, o número de vezes que a corrente foi medida foi de somente 18 vezes. Neste caso, a repetibilidade do método pode ficar comprometida devido à lentidão na aquisição da corrente, pois existe probabilidade considerável de que não haja aquisição de corrente no momento exato do máximo de corrente do pico transiente. O tempo de contato da amostra ou solução padrão com o eletrodo de trabalho é controlado pela dimensão da alça de amostragem (volume) e pela vazão. Caso o objetivo seja a obtenção de alta frequência analítica, a vazão deve ser alta e o volume injetado o menor possível. Neste caso, a aquisição da corrente precisa ser rápida.

3.4. Estudo da vazão

Estudos do efeito da vazão da solução transportadora (ácido acético/ acetato 0,1 mol L⁻¹) sobre as correntes de oxidação de PA e CA foram investigados. A Figura 15 mostra os respectivos sinais amperométricos de oxidação da CA e PA obtidos em função da variação da vazão entre 0,5 e 6,0 mL min⁻¹.

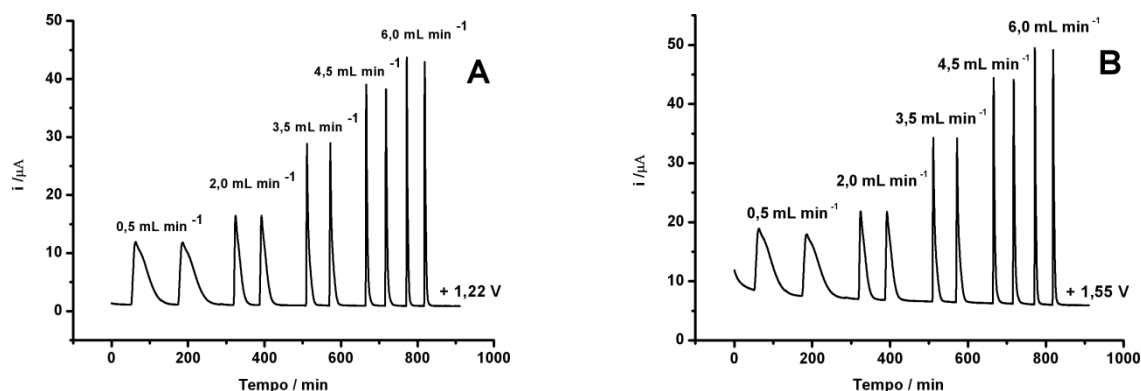


Figura 15: Estudo da vazão com injeções em duplicata de soluções contendo 60,0 e 8,0 mg L⁻¹ de PA e CA, respectivamente. Variação da vazão entre 0,5 e 6,0 mL min⁻¹ nos potenciais de +1,22 V (A) e +1,55 V (B). Eletrodo de trabalho: DDB; Volume injetado: 100μL. Demais condições: idem Fig 12.

Os resultados apresentados na Figura 15 indicam que à medida que a vazão da solução carregadora aumenta, maior é a corrente, tanto de oxidação da CA, quanto de PA. Esse fato pode ser explicado 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 detectado. O sinal deveria alcançar um valor máximo constante, o que não ocorreu, provavelmente, em função da área do eletrodo (22,9 mm²), a qual é relativamente grande e/ou da configuração da célula. Vazões superiores não foram estudadas devido a limitações do sistema de controle da vazão utilizado [128]. A frequência analítica (3600 segundos / tempo total do pico em segundos) foi calculada, respectivamente, em 36, 69, 102, 138 e 211 injeções hora para as

vazões de 0,5; 2,0; 3,5; 4,5 e 6,0 mL min⁻¹. Neste caso, o volume injetado foi de 100 µL de solução.

3.5. Estudo do volume de injeção

Estudos da dependência dos sinais amperométricos com o volume da amostra injetada também foram realizados. Os resultados para a injeção de uma solução contendo CA e PA (8 e 50 mg L⁻¹) em função do volume injetado são apresentados na Figura 16.

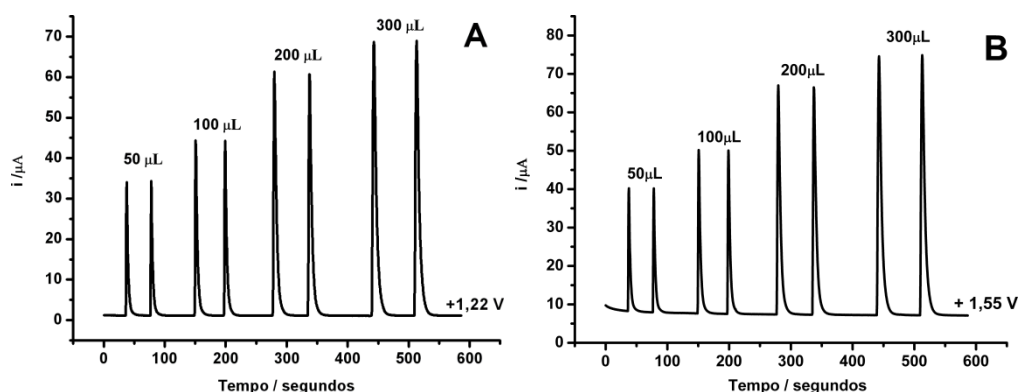


Figura 16: Estudo do volume de injeção com injeções em duplicata de soluções contendo 60,0 e 8,0 mg L⁻¹ de PA e CA, respectivamente nos potenciais de +1,22 V(A) e +1,55 V(B). Vazão: 4,5 ml min⁻¹. Demais condições: idem Fig. 12.

Conforme pode ser observado, os sinais amperométricos em ambos os potenciais aumentam com o aumento do volume injetado. Isto pode ser explicado pelo efeito da dispersão da amostra, desde o ponto de injeção até o detector eletroquímico, que à medida que volume vai aumentando, o efeito passa a ser menor no centro da zona de amostra. Para volumes de amostra menores, a dispersão pode se estender por toda a zona de amostragem, diminuindo assim a intensidade do sinal amperométrico. Neste caso, a frequência analítica foi calculada, respectivamente, em 163, 138, 116 e 105 injeções hora para os volumes injetados de 50; 100; 200 e 300 µL (vazão = 4,5 mL min⁻¹).

3.6. Definição das faixas lineares de resposta para PA e CA

Na Figura 17 (+1,20 V) e 18 (+1,55 V) são apresentados resultados obtidos para a injeção de soluções contendo concentrações crescentes de PA com o objetivo de identificar a faixa onde existe uma relação linear entre concentração e sua respectiva corrente de oxidação. As soluções injetadas continham as seguintes concentrações de PA: a= 1,0; b= 5,0; c= 9,9; d= 19,7; e= 29,5; f= 48,4; g= 71,5; h= 93,8; i= 136,4; j= 176,7; k= 316,3; l = 523,1; m= 755,0 ppm.

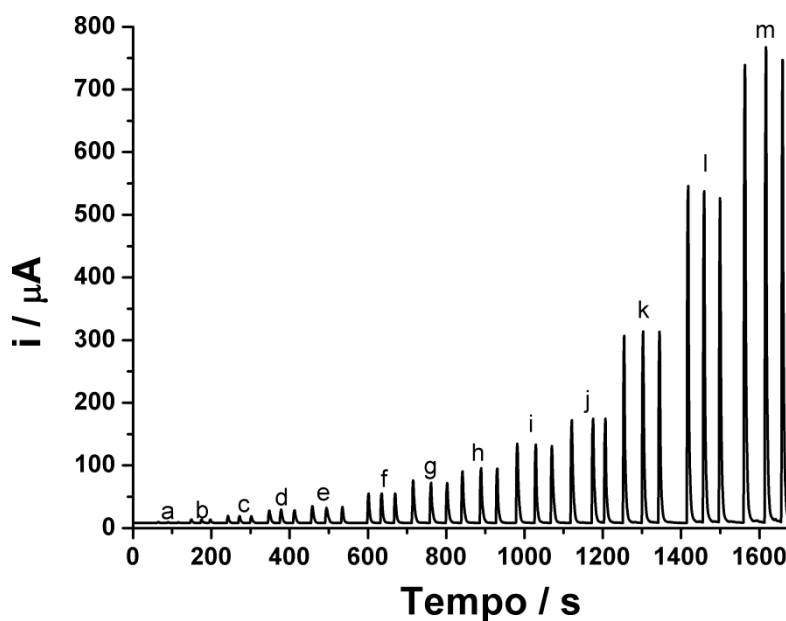


Figura 17. Amperograma obtido para injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes de PA (+1,2 V / 50 ms). Eletrólito: tampão acetato 0,1 mol L⁻¹; pH 4,7. Eletrodo de trabalho: DDB; Vazão: 4,0 mL min⁻¹; Volume injetado: 300 μL

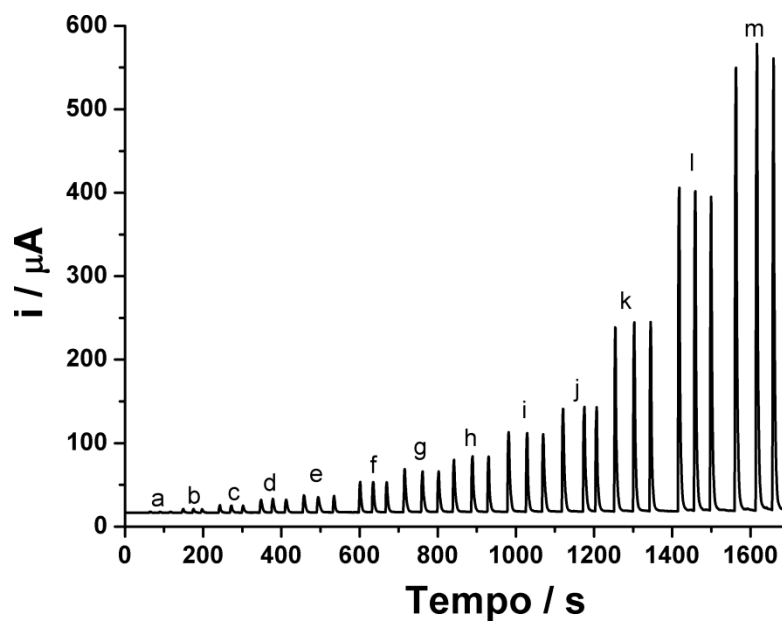


Figura 18. Amperograma obtido para injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes de PA (+1,55 V/50 ms). Demais condições: idem Fig 17.

Nas Figuras 19 e 20 são apresentadas as curvas analíticas obtidas para PA nos pulsos de potenciais de +1,20 V e +1,55 V, respectivamente.

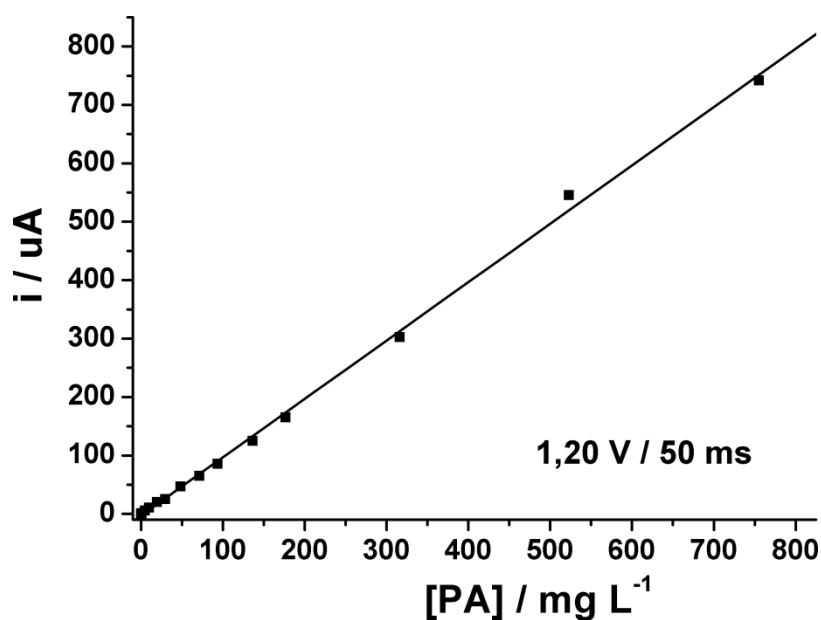


Figura 19. Curva analítica obtida para PA no pulso de potencial de +1,20 V/50 ms.

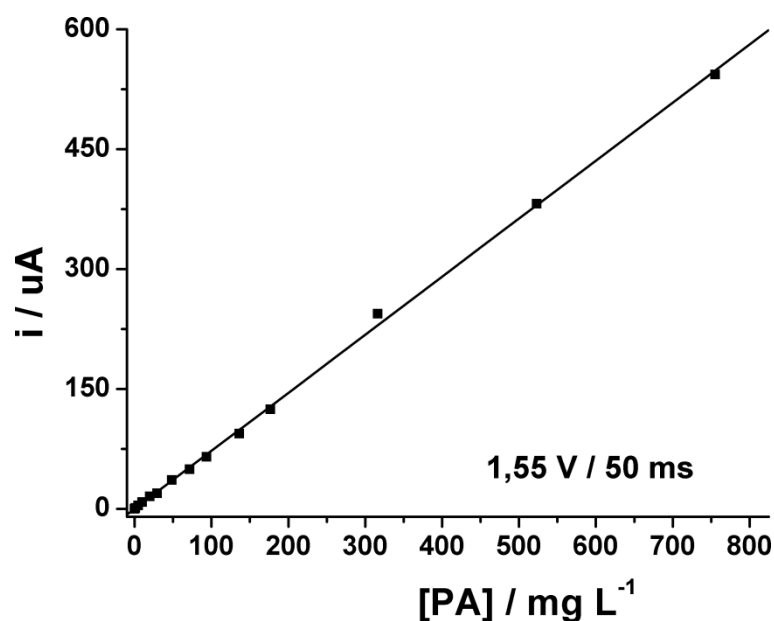


Figura 20. Curva analítica obtida para PA no pulso de potencial de +1,55 V/50 ms.

O PA apresentou uma ampla faixa linear de resposta em ambos os pulsos de potenciais (1 a 755 mg L⁻¹) com a obtenção de um coeficiente linear igual a 0,999 em ambos os casos. A equação de regressão linear para análise de PA no pulso de potencial de +1,20 V é dada por:

$$I (\mu A) = (-3,06 \pm 3,15) + 0,999 \pm 0,0117 C_{PA} (\text{mg L}^{-1})$$

No pulso de potencial de +1,55 V, a equação da regressão linear para análise de PA é dada por:

$$I (\mu A) = (7,58 \pm 5,30) + 0,663 \pm 0,011 C_{PA} (\text{mg L}^{-1})$$

O mesmo estudo também foi realizado para CA. Na Figura 21 são apresentados os resultados obtidos para a injeção de soluções contendo concentrações crescentes de CA com o objetivo de identificar a faixa onde existe uma relação linear entre concentração e sua respectiva corrente de oxidação. No caso da CA, este estudo foi realizado somente no pulso de potencial de +1,55 V, uma vez que em +1,20 V esta substância não é eletroativa. As

soluções injetadas continham as seguintes concentrações de CA: a= 1,0; b= 5,0; c= 9,9; d= 19,7; e= 29,5; f= 48,4; g= 71,5; h= 93,8; i= 136,4; j= 176,7; k= 316,3; l = 523,1 ppm.

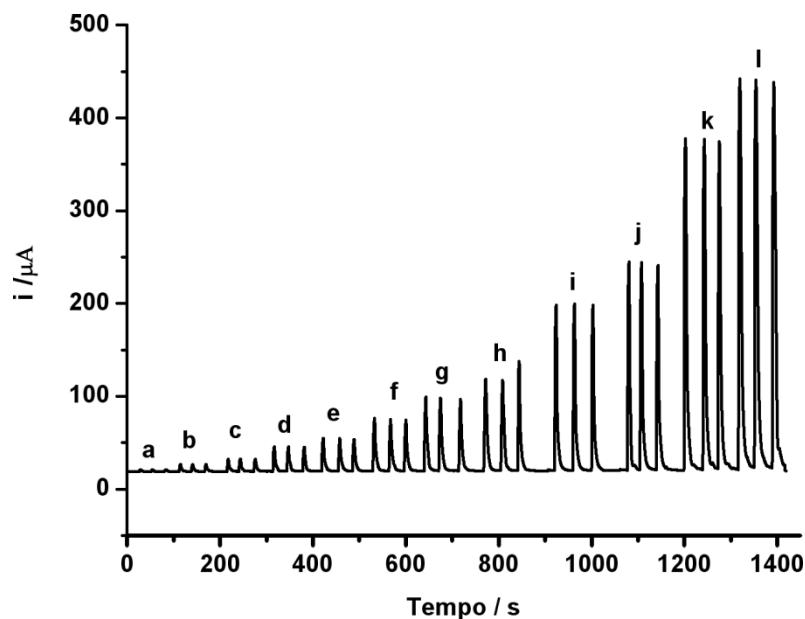


Figura 21: Amperograma obtido para injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes de CA (+1,55 V/50 ms). Demais condições: idem Fig 17.

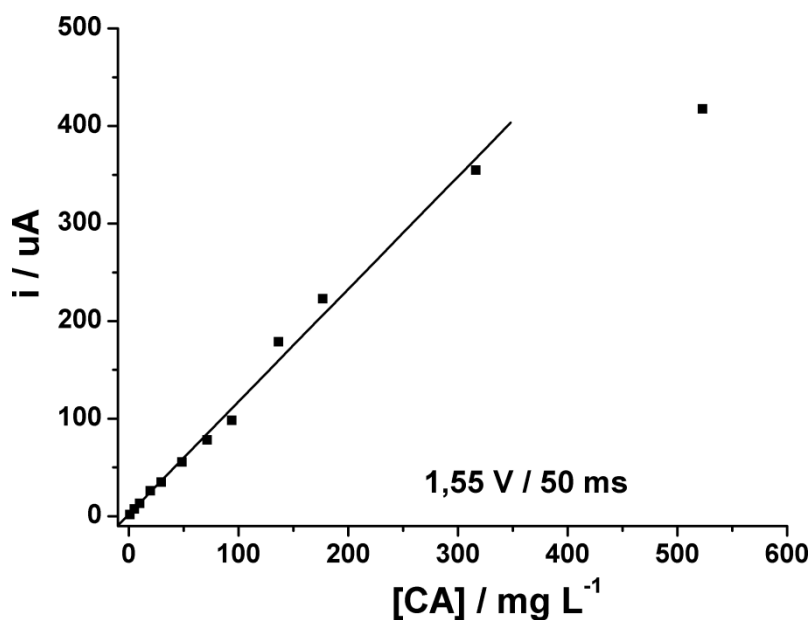


Figura 22: Curva analítica obtida para CA no pulso de potencial de +1,55 V/50 ms. Dados obtidos da Fig. 21.

Através da curva analítica apresentada na Figura 22 foi obtido um coeficiente de correlação linear igual a 0,996. A equação da regressão linear obtida para CA no pulso de potencial de +1,55 V é apresentada abaixo:

$$I (\mu A) = 2,314 \pm 4,307 + 1,153 \pm 0,035 C_{CA} (mg L^{-1})$$

Pelos resultados apresentados, o PA apresenta uma relação linear entre concentração e corrente amperométrica de oxidação numa faixa relativamente grande (1 a 755 mg L⁻¹). A CA, por sua vez, apresenta uma relação linear entre concentração e corrente amperométrica de oxidação numa faixa um pouco mais estreita (1 a 355 mg L⁻¹). Porém, ambos os intervalos podem ser considerados muito bons quando comparados ao método usando voltametria de onda quadrada ou pulso diferencial [61], onde a faixa linear obtida foi menor, sendo 0,07 a 12,5 mg L⁻¹ para PA e de 0,1 a 15,9 mg L⁻¹ para CA.

Os estudos realizados para identificação da faixa de concentração onde o sinal amperométrico de oxidação do PA é linear versus concentração também foram usados para averiguar em que faixa de concentração o *fator* entre a corrente de oxidação do PA em +1,55 V e +1,20 V ($i_{PA \text{ em } +1,55 \text{ V}}/i_{PA \text{ em } +1,20 \text{ V}}$) é constante. Este *fator* será usado para identificar a corrente proveniente da oxidação da CA no pulso de potencial de + 1,55 V [$i_{\text{cafeína}} = i_{1,55 \text{ V}} - (\text{fator} \times i_{1,20 \text{ V}})$]. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 5: Variação do *fator* ($i_{PA+1,55}/i_{PA+1,20}$) em função da concentração de PA.

[PA] /ppm	$i/\mu A$ (+1,20 V)	$i/\mu A$ (+1,55 V)	Fator ($i_{+1,55}/i_{+1,20}$)
1,0	1,273	1,128	0,886
5,0	5,481	4,349	0,793
9,9	10,920	8,4640	0,775
19,7	20,400	15,720	0,770
29,5	25,410	19,580	0,771
48,4	46,940	36,100	0,769
71,5	65,290	49,610	0,760
93,8	85,510	65,030	0,760
136,4	124,800	94,080	0,754
176,7	165,200	124,400	0,753
316,3	302,700	244,000	0,806
523,0	545,400	381,800	0,700
755,0	741,600	543,400	0,733

Os resultados apresentados na Tabela 5 demonstram que o *fator* ($i_{PA+1,55}/i_{PA+1,20}$) a ser usado para identificar a corrente proveniente da oxidação da CA em +1,55 V é relativamente constante numa faixa de concentração extensa de PA (entre 9,9 e 177 mg L⁻¹). Nesta faixa, o valor médio foi calculado em $0,764 \pm 0,003$, o que corresponde a um desvio médio relativo de 0,39 % (n = 8). Caso o intervalo inteiro fosse utilizado, o DPR ainda pode ser considerado bom ($0,771 \pm 0,012$; DPR = 1,55 %; n = 13). Segundo estudos realizados, em cada nova calibração do método para análise simultânea de PA e CA é aconselhável que uma solução contendo somente PA seja injetada para determinação do fator existente entre os sinais adquiridos nos pulsos de potenciais de +1,20 e 1,55 V. Pequenas variações podem ocorrer no fator (entre um experimento e outro) em função de flutuações na vazão, do posicionamento do eletrodo de trabalho na célula eletroquímica e do tempo de aplicação do pulso de potenciais.

3.7. Estudo de repetibilidade

O sucesso de uma metodologia analítica é altamente dependente da repetibilidade do sinal que é adquirido em função do tempo. As Figuras 23 e 24 apresentam os amperogramas obtidos nos pulsos de potenciais de +1,20 e +1,55 V para 31 injeções sucessivas de 300 μL de uma solução contendo simultaneamente CA e PA (6,8 e 52,0 mg L^{-1} , respectivamente). O desvio padrão relativo foi calculado em 0,25 e 0,24 % para os sinais adquiridos em +1,20 e 1,55 V, respectivamente.

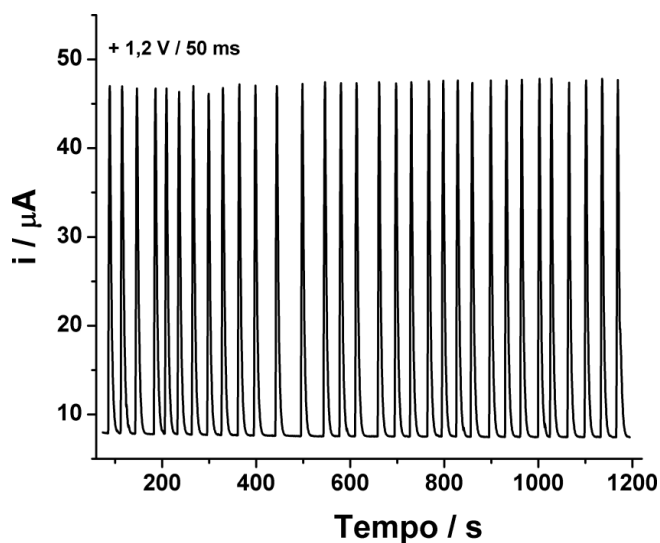


Figura 23: Amperograma obtido no pulso de potencial de +1,20 V para 31 injeções sucessivas de 300 μL de uma solução contendo simultaneamente CA e PA (6,8 e 52,0 mg L^{-1} , respectivamente). Condições experimentais conforme Figura 17.

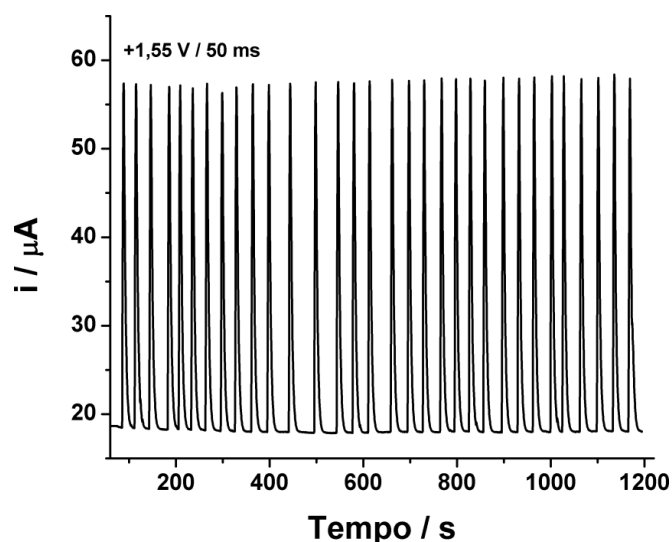


Figura 24. Amperograma obtido nos pulso de potencial de +1,55V para 31 injeções sucessivas de 300 μL de uma solução contendo simultaneamente CA e PA (6,8 e 52,0 mg L^{-1} , respectivamente). Condições experimentais conforme Figura 17.

Os estudos de repetibilidade também foram realizados com a injeção de volumes de solução menores (50, 100 e 200 μL). O estudo foi realizado usando uma solução contendo simultaneamente PA e CA (61,6 e 8,0 mg L^{-1} , respectivamente). A vazão foi fixada em 4,0 mL min^{-1} . A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 6. Estudo da repetibilidade do método em função do volume injetado no sistema FIA.

Volume injetado (μL)	Desvio Padrão Relativo (%)	
	+ 1,20 V	+1,55 V
50 (n=12)	1,23	1,21
100 (n=12)	0,65	0,69
200 (n=12)	0,48	0,57
300 (n=12)	0,25	0,24

Como pode ser observado na Tabela 6, a repetibilidade do método melhora com o aumento no volume de solução injetada no sistema FIA. Por outro lado, o aumento no volume injetado diminui a frequência analítica do método.

3.8. Curvas analíticas para quantificação simultânea de PA e CA

Três parâmetros foram considerados para definir a faixa de concentração a ser usada na construção da curva de calibração para análise simultânea de PA e CA:

- (1) Faixa de concentração onde há linearidade entre concentração e corrente de oxidação detectada, tanto para CA como para PA;
- (2) Faixa de concentração de PA onde o *fator* ($i_{PA+1,55\text{ V}}/i_{PA+1,20\text{ V}}$) é constante;
- (3) Relação entre a concentração de PA e CA existente em formulações farmacêuticas comerciais (PA=500 mg; CA=65 mg; 7,7 vezes).

As Figuras 25 e 26 apresentam os amperogramas obtidos nos pulsos de potenciais +1,20 V e +1,55 V, respectivamente. Foram injetadas soluções com a seguinte composição: **(a, m)**: 5 mg L⁻¹ de PA; **(b, l)**: 177 mg L⁻¹ de PA; **(c)**: 1,0 e 7,6; **(d)**: 4,8 e 37,4; **(e)**: 9,5 e 72,5; **(f)**: 18,0 e 137,3; **(g)**: 25,7 e 195,5 mg L⁻¹ de CA e PA, respectivamente; **(h – k)**: amostras.

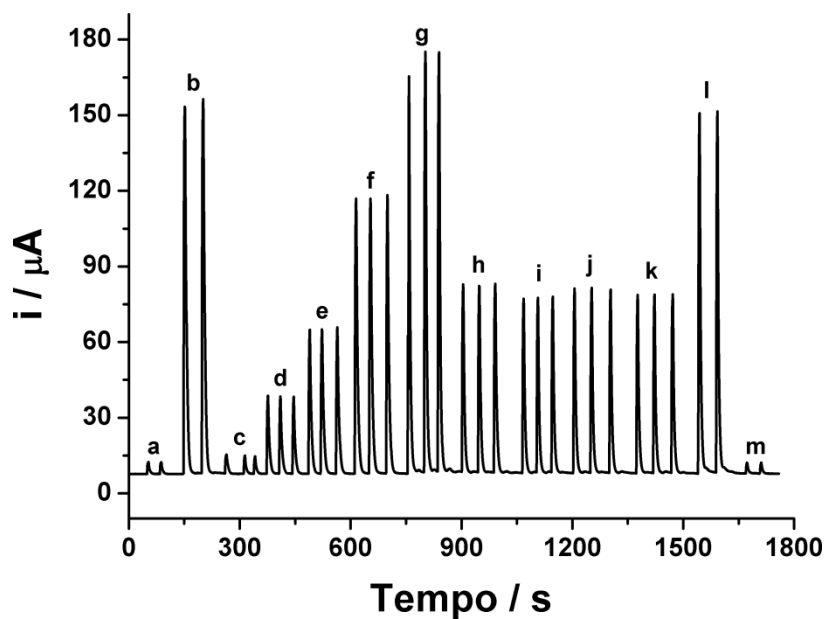


Figura 25: Amperograma obtido em +1,20 V para injeções em triplicatas de soluções contendo somente PA (a, b, l, m), PA e CA (c, d, e, f, g) e amostras (h, i, j, k). Demais condições: idem Figura 17.

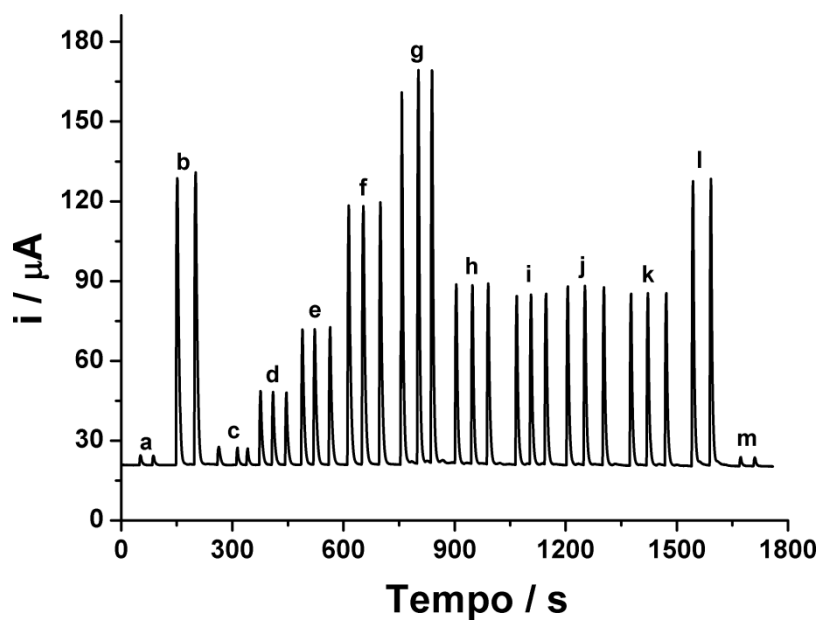


Figura 26: Amperograma obtido em +1,55 V para injeções em triplicatas de soluções contendo somente PA (a, b, l, m), PA e CA (c, d, e, f, g) e amostras (h, i, j, k). Demais condições: idem Figura 17.

A Figura 27 apresenta a curva analítica para quantificação de PA. Os dados foram obtidos a partir da Fig. 25 (+1,20 V / 50 ms).

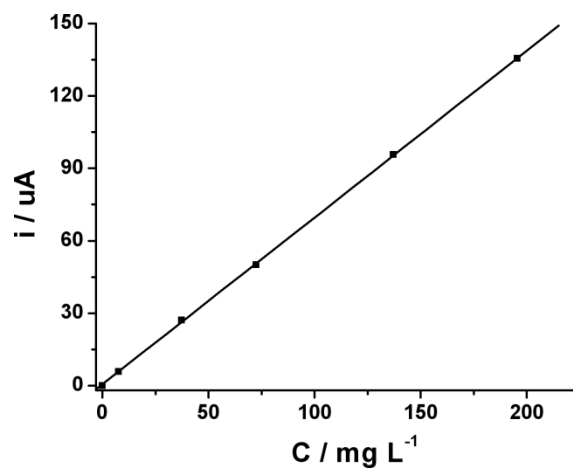


Figura 27: Curva analítica obtida para PA a partir dos dados experimentais da Fig. 25 ($R = 0,9998$).

A Figura 28 apresenta a curva analítica para quantificação de CA. A corrente de oxidação da CA foi obtida usando a seguinte equação:

$$i_{\text{cafeina}} = i_{+1,55 \text{ V}} - (\text{fator} \times i_{+1,20 \text{ V}})$$

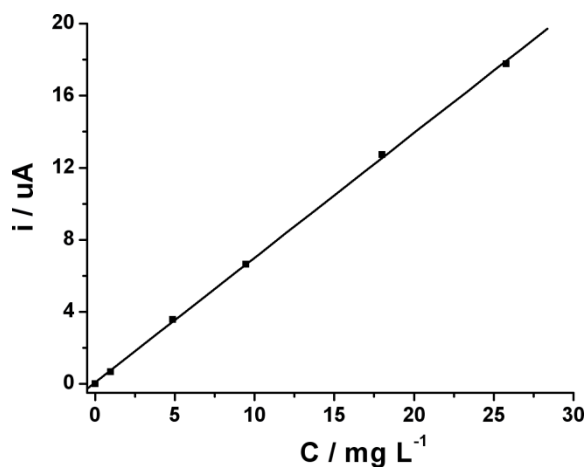


Figura 28: Curva analítica obtida para CA a partir dos dados experimentais das Fig. 25 e 26 ($R = 0,999$).

A equação de regressão linear para análise do PA é dada por:

$$i (\mu\text{A}) = (0,072 \pm 0,089) + 0,693 \pm 0,007 \text{ PA (mg L}^{-1}\text{)} ,$$

A equação de regressão linear para análise da CA é dada por:

$$i (\mu\text{A}) = (0,478 \pm 0,368) + 0,691 \pm 0,004 \text{ CA (mg L}^{-1}\text{)},$$

O limite de detecção e de quantificação foi calculado, respectivamente, em 0,10 e 0,33 mg L⁻¹ para PA e 0,17 e 0,56 mg L⁻¹ para CA. No cálculo do limite de detecção da CA foi utilizado a soma do desvio padrão médio calculado em ambos os amperogramas (+1,20 V e + 1,55 V).

O método proposto foi aplicado na determinação simultânea de PA e CA em formulações farmacêuticas adquiridas em farmácias locais e os resultados obtidos foram comparados aos obtidos por CLAE. A Tabela 7 apresenta os resultados empregando o método proposto e o comparativo.

Tabela 7: Resultados obtidos na análise simultânea de CA e PA em 04 formulações farmacêuticas usando o método proposto e o método comparativo (CLAE) [45].

Amostras	Compostos	Bula (mg)	CLAE (mg) ^a	FIA-AM (mg) ^a	E ₁ ^b (%)	E ₂ ^c (%)
01	PA	500	502 ± 5	493 ± 12	-1	-2
	CA	65	58 ± 2	54 ± 3	-18	-7
02	PA	500	501 ± 9	512 ± 5	2	2
	CA	65	58 ± 3	63 ± 3	-3	8
03	PA	500	515 ± 12	507 ± 15	1	2
	CA	65	57 ± 2	55 ± 2	-15	2
04	PA	500	496 ± 11	500 ± 8	0	1
	CA	65	58 ± 2	56 ± 2	-13	-3

^aMédia de três medidas;

^bErro relativo 1: $100 \times (\text{AMP} - \text{Bula}) / \text{Bula}$;

^cErro relativo 2: $100 \times (\text{AMP} - \text{CLAE}) / \text{CLAE}$.

Pelos resultados apresentados na Tabela 7 constata-se que o método proposto para análise simultânea de PA e CA apresenta resultados similares aos obtidos por CLAE (considerado método padrão segundo a Farmacopéia Americana). Os resultados obtidos por ambos os métodos foram comparados estatisticamente usando o “*teste t de Student*” [132]. Os resultados médios ($n = 3$) de ambos os métodos não apresentam diferença significativa em um nível de confiança de 95%. O $t_{\text{calculado}}$ foi inferior ao t_{tabelado} (3,182) em todas as determinações. Estudos de adição e recuperação também foram realizados. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação na análise simultânea de PA e CA em formulações farmacêuticas usando o método proposto.

Compostos	Conc. na amostra mg	Conc. adicionada mg	Conc. analisada mg	Recuperação (%)
PA	475	239	707	99
PA	475	378	885	104
CA	65,6	27,6	95,0	102
CA	65,6	64,1	128,4	99

Conforme pode ser observado, os resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação estão próximos a 100 %, o que demonstra que a metodologia proposta pode ser utilizada para a determinação simultânea de PA e CA com boa perspectiva de alcançar sucesso na análise de diferentes lotes comerciais de fármacos. Os estudos de adição e recuperação de cada analito na mesma solução de amostra apresentaram recuperações médias de 92 a 103 % para PA e de 94 a 102 % para CA, indicando assim a ausência de interferência de matriz das amostras.

A Tabela 3 apresentada na introdução deste trabalho é repetida abaixo com a inclusão dos resultados obtidos com o método proposto (Tabela 9).

Tabela 9. Métodos eletroquímicos disponíveis na literatura sobre análise simultânea de PA e CA com a inclusão dos resultados obtidos usando o método proposto.

Técnica	Eletrodo	Eletrólito	Faixa linear (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	Ref.
VPD e VOQ	DDB	HAc/Ac pH = 4,5	<i>PA</i> : $5,0 \times 10^{-7}$ a $8,3 \times 10^{-5}$ <i>CA</i> : $5,0 \times 10^{-7}$ a $8,3 \times 10^{-5}$	<i>PA</i> : $4,9 \times 10^{-7}$ <i>CA</i> : $3,5 \times 10^{-8}$	[61]
AdSDPV	EPNTCs	Fosfato pH = 7,0	<i>PA</i> : $2,91 \times 10^{-7}$ a $6,27 \times 10^{-5}$ <i>CA</i> : $2,91 \times 10^{-7}$ a $6,27 \times 10^{-5}$	<i>PA</i> : $2,58 \times 10^{-8}$ <i>CA</i> : $8,83 \times 10^{-8}$	[60]
VOQ	CME	HClO ₄	<i>PA</i> : $1,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ <i>CA</i> : $5,0 \times 10^{-6}$ a $2,5 \times 10^{-4}$	<i>PA</i> : $1,2 \times 10^{-6}$ <i>CA</i> : $2,2 \times 10^{-6}$	[59]
VPD	CV	HClO ₄ /CH ₃ OH	<i>PA</i> : 0 a $3,64 \times 10^{-4}$ <i>CA</i> : 0 a $2,57 \times 10^{-4}$	<i>PA</i> : Não inf. <i>CA</i> : Não inf.	[30]
FIA-AMP	DDB	HAc/Ac pH = 4,7	<i>PA</i> : $6,6 \times 10^{-6}$ a $4,9 \times 10^{-3}$ <i>CA</i> : $5,1 \times 10^{-6}$ a $1,8 \times 10^{-3}$	<i>PA</i> : $6,61 \times 10^{-7}$ <i>CA</i> : $8,75 \times 10^{-7}$	FIA-AMP

Em relação aos demais métodos eletroquímicos apresentados na Tabela 9, a principal vantagem do método proposto está na frequência analítica (superior a 100 injeções hora). Este parâmetro não é informado nestes trabalhos, mas pode-se afirmar que sejam possíveis algo em torno de no máximo 10 análises hora. Quanto ao limite de detecção, os métodos são semelhantes. É importante ressaltar, porém, que na análise de formulações farmacêuticas, o ideal seria que os métodos apresentassem um LD maior, o que possibilitaria a análise com uma menor diluição da amostra. Outra vantagem do método proposto é a faixa linear de resposta, a qual é superior quando comparada aos demais métodos.

Capítulo 4

Conclusões

Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que a técnica de Análise por Injeção em Fluxo com detecção Amperométrica de Múltiplos Pulsos (FIA-AMP) é simples, eficiente e rápida (mais de 100 injeções hora) na determinação simultânea de paracetamol (PA) e cafeína (CA) em formulações farmacêuticas. Os resultados foram obtidos usando tampão ácido acético/acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, diamante dopado com boro (DDB) como eletrodo de trabalho e um sistema FIA de linha única.

Os coeficientes de recuperação obtidos nos estudos de adição e recuperação ($\sim 100 \%$) e a similaridade obtida nos resultados comparativos entre o método proposto e CLAE comprovam o excelente desempenho do método FIA-AMP na determinação de PA e CA em fármacos. Além disto, o método permite a análise com uma etapa muito simples de preparo de amostra, ou seja, dissolução e diluição. Não há necessidade de filtrar a solução amostra, apesar da presença de excipientes não solúveis em solução aquosa.

Finalmente, é importante enfatizar que a metodologia proposta pode ser aplicada na análise simultânea de princípios ativos em outras formulações farmacêuticas. Esta possibilidade aumentou muito em função da introdução do uso do fator de correção na subtração da corrente entre os pulsos de potenciais utilizados.

Capítulo 5

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

- [1] Bosch, M.E., Sanchez, A.J.R., Ojeda F.S., Ojeda, C.B., Determination of paracetamol: Historical evolution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 42, (3), 291-321.
- [2] Trojanowicz, M., Recent developments in electrochemical flow detections-A review Part I. Flow analysis and capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 653, (1), 36-58.
- [3] Salazar-Banda, G.R., Andrade, L.S., Nascente, P.A.P., Pizani, P.S., Rocha, R.C., Avaca, L.A., On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. *Electrochim. Acta* **2006**, 51, (22), 4612-4619.
- [4] Swierkosz, T.A., Jordan, L., McBride, M., McGough, K., Devlin, J., Botting R.M., Actions of paracetamol on cyclooxygenases en tissue and cell homogenates of mouse and rabbit. *Med. Sci. Monit.* **2002**, 8, (12), 496-503.
- [5] Brenelli, E.C.S., Caffeine extraction from stimulating beverages: A new approach for a classic organic chemistry experiment. *Quim. Nova* **2003**, 26, (1), 136-138.
- [6] Tryk, D.A., Tsunozaki, K., Rao, T. N., Fujishima, A., Relationships between surface character and electrochemical processes on diamond electrodes: dual roles of surface termination and near-surface hydrogen. *Diamond Relat. Mater.* **2001**, 10, (9-10), 1804-1809.
- [7] Spataru, N., Sarada, B.V., Tryk, D.A., Fujishima, A., Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application. *Electroanalysis* **2002**, 14, (11), 721-728.
- [8] Girard, H., Simon, N., Ballutaud, D., Herlern, M., Etcheberry, A., Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes. *Diamond Relat. Mater.* **2007**, 16, (2), 316-325.
- [9] Jaw, S. and Jeffery E.H., Interaction of caffeine with acetaminophen .1. correlation of the effect of caffeine on acetaminophen hepatotoxicity and acetaminophen bioactivation following treatment of mice with various cytochrome-p450 inducing agents. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 46, (3), 493-501.
- [10] Palmer, H., Graham, G., Williams, K., Day, R., A Risk-Benefit Assessment of Paracetamol (Acetaminophen) Combined with Caffeine. *Pain Medicine* **2010**, 11, (6), 951-965.
- [11] Aronoff, D.M., Oates J.A., and Boutaud, O., New insights into the mechanism of action of acetaminophen: Its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H-2 synthases. *Clin. Pharmacol. Ther* **2006**, 79, (1), 9-19.

- [12] Miner, D.J., Rice, J. R., Riggin, R. M., Kissinger, P.T., Voltammetry of acetaminophen and its metabolites. *Anal. Chem.* **1981**, 53, (14), 2258-2263.
- [13] Sawynok, J. and Yaksh, T.L., Caffeine as an analgesic adjuvant - a review of pharmacology and mechanisms of action. *Pharmac. Rev.* 1993, 45, (1) 43-85.
- [14] Laska, E.M., Sunshine, A., Zighelboim, I., Roure, C., Marrero, I., Wanderling, J., Olson, N., Effect of caffeine on acetaminophen analgesia. *Clin. Pharmacol. Ther* **1983**, 33, (4), 498-509.
- [15] Zhang, W.Y., A benefit-risk assessment of caffeine as an analgesic adjuvant. *Drug Safety* **2001**, 24, (15), 1127-1142.
- [16] Anneken, K., Evers, S., and Husstedt, I.W., Efficacy of fixed combinations of acetylsalicylic acid, acetaminophen and caffeine in the treatment of idiopathic headache: a review. *Eur. J. Neurol.* **2010**, 17, (4), 534-540.
- [17] Diener, H.C., Pfaffenrath, V. Pageler, L., Peil, H., Aicher, B., The fixed combination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine is more effective than single substances and dual combination for the treatment of headache: a multicentre, randomized, double-blind, single-dose, placebo-controlled parallel group study. *Cephalalgia* **2005**, 25,(10), 776-787.
- [18] Pfaffenrath, V., Diener, H.C., Pageler, L., Peil, H., Aicher, B., OTC Analgesics in Headache Treatment: Open-Label Phase vs Randomized Double-Blind Phase of a Large Clinical Trial. *Headache* **2009**, 49, (5), 638-645.
- [19] Goldstein, J., Silberstein, S.D., Saper, J.R., Ryan, R.E., Lipton, R.B., Acetaminophen, aspirin, and caffeine in combination versus ibuprofen for acute migraine: Results from a multicenter, double-blind, randomized, parallel-group, single-dose, placebo-controlled study. *Headache* **2006**, 46, (3), 444-453.
- [20] Goldstein, J., Silberstein, S.D., Saper, J. R., Elkind, A.H., Smith, T.R., Gallagher, R. M., Battikha, J.P., Hoffman, H., Baggish, J., Acetaminophen, aspirin, and caffeine versus sumatriptan succinate in the early treatment of migraine: Results from the ASSET trial. *Headache* **2005**, 45, (8), 973-982.
- [21] McQuay, H.J., Angell, K., Carroll, D., Moore, R.A., Juniper, R.P., Ibuprofen compared with ibuprofen plus caffeine after third molar surgery. *Pain* **1996**, 66, (2-3), 247-251.
- [22] Forbes, J.A., Beaver, W.T., Jones, K.F., Kehm, C.J., Smith, W.K., Gongloff, C.M., Zeleznock, J.R., Smith, J.W., Effect of caffeine on ibuprofen analgesia in postoperative oral-surgery pain. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1991**, 49, (6), 674-684.

- [23] Diamond, S., Balm, T.K., and Freitag, F.G., Ibuprofen plus caffeine in the treatment of tension-type headache. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, 68, (3), 312-319.
- [24] Granados-Soto, V., Lopez-Muñoz F.J., Castañeda-Hernández, G., Salazar, L.A., Villarreal, J.E., Flores-Murrieta, F.J., Characterization of the analgesic effect of paracetamol and caffeine combinations in the pain-induced functional impairment model in the rat. *J. Pharm. Pharmacol* **1993**, 45, (7), 627-631.
- [25] Doak, G.J. and Sawynok, J., Complex role of peripheral adenosine in the genesis of the response to subcutaneous formalin in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, 281, (3), 311-318.
- [26] Alkayer, M., Vallon, J.J., Pegon, Y., Bichon, C., The direct determination of paracetamol in biological-fluids by ac polarography. *Anal. Chim. Acta* **1981**, 124, (1), 113-119.
- [27] Walash, M.I., Elbrashy, A.M., and Sultan, M.A. Polarographic-behavior and determination of paracetamol and salicylamide after treatment with nitrous-acid. *Mikrochim. Acta* **1994**, 113, (1-2), 113-124.
- [28] Navarro, I., Gonzalezarjona, D., Roldan, E., Rueda, M., Determination of paracetamol in tablets and blood-plasma by differential pulse voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1988**, 6, (6-8), 969-976.
- [29] Wang, C.Y., Hu, X.Y., Leng, Z.Z., Yang, G.J., Jin, G.D., Differential pulse voltammetry for determination of paracetamol at a pumice mixed carbon paste electrode. *Anal. Lett.* **2001**, 34, (15), 2747-2759.
- [30] Lau, O.W., Luk, S.F., and Cheung, Y.M., Simultaneous determination of ascorbic-acid, caffeine and paracetamol in drug formulations by differential-pulse voltammetry using a glassy-carbon electrode. *Analyst* **1989**, 114, (9), 1047-1051.
- [31] Ni, Y.N., Wang, Y.R., and Kokot, S., Differential pulse stripping voltammetric determination of paracetamol and phenobarbital in pharmaceuticals assisted by chemometrics. *Anal. Lett.* **2004**, 37, (15), 3219-3235.
- [32] Christie, I., Leeds, S., Baker, M., Keedy, F., Vadgama, P., Direct electrochemical determination of paracetamol in plasma. *Anal. Chim. Acta* **1993**, 272, (1), 145-150.
- [33] Vieira, I.C., Lupetti, K.O., and Fatibello, O., Determination of paracetamol in pharmaceutical products using a carbon paste biosensor modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). *Quim. Nova* **2003**, 26, (1), 39-43.

- [34] Atta, N.F., El-Kady, M.F., and Galal, A., Palladium nanoclusters-coated polyfuran as a novel sensor for catecholamine neurotransmitters and paracetamol. *Sens. Actuators, B* **2009**, 141, (2), 566-574.
- [35] Oliveira, M.C.Q., Lanza, M.R.V., Tanaka, A.A., Sotomayor, M.D.P.T., Flow injection analysis of paracetamol using a biomimetic sensor as a sensitive and selective amperometric detector. *Anal. Methods* **2010**, 2, (5), 507-512.
- [36] Li, L.J., Zhong, L., Cai, Z., Cheng, H., Yu, L.B., Electrochemical Behaviors and Determination of Paracetamol at Multi-walled Carbon Nanotubes and L-Cysteine Co-Assembling Modified Gold Electrode. *Chinese J. Anal. Chem.* **2008**, 36, (12), 1651-1656.
- [37] De Maria, C.A.B., Ricardo F.A.M., Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. *Quím.Nova* **2007**, 1, (30), 99-105
- [38] Zen, J.M., Ting, Y.S., and Shih, Y., Voltammetric determination of caffeine in beverages using a chemically modified electrode. *Analyst* **1998**, 123, (5), 1145-1147.
- [39] Brunetti, B., Desimoni, E., and Casati, P., Determination of caffeine at a Nafion-covered glassy carbon electrode. *Electroanalysis* **2007**, 19, (2-3), 385-388.
- [40] Wei, Y.L., Zhang, L.P., Shao, C., and Li, C., Voltammetric Determination of Caffeine at Pt/Carbon Nanotubes Composite Modified Glassy Carbon Electrode. *Chem. Anal-Warsaw* **2009**, 54, (4), 607-617.
- [41] Yang, S.L., Yang, S.L., Yang, R., Li, G., Qu, L.B., Li, J.J., Yu, L.L., Nafion/multi-wall carbon nanotubes composite film coated glassy carbon electrode for sensitive determination of caffeine. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, 639, (1-2), 77-82.
- [42] Pizzariello, A., Svorc, J., Stred'ansky, M., Miertus, S., A biosensing method for detection of caffeine in coffe. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, (8), 1136-1140.
- [43] Prodan, M., Gere-Paszti, E., Farkas, O., Forgacs, E., Validation and simultaneous determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations by RP-HPLC. *Chem. Anal-Warsaw* **2003**, 48, (6), 901-907.
- [44] Altun, M.L., HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyrone. *Turk. J. Chem.* **2002**, 26, (4), 521-528.
- [45] Franeta, J.T., Agbaba, D., Eric, S., Pavkov, S., Aleksic, M., Vladimirov, S., HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Farmaco* **2002**, 57, (9), 709-713.
- [46] Muszalska, I., Zajac, M., Czajkowski, K., Nogowska, M., Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, ascorbic acid and phenylephrine hydrochloride in pharmaceutical formulations by HPLC. *Chem. Anal-Warsaw* **2000**, 45,(6), 825-833.

- [47] Krishnamurthy, R., Malve, M.K., and Shinde, B.M., Simultaneous determination of morphine, caffeine, and paracetamol in the urine of addicts by HPTLC and HPLC. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC* **2000**, 13, (3), 171-175.
- [48] Indrayanto, G., Sunarto, A., and Adriani, Y., Simultaneous assay of phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, glycerylguaiacolate and chlorpheniramine maleate in Silabat(TM) tablet using HPLC with diode array detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1995**, 13, (12), 1555-1559.
- [49] Yurdakul, G., Ersoy, L., and Sungur, S., Comparison of hplc and derivative spectrophotometric methods for the determination of paracetamol and caffeine in tablets. *Pharmazie* **1991**, 46, (12), 885-885.
- [50] Elkommos, M.E. and Emara, K.M., Determination of phenyltoloxamine salicylamide, caffeine, paracetamol, codeine and phenacetin by hplc. *Talanta* **1989**, 36, (6), 678-679.
- [51] Xu, X. and Stewart, J.T., HPLC methods for aspirin-caffeine-butalbital and acetaminophen-caffeine-butalbital mixtures in tablet dosage forms using non-porous octadecylsilane columns. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, 23, (5), 769-779.
- [52] Mot, A.C., Soponar, F., Medvedovici, A., Sarbu, C., Simultaneous spectrophotometric determination of aspirin, paracetamol, caffeine, and chlorphenamine from pharmaceutical formulations using multivariate regression methods. *Anal. Lett.* **2010**, 43, (5), 804-813.
- [53] Emre, D., and Ozaltin, N., Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, 847, (2), 126-132.
- [54] Tavallali, H., and Salami, M., Simultaneous Determination of Caffeine and Paracetamol by Zero-Crossing Second Derivative Spectrophotometry in Pharmaceutical Preparations. *Asian J. Chem.* **2009**, 21, (3), 1949-1956.
- [55] Dinc, E., Ozdemir, A., and Baleanu, D., An application of derivative and continuous wavelet transforms to the overlapping ratio spectra for the quantitative multiresolution of a ternary mixture of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in tablets. *Talanta* **2005**, 65, (1), 36-47.
- [56] Moreira, A.B., Dias, I.L.T., Neto, G.O., Zagatto, E.A.G., Kubota, L.T., Simultaneous spectrofluorimetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical preparations in solid-phase using partial least squares multivariate calibration. *Anal. Lett.* **2006**, 39, (2), 349-360.

- [57] Sena, M.M. and Poppi, R.J., N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 34, (1), 27-34.
- [58] Alves, J.C.L. and Poppi, R.J., Simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine using solid-phase molecular fluorescence and parallel factor analysis. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 642, (1-2), 212-216.
- [59] Zen, J.M. and Ting, Y.S., Simultaneous determination of caffeine and acetaminophen in drug formulations by square-wave voltammetry using a chemically modified electrode. *Anal. Chim. Acta* **1997**, 342, (2-3), 175-180.
- [60] Sanghavi, B.J. and Srivastava, A.K., Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen, aspirin and caffeine using an in situ surfactant-modified multiwalled carbon nanotube paste electrode. *Electrochim. Acta* **2010**, 55, (28), 8638-8648.
- [61] Lourencao, B.C., Medeiros, R.A., Rocha, R.C., Mazo, L.H., Fatibello, O., Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*, **2009**, 78, (3), 748-752.
- [62] J. Ruzicka, E.H.H., Retro-review of flow-injection analysis. *Trac-Trend. Anal. Chem.* **2008**, 5, (27), 390-393.
- [63] Mervartova, K., Polasek, M., Calatayud, J. M., Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 3, (45), 367-381.
- [64] Dunec, A. F., Cheregi, M., Calatayud, J. M., Mateo, J. V. G., Enein, H. Y. A., Flow injection methods of analysis for waters II.Organic pollutants. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2003**, 1, (33), 57-68.
- [65] Hansen, E.H. and Wang, J.H., The three generations of flow injection analysis. *Anal. Lett.* **2004**, 37,(3), 345-359.
- [66] Begak, O.Y. and Borodin, A.V., Flow-injection analysis in atomic absorption spectrometry (review). *Ind.Lab.* **1998**, 64, (6), 371-381.
- [67] Perez-Ruiz, T., Lozano, C.M., Tomas, V., Ruiz, E., Flow injection fluorimetric determination of L-dopa and dopamine based on a photochemical inhibition process. *Microchim. Acta* **2007**, 158, (3-4), 299-305.
- [68] Yu, J., Zhang, C., Tan, Y., Ge, S., Dai, P., Zha, Y., Determination of ascorbic acid by flow-injection chemiluminescence method. *Luminescence* **2008**, 23, (2), 107-107.
- [69] Couto, C. and Montenegro, M. Potentiometric detectors for flow injection analysis systems, evolution and application. *Quim. Nova* **2000**, 23, (6), 774-784.

- [70] Agui, L., Guzman, A., Pedrero, M., Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J.M., Voltametric and flow injection determination of oxytetracycline residues in food samples using carbon fiber microelectrodes. *Electroanalysis* **2003**, 15, (7), 601-607.
- [71] Shitanda, I., Takamatsu, S., Watanabe, K., Itagaki, M., Amperometric screen-printed algal biosensor with flow injection analysis system for detection of environmental toxic compounds. *Electrochim. Acta* **2009**, 54, (21), 4933-4936.
- [72] Kotani, A., Kusu, F., and Takamura, K., New electrochemical detection method in high-performance liquid chromatography for determining free fatty acids. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 465, (1-2), 199-206.
- [73] Chailapakul, O., Ngamukot, P., Yoosamran, A., Siangproh, W., Wangfuengkanagul, N., Recent electrochemical and optical sensors in flow-based analysis. *Sensors* **2006**, 6, (10), 1383-1410.
- [74] dos Santos, W.T.P., Gimenes, D.T., de Almeida, E. G. N., Eiras, S. D., Albuquerque, Y. D. T., Richter, E. M., Simple Flow Injection Amperometric System for Simultaneous Determination of Dipyrone and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, (7), 1249-1255.
- [75] Cai, Y.E., et al., Optimizing the integrated pulsed amperometric multicycle step waveform for the determination of tetracyclines. *J. Chromatogr., A* **2006**, 1118, (1), 35-40.
- [76] Palaharn, S., et al., Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulation with pulsed amperometric detection. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 499, (1-2), 191-197.
- [77] Dilleen, J.W., Lawrence, C.M., and Slater, J.M., Determination of 2-furaldehyde in transformer oil using flow injection with pulsed amperometric detection. *Analyst* **1996**, 121, (6), 755-759.
- [78] de Silva, J.A.F., Electrochemical detection in capillary electrophoresis. *Quim. Nova* **2003**, 26, (1), 56-64.
- [79] Jensen, M.B., Determining carbohydrate levels in fruit drinks with HPLC and a labview-based pulsed amperometric detector. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2001**, (222), 379-384.
- [80] Hanko, V.P., Rohrer, J. S., Liu, H.H., Zheng, C., Zhang, S., Liu, X., Tang, X., Identification of tobramycin impurities for quality control process monitoring using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 47, (4-5), 828-833.

- [81] Jeon, M.H., Kwon, H.J., Jeong, J.S., Lee, Y.M., Hong, S.P., Detection of albiflorin and paeoniflorin in *Paeoniae Radix* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr., A* , **2009**, 1216, (21), 4568-4573.
- [82] Kwon, H.J., Jeong, J.S., Sim, H.J., Lee, Y.M., Kim, Y.S., Hong, S.P., Sensitive high-performance liquid chromatography method of non-polar ginsenosides by alkaline-enhanced pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr., A* **2009**, 1216, (20), 4445-4450.
- [83] Possari, R., Carvalhal, R.F., Mendes, R.K., Kubota, L.T., Electrochemical detection of cysteine in a flow system based on reductive desorption of thiols from gold. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 575, (2), 172-179.
- [84] Gimenes, D.T., dos Santos, W.T.P., Tormin, T.F., Munoz, R.A.A., Richter, E.M., *Electroanalysis* **2010**, 1, (22), 74-78.
- [85] Babaei, A., Khalilzadeh, B., and Afrasiabi, M., A new sensor for the simultaneous determination of paracetamol and mefenamic acid in a pharmaceutical preparation and biological samples using copper (II) doped zeolite modified carbon paste electrode. *J. Appl. Electrochem.* **2010**, 40, (8), 1537-1543.
- [86] Goyal, R.N., Gupta, V.K., and Chatterjee, S., Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode. *Sens. Actuators, B.* **2010**, 149, (1), 252-258.
- [87] Goyal, R.N., Gupta, V.K., Oyama, M., Bachheti, N., Differential pulse voltammetric determination of paracetamol at nanogold modified indium tin oxide electrode. *Electrochem. Commun.* **2005**, 7,(8), 803-807.
- [88]. Goyal, R.N. and Singh, S.P., Voltammetric determination of paracetamol at C-60-modified glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta* **2006**, 51, (15), 3008-3012.
- [89] Zhang, Y., Luo, L.Q., Ding, Y.P., Liu, X.A., Qian, Z.Y., A highly sensitive method for determination of paracetamol by adsorptive stripping voltammetry using a carbon paste electrode modified with nanogold and glutamic acid. *Microchim. Acta* **2010**, 171, (1-2), 133-138.
- [90] Pournaghi-Azar, M.H. and Saadatirad, A., Simultaneous Determination of Paracetamol, Ascorbic Acid and Codeine by Differential Pulse Voltammetry on the Aluminum Electrode Modified by Thin Layer of Palladium. *Electroanalysis* **2010**, 22, (14), 1592-1598.

- [91] Kalimuthu, P. and John, S.A., Selective Electrochemical Determination of Paracetamol Using Nanostructured Film of Functionalized Thiadiazole Modified Electrode. *Electroanalysis* **2010**, 22, (3), 303-309.
- [92] Norouzi, P., Dousty, F., Ganjali, M. R., Daneshgar, P., Dysprosium Nanowire Modified Carbon Paste Electrode for the Simultaneous Determination of Naproxen and Paracetamol: Application in Pharmaceutical Formulation and Biological Fluid. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2009**, 4, (10), 1373-1386.
- [93] Kachoosangi, R.T., Wildgoose, G.G., and Compton, R.G., Sensitive adsorptive stripping voltammetric determination of paracetamol at multiwalled carbon nanotube modified basal plane pyrolytic graphite electrode. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 618, (1), 54-60.
- [94] Ozcan, L. and Sahin, Y., Determination of paracetamol based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode. *Sens. Actuators, B* **2007**, 2, (127), 362-369.
- [95] Hlabangana, L., Hernandez-Cassou, S., and Saurina, J., Multicomponent determination of drugs using flow-injection analysis. *Current Pharmaceutical Analysis* **2006**, 2, (2), 127-140.
- [96] Tomsu, D., Icardo, M.C., and Calatayud, J.M., Automated simultaneous triple dissolution profiles of two drugs, sulphamethoxazole-trimethoprim and hydrochlorothiazide-captopril in solid oral dosage forms by a multicommutation flow-assembly and derivative spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 36, (3), 549-557.
- [97] Suvardhan, K., Kumar, K.S., Babu, S.H., Jayaraj, B., Chiranjeevi, P., Simultaneous flow-through determination of nitrites, nitrates and their mixtures in environmental and biological samples using spectrophotometry. *Talanta* **2008**, 75, (4), 1148-1148.
- [98] Surareungchai, W., Deepunya, W., Tasakorn, P., Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose. *Anal. Chim. Acta* **2001**, (448), 215-220.
- [99] dos Santos, W. T. P., de Almeida, E. G. N., Ferreira, H. E. A., Gimenes, D. T., Richter, E. M., Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection *Electroanalysis* **2008**, (20), 1878-1883
- [100] Uslu, B., and Ozkan., S.A., Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. *Anal. Lett.* **2007**, (40), 817-853.
- [101] Pleskov, Y.V., Electrochemistry of diamond: A review. *Russ. J. Electrochem.* **2002**, 38, (12), 1275-1291.

- [102] Hupert, M., Muck, A., Wang, R., Stoher, J., Cvackova, Z., Haymond, S., Show, Y., Swain, G.M., Conductive diamond thin-films in electrochemistry. *Diamond Relat. Mater.* **2003**, (12), 1940-1949.
- [103] Kraft, A., Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2007**, 2, (5), 355-385.
- [104] Panizza, M., Cerisola, G., Application of diamond electrodes to electrochemical processes. *Electrochim. Acta* **2005**, 51, (2), 191-199.
- [105] Hupert, M., Muck, A., Wang, R., Stotter, J., Cvackova, Z., Haymond, S., Show, Y., Swain, G. M., Conductive diamond thin-films in electrochemistry. *Diamond Relat. Mater.* **2003**, 12, (10-11), 1940-1949.
- [106] Ferro, S., Synthesis of diamond. *J. Mater. Chem.* **2002**, 12, (10), 2843-2855.
- [107] Fujimori, N., Imai, T., Doi, A., Characterization of conducting diamond films. *Vacuum* **1986**, 36, (1-3), 99-102.
- [108] Porfieri, D.J., Gardner, N.C., Angus, J.C., Growth of boron-doped diamond seed crystals by vapor deposition. *Journal of Applied Physics* **1973**, 44, (4), 1428-1434.
- [109] de Barros, R.D.M., Ribeiro, M.C., An-Sumodjo, P.T., Julião, M.S.D., Serrano, S.H.P., Ferreira, N.G Boron-doped CVD diamond films. *Quim. Nova* **2005**, 2, (28), 317-325.
- [110] Pleskov, Y.V., Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis *J. Anal. Chem.* **2000**, 55, (11), 1045-1050.
- [111]. Peckova, K., Musilova, J., Barek, J., Boron-doped diamond film electrodes new tool for voltammetric determination of organic substances. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2009**, 39, (3), 148-172.
- [112] Medeiros, R. A., de Carvalho, A. E., Rocha-Filho, R. C., Fatibello-Filho, O., Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode. *Talanta* **2008**, 76, (3), 685-689.
- [113] Sartori, E.R., Medeiros, R.A., Rocha, R.C., Fatibello, O., Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need of previous alkaline hydrolysis step. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, (2), 360-366.
- [114] Dragoie, D., Spataru., N., Kawasaki, R., Manivannan, A., Spataru, T., Tryk, D.A., Fujishima, A., Detection of trace levels of Pb^{2+} in tap water at boron-doped diamond electrodes with anodic stripping voltammetry *Electrochim. Acta* **2006**, 51, (12), 2437-2441.

- [115] Song, Y., Swain, G.M, Development of a method for total inorganic arsenic analysis using anodic stripping voltammetry and a Au-coated, diamond thin-film electrode *Anal. Chem.* **2007**, 79, (6), 2412-2420.
- [116] Yu, H.B., Ma., C.J., Quan,X., Chen,S., Zhao, H.M, Flow injection analysis of chemical oxygen demand (COD) by using a boron-doped diamond (BDD) electrode. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, (6), 1935-1939.
- [117] Yu, H.B.,Wang, H., Quan, X., Chen, S., Zhang, Y.B, Amperometric determination of chemical oxygen demand using boron-doped diamond (BDD) sensor. *Electrochem. Commun.* **2007**, 9, (2), 2280-2285).
- [118] Yagi, I., Notsu, H., Kondo, T., Tryk, D. A., Fujishima, A., Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 473, (1-2), 173-178.
- [119] Simon, N., et al., Effect of H and O termination on the charge transfer of moderately boron doped diamond electrodes. *Diamond Relat. Mater.* **2005**, 14, (3-7), p. 1179-1182.
- [120] Medeiros, R.A., de Carvalho, A.E., Rocha-Filho, R.C.,Fatibello-Filho, O., Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode. *Talanta* **2008**, 76, (3), 685-689.
- [121] Suffredini, H.B., et al., Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. *Electrochim. Acta* **2004**, 49, (22-23),4021-4026.
- [122] Pleskov, Y.V., Synthetic diamond in electrochemistry. *Russ.Chem.Rev.* **1999**, 68, (5), 416-429.
- [123] Goeting, C.H., Marken, F., Gutierrez-Sosa, A., Compton, R.G., Foord, J.S., Electrochemically induced surface modifications of boron-doped diamond electrodes: an X-ray photoelectron spectroscopy study. *Diamond Relat. Mater.* **2000**, 9, (3-6), 390-396.
- [124] Granger, M.C. and Swain, G.M., The influence of surface interactions on the reversibility of ferri/ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes.*J. Electrochem. Soc.* **1999**, 146, (12), 4551-4558.
- [125] Swain, G.M., The susceptibility to surface corrosion in acidic fluoride media - a comparison of diamond, hopg, and glossy carbon electrodes.*J. Electrochem. Soc.* **1994**, 141, (12), 3382-3393.
- [126] Pedrotti, J.J., Angnes, L., and Gutz, I.G.R., Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. *Electroanalysis* **1996**, 8, (7), 673-675.
- [127] dos Santos, W.T.P., Azevedo, E.F., Richter, E.M., de Albuquerque, Y.D.T.

, Construction and characterization of an electrochemical detector for flow analysis. *Quim. Nova* **2009**, 32, (9), 2412-2416.

[128] dos Santos, W.T.P., Ceolin, M. P., de Albuquerque, Y. D. T., Richter, E. M., The use of pressure generated by a water column to control flow rates in flow analysis systems. *Quim. Nova* **2007**, 30, (7), 1754-1758.

[129] Hansen, B.H. and Dryhurst, G., Electrochemical oxidation of theobromine and caffeine at pyrolytic graphite electrode. *J. Electroanal. Chem.*, **1971**, 30, (3), 407-416.

[130] Lourenção, B.C., Medeiros, R. A., Rocha, R. C., Fatibello, O., Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Caffeine in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* **2010**, 22, (15), 1717-1723.

[131] Bard, A.J., and Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods*, 1^a ed., New York **1980**, p. 391.

[132] Skoog, D.A., Holler, F.J., and Nieman, T.A., *Princípios de Análise Instrumental*, 5^a ed. Porto Alegre, Bookman **2002**, p. 97.

