

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

ALINE CARVALHO DIAS

**APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA COM DETECÇÃO
AMPEROMÉTRICA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

UBERLÂNDIA

2019

ALINE CARVALHO DIAS

**APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA COM DETECÇÃO
AMPEROMÉTRICA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Química Industrial.

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro
Abarza Muñoz.**

**Co-orientadora: Doutoranda Jéssica Santos
Stefano**

UBERLÂNDIA

2019

ALINE CARVALHO DIAS

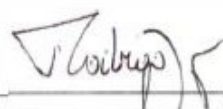
**APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA COM DETECÇÃO
AMPEROMÉTRICA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Química Industrial.

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro
Abarza Muñoz.**

**Co-orientadora: Doutoranda Jéssica Santos
Stefano**

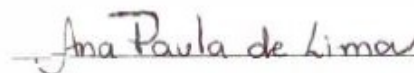
Banca de Avaliação:



Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
(Orientador)



Prof. Dr. Alex Domingues Batista
(Examinador)



Doutoranda Ana Paula de Lima
(Examinador)

Uberlândia, 27 de Junho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e por me agraciar com a oportunidade de lutar todos os dias pelo meu sonho. Agradeço por tudo.

Aos meus pais, Waldir e Rosa, por sempre estarem ao meu lado me apoiando e me ajudando independente do que for, tanto pessoalmente quanto profissionalmente. Agradeço pelo amor incondicional.

Ao meu irmão Fernando, por ser inspiração na minha vida, por todo carinho e apoio.

A minha amiga Bruna, por toda ajuda, força e pelo companheirismo nesses 4 anos.

Ao Leonardo, por toda compreensão e carinho.

A Jéssica, por me aconselhar desde o começo da minha iniciação científica, por toda paciência e aprendizado nesses anos.

A todos da família NUPE, por todo esse tempo juntos.

Ao meu orientador, Rodrigo Muñoz, pela paciência, por acreditar em mim e por todo conhecimento proporcionado, me ajudando a tornar uma grande profissional.

Aos professores do IQ-UFU por contribuir na minha formação.

A FAPEMIG e CNPQ pelo fomento a pesquisa.

Obrigada!

RESUMO

No presente trabalho são exibidos os estudos realizados sobre a oxidação eletroquímica do ácido fólico e a sua determinação empregando um sistema de análise por injeção em batelada (BIA, *Batch Injection Analysis*) com a técnica de amperometria convencional. Os testes foram realizados utilizando o eletrodo de folha de grafite pirolítico (FGP) como eletrodo de trabalho, o qual é um ótimo sensor para análises eletroquímicas. Foram realizados estudos de voltametria cíclica para obter informações sobre o comportamento redox do analito. Utilizaram-se diferentes soluções tampão para observar o comportamento da molécula frente a diferentes meios e pHs, para isso, foram realizados voltamogramas cíclicos utilizando tampão acetato, tampão fosfato e variando o pH de uma solução tampão Britton-Robinson. Observou-se que o comportamento na FGP fornece um pico de oxidação para o ácido fólico favorecido em pH 7 (meio neutro), desta forma, o eletrólito suporte escolhido foi o tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ em pH 6. Após a escolha do eletrólito suporte, foi realizado um voltamograma hidrodinâmico com o intuito de avaliar o melhor potencial de trabalho para as demais análises, e o potencial ótimo de trabalho foi de +1,0 V. Os parâmetros do sistema BIA foram otimizados, em 193 µL s⁻¹ para vazão e 200 µL para volume de injeção, respectivamente. Durante os estudos observou-se a necessidade da utilização do sistema de agitação para diminuir problemas de adsorção do ácido fólico na superfície do eletrodo de FGP que, portanto, foi adotado neste trabalho. O método desenvolvido foi aplicado em quatro amostras diferentes, comprimidos que continham 2 ou 5 mg de ácido fólico. Obtiveram-se respostas satisfatórias como, por exemplo, uma boa frequência analítica (61 h⁻¹), bom limite de detecção (0,023 µmol L⁻¹), desvio padrão relativo dentro do valor aceitável (DPR < 2,8%) atestando uma boa precisão do método, além de adequada sensibilidade (2,08 × 10⁻¹ µA L µmol⁻¹). Utilizou-se o método de HPLC para comparação dos resultados obtidos pelo método proposto, e de acordo com o teste t de *Student* pareado os resultados são concordantes com 95% de confiança.

Palavras-chave: Ácido fólico. Amperometria. Análise por injeção em batelada (BIA). Eletrodos de folha de grafite pirolítico.

ABSTRACT

The present work presents the studies on the electrochemical oxidation of folic acid and its determination using a Batch Injection Analysis (BIA) system with the conventional amperometry technique. The tests were performed using the pyrolytic graphite sheet electrode (GSE) as a working electrode, which is a great sensor for electrochemical analysis. Cyclic voltammetric studies were performed to obtain information on the redox behavior of the analyte. Different buffer solutions were used to observe the behavior of the molecule in different media and pHs, for this, cyclic voltammograms were performed using acetate buffer, phosphate buffer and varying the pH of a Britton-Robinson buffer solution. It was observed that the behavior on the GSE provides a favored oxidation peak for folic acid in pH 7 (neutral medium), in this way, the supporting electrolyte chosen was a 0.1 mol L^{-1} Britton-Robinson (BR) buffer at pH 6. After the choice of supporting electrolyte, a hydrodynamic voltammogram was performed in order to evaluate the best working potential for the other analyses, and the optimum working potential was +1,0 V. The parameters of the BIA system were optimized, in $193 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$ for flow rate and $200 \text{ } \mu\text{L}$ for injection volume, respectively. During the studies it was observed the need to use a stirring system to reduce problems of folic acid adsorption on the surface of the GSE electrode, which was therefore adopted in this work. The developed method was applied to four different samples, tablets containing 2 or 5 mg of folic acid. Satisfactory responses were obtained, for example, a good analytical frequency (61 h^{-1}), good detection limit ($0.023 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), relative standard deviation within the acceptable value (DPR $<2.8\%$), attesting a good precision of the method, in addition to adequate sensitivity ($2.08 \times 10^{-1} \text{ } \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$). The HPLC method was used to compare the results obtained by the proposed method, and according to the paired Student's t test the results are concordant with 95% confidence.

Keywords: Folic acid. Amperometry. BIA. Pyrolytic graphite sheet electrodes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a - Coeficiente angular da curva de calibração ou sensibilidade analítica

AMP - Amperometria

B₉ - Ácido fólico

B₁₂ - Cobalamina

BIA - Análise por injeção em batelada, do inglês, “*Batch Injection Analysis*”

BR - Britton-Robinson

DHF - Ácido 7,8-dihidropuroilmonoglutâmico

DP_b - Desvio padrão relativo do branco

DPR - Desvio padrão relativo

E - Potencial de trabalho

FGP - Eletrodo folha de grafite pirolítico

GSE – Graphite sheet electrode

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance, do inglês, “*High-Performance Liquid Chromatography*”

HPLC-MS - Cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de Quantificação

R - coeficiente de correlação

SPEs - Screen-printed electrodes

THF - Ácido 5,6,7,8-tetrahidretoilmonoglutâmico

VC - Voltametria cíclica

μPAD - Dispositivos microfluídicos de papel (do inglês, *microfluidic paper-based analytical devices*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do ácido fólico.....	13
Figura 2 - Estrutura química do Ácido 7,8-dihidropuroilmonoglutâmico (DHF) (A) ou Ácido 5,6,7,8-tetrahidretoilmonoglutâmico (THF) (B). Sendo R a representação da parte do ácido p-aminobenzóico e do ácido L-glutâmico da estrutura do ácido fólico.....	13
Figura 3 - Voltamograma cíclico utilizando eletrodo de pasta de carbono em uma solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ em (a) ausência e (b) presença de solução 2x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de ácido fólico entre os potenciais de varredura de 0,0 e 1,3 V. Utilizou-se eletrodo de referência Ag/AgCl.	17
Figura 4 - Mecanismo de reação proposto para a oxidação anódica de ácido fólico em pH 6,8.	18
Figura 5 - Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: A) potencial com varredura linear; B) potencial do tipo escada; C) voltamograma obtido para um sistema reversível.	20
Figura 6 - Resposta da corrente em função do tempo para um experimento de único degrau de potencial.....	21
Figura 7 - Diagrama esquemático da célula BIA. (A) eletrodo de trabalho; (B) eletrodo auxiliar; (C) eletrodo de referência; (D) ponteira da micropipeta; (E) orifício para preenchimento da célula; (F) barra de agitação; (G) dreno.	23
Figura 8 - Diagrama esquemático da célula BIA atualmente contendo orifício para o eletrodo de referência, eletrodo auxiliar, ponteira da micropipeta e eletrodo de trabalho, tampa e base da célula.	24
Figura 9 - Etapas de operação do sistema BIA e o amperograma obtido: (A) Antes da injeção; (B) Transporte; (C) Fim da injeção; (D) Dispersão; (E) Equilíbrio final.	25
Figura 10 - Imagem de uma célula utilizada no sistema BIA para eletrodos impressos.	31
Figura 11 - Imagem da montagem do sistema BIA utilizado durante a análise, utilizando uma célula produzida no próprio laboratório (B), micropipeta eletrônica Eppendorf (A) e o um agitador magnético (HI 190M) (C).	32
Figura 12 - Representação esquemática da fabricação de eletrodos descartáveis: (A) substrato em folha de grafite; (B) posicionamento de uma peça de folha de grafite (1x1cm) na célula impressa em 3D (área do eletrodo definida pelo diâmetro do O-ring); (C) vista interna da célula impressa em 3D; (D) vista superior da célula impressa em 3D com a folha de grafite como eletrodo de trabalho na parte inferior da célula. (1) Base de placa metálica para contato	

elétrico do eletrodo de trabalho; (2) parafusos impressos em 3D; (3) eletrodo auxiliar; (4) eletrodo de referência.	33
Figura 13- Voltamogramas cíclicos para 1 mmol L ⁻¹ de ácido fólico em uma solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ em diferentes pHs (2, 4, 6, 7 e 8). Eletrodo: FGP.....	35
Figura 14 - Voltamogramas cíclicos para 1 mmol L ⁻¹ de ácido fólico em tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 4,75), em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 7,5) e em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 6. Eletrodo: FGP.....	36
Figura 15 - Voltamograma hidrodinâmico para 30 µmol L ⁻¹ de ácido fólico em solução tampão BR pH = 6, concentração 0,12 mol L ⁻¹ . Eletrodo: FGP; Condições: vazão = 153 µL s ⁻¹ ; volume de injeção = 100 µL; agitação magnética = 500 rpm.....	37
Figura 16 - Estudo do volume de injeção para ácido fólico 30 µmol L ⁻¹ em BR pH = 6. Eletrodo: FGP; E = +1,0 V. Sob agitação magnética, velocidade = 500 rpm.....	38
Figura 17 - Estudo da velocidade de injeção para ácido fólico 30 µmol L ⁻¹ em BR pH = 6. Eletrodo: FGP; E = +1,0 V. Sob agitação magnética, velocidade = 500 rpm.....	39
Figura 18 - Estudo de velocidade agitação para ácido fólico 30 µmol L ⁻¹ em BR pH = 6. Eletrodo: FGP; E = +1,0 V. Condições: vazão = 193 µL s ⁻¹ ; volume de injeção = 200 µL.	40
Figura 19 - Teste de repetibilidade (n = 20) para ácido fólico em concentração de 30 µmol L ⁻¹ em BR pH = 6. Eletrodo: FGP; E = +1,0 V. Condições: vazão = 193 µL s ⁻¹ ; volume de injeção = 200 µL. Sob agitação magnética, velocidade = 500 rpm.	41
Figura 20 - Curva de faixa linear para ácido fólico em concentrações de 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 125, 150, 200, 300, 350, 400, 500, 600, 750 e 1000 µmol L ⁻¹ em BR pH = 6. Eletrodo: FGP; E = +1,0 V. Condições: vazão = 193 µL s ⁻¹ ; volume de injeção = 200 µL. Sob agitação magnética, velocidade 500 rpm.....	42
Figura 21 - Amperograma para injeção no sistema BIA de ácido fólico nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µmol L ⁻¹ (a - e) e de amostras de fármacos (A1), (A2), (A3) e (A4). Eletrólito suporte: Tampão BR pH = 6. Eletrodo: FGP; E = +1,0 V. Condições: vazão = 193 µL s ⁻¹ ; volume de injeção = 200 µL. Sob agitação magnética, velocidade = 500 rpm. Curva analítica (de calibração) inserida no canto superior direito da figura.....	43
Figura 22 - Cromatograma obtido pelo método HPLC. Condições: fase móvel (25:75 de uma mistura de sal de sódio ácido 1-octanesulfônico (25%) com trietilamina (0,1%) em metanol (v/v)) e Coluna C ₁₈	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características analíticas do método proposto.....	44
Tabela 2 - Comparação dos resultados obtidos pelo método eletroquímico com HPLC para as quatro amostras de fármacos (A1, A2, A3 e A4) contendo ácido fólico.	45
Tabela 3 - Métodos eletroquímicos de análise aplicados para determinação de ácido fólico reportados na literatura.	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Analito Estudado.....	12
1.2. Métodos para a determinação de ácido fólico	15
1.3. Técnicas Eletroanalíticas.....	15
1.3.1. Voltametria cíclica (VC).....	19
1.3.2. Amperometria.....	20
1.4. Análise por Injeção em Batelada (BIA)	22
1.5. Eletrodo Folha de Grafite Pírolítico (FGP)	26
2. OBJETIVOS	29
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	30
3.1. Reagentes e soluções	30
3.2. Instrumentação	30
3.3. Eletrodos	32
3.4. Preparo de amostras	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÕES.....	48
6. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

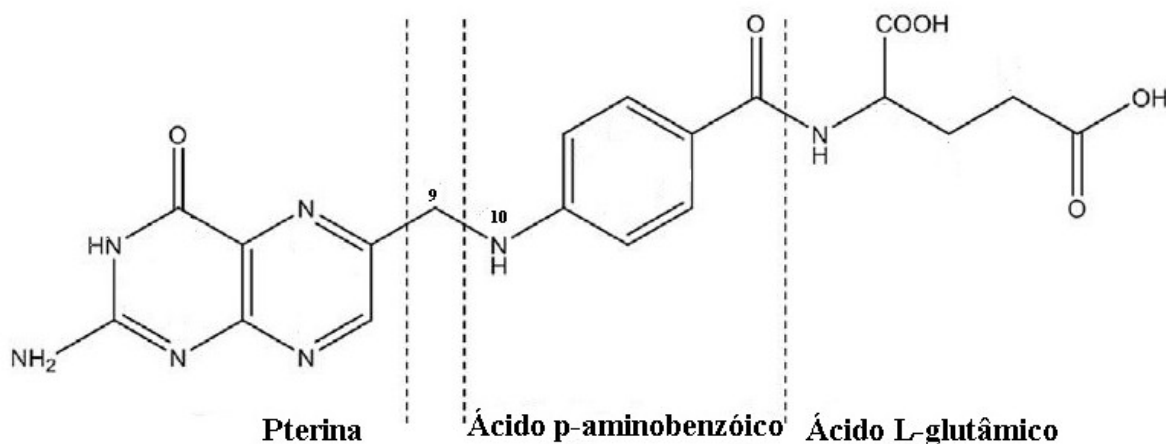
1.1. Analito Estudado

As vitaminas são nutrientes de natureza orgânica essenciais em baixa quantidade para o funcionamento ideal do organismo humano. A maioria das vitaminas não são sintetizadas no corpo humano, desta forma, podem ser adquiridas a partir de fontes externas para a boa atividade metabólica (VAZE; SRIVASTAVA, 2007; REVISTA FIB, 2014). As vitaminas exercem diversas funções, como por exemplo, ação antioxidante e atuação como catalisadores em reações que ocorrem no corpo humano, no entanto, cada vitamina possui uma função específica (REVISTA FIB, 2014).

Como as vitaminas são extremamente importantes para o bom funcionamento do corpo humano, sua falta ou seu consumo em excesso pode provocar o desequilíbrio metabólico que tem como consequência o desenvolvimento de doenças, sendo assim, a reparação deve ser feita a partir de fontes externas, podendo ser naturais ou artificiais. Deste modo, a quantificação das vitaminas nessas fontes se torna necessária (VAZE; SRIVASTAVA, 2007).

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel pertencente à família do complexo B (vitamina B₉) cuja fórmula molecular é C₁₉H₁₉N₇O₆. O termo ácido fólico é a denominação para a fórmula farmacêutica do ácido pteroilglutâmico, que é a forma estável da vitamina (VANNUCCHI; MONTEIRO, 2010). Seu nome na IUPAC é ácido pentanodioico (2S)-2-[[4-[(2-amino-4-oxo-1H-pteridina-6-il)metilamino]benzoil]amino (AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016). A estrutura do ácido fólico é exibida na Figura 1.

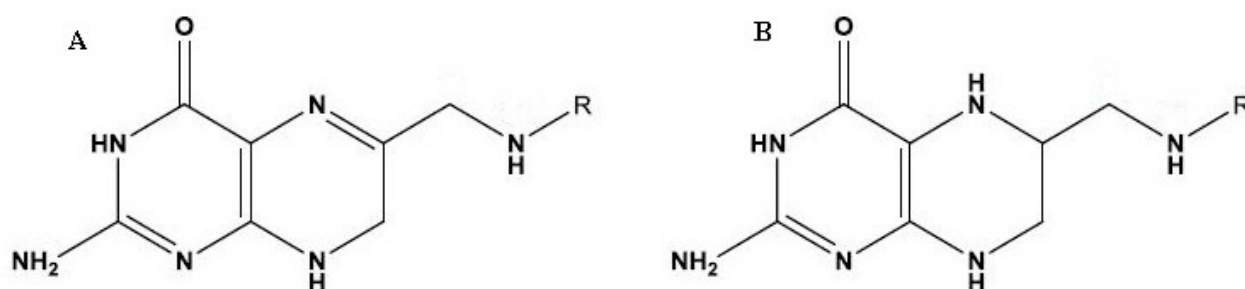
Figura 1 - Estrutura química do ácido fólico.



Fonte: (AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

Em grande parte das fontes naturais de alimentos, o ácido fólico é encontrado em duas formas reduzidas: Ácido 7,8-dihidropuroilmonoglutâmico (DHF) ou Ácido 5,6,7,8-tetrahidretoilmonoglutâmico (THF) (AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016). As respectivas estruturas são apresentadas na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química do Ácido 7,8-dihidropuroilmonoglutâmico (DHF) (A) ou Ácido 5,6,7,8-tetrahidretoilmonoglutâmico (THF) (B). Sendo R a representação da parte do ácido p-aminobenzóico e do ácido L-glutâmico da estrutura do ácido fólico.



Fonte: (AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

O ácido fólico possui diversas funções no corpo humano, pode-se citar como exemplo, a sua grande importância para as inúmeras vias metabólicas humanas e na síntese do ácido nucleico, bem como, sua utilização para acelerar a divisão celular. A vitamina B₉ é

imprescindível para o crescimento e desenvolvimento dos fetos, principalmente na formação normal do tubo neural (REVISTA FIB, 2014; AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016; ULUSOY *et al.*, 2016). O ácido fólico em conjunto com a vitamina B₁₂ proporciona a produção e desenvolvimento de glóbulos vermelhos (AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

O ácido fólico não pode ser armazenado no corpo humano, desta forma, sua deficiência é bastante comum. A ingestão do ácido fólico ocorre pelo consumo de levedo, fígado, grãos de cereais integrais, hortaliças verdes e feijão, os quais são alimentos ricos em vitamina B₉ (REVISTA FIB, 2014; ULUSOY *et al.*, 2016). O baixo consumo destes alimentos causa consequentemente a deficiência desta vitamina, o que pode levar a um grande número de doenças, dentre elas se destacam, anemia megaloblástica, câncer, doenças cardiovasculares e problemas no desenvolvimento de fetos (NELSON; SHARPLESS; SANDER, 2006). O excesso de vitamina B₉ pode disfarçar alguns sintomas de doenças causadas pela deficiência de vitamina B₁₂, desta forma, o controle da quantidade de ácido fólico em amostras de comprimidos e alimentos fortificados são extremamente importantes para a saúde humana (NELSON; SHARPLESS; SANDER, 2006; AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

A vitamina B₉ é instável frente ao aquecimento, congelamento, oxidação e ao cozimento, consequentemente há uma perda de 50% a 95% do conteúdo do folato durante os processos citados (VANNUCCHI; MONTEIRO, 2010). Para impedir a deficiência do ácido fólico é necessário o uso de suplementos ou de comidas fortificadas com a vitamina B₉ (NAGARAJA; VASANTHA; YATHIRAJAN, 2002). Desta forma, a indústria farmacêutica produz formulações que contem o ácido fólico, sendo estas líquidas ou até mesmo em comprimidos.

A Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou em 2002, no Diário Oficial a Consulta Pública nº 51 que previa a fortificação da farinha de trigo e farinha de milho, com ácido fólico (140 a 220 µg de ácido fólico para cada 100 g de farinha). Esta iniciativa se deve ao fato da necessidade do aumento da ingestão de ácido fólico na população, especialmente em mulheres grávidas e crianças. O objetivo é diminuir a ocorrência de anemia em crianças e prevenir a má formação do tubo neural no embrião (entre 22º e 28º dia), evitando assim a deformação como anencefalia, e até mesmo defeitos na coluna que podem levar a morte do feto. Um estudo britânico constatou que 70% dos casos de bebês que nascem com deformação no tubo neural poderiam ser impedidos com a suplementação da vitamina B₉ (ANVISA, 2019).

1.2. Métodos para a determinação de ácido fólico

Para a determinação do ácido fólico em comprimidos e em alimentos fortificados diversos estudos foram descritos na literatura utilizando métodos analíticos variados, dentre eles: cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detector de fluorescência (RUGGERI *et al.*, 1999); cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) com detector de absorvância UV (NELSON; SHARPLESS; SANDER, 2006); espectrofotometria (NAGARAJA; VASANTHA; YATHIRAJAN, 2002), fluorimetria (LAPA *et al.*, 1997); quimioluminescência (SONG; WANG, 2003); eletroforese (KOHN; MOLLIN; ROSENBACH, 1961; ZHAO *et al.*, 2006); termogravimetria (VORA *et al.*, 2002); no entanto, a maioria desses métodos listados acima possuem algumas desvantagens, como por exemplo, a necessidade de um pré-tratamento elaborado da amostra, grande quantidade de reagentes orgânicos e de alto preço, utilização de outros compostos para a extração do ácido fólico, emprego de aparelhos de elevado custo, complexidade na operação do equipamento e a alta geração de resíduos (AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016). Desta forma, novos métodos mais eficientes, rápidos e acessíveis estão sendo estudados e desenvolvidos (ULUSOY *et al.*, 2016).

1.3. Técnicas Eletroanalíticas

Os métodos eletroanalíticos abrangem medidas de algumas propriedades elétricas, como o potencial, resistência e corrente elétrica, a partir de fenômenos nos quais uma espécie redox interage quimicamente e/ou fisicamente com outros constituintes do meio, ou até mesmo com interfaces (SKOOG *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2013). O emprego de medidas elétricas na química analítica possui diversas aplicações em áreas distintas, como por exemplo, na determinação de pesticidas em alimentos e soluções aquosas (SOUZA; MACHADO, 2003; GALLI *et al.*, 2006), aplicações farmacológicas (LIMA *et al.*, 1999) e de moléculas biológicas (ZEN, 1998), análises de metais e complexos (SHAMS, 2000; DE SOUZA *et al.*, 2004).

Os métodos eletroanalíticos tem se tornado uma alternativa aos métodos convencionais para a determinação de fármacos, inclusive o ácido fólico. Estas técnicas têm sido exploradas e estudadas para a determinação de ácido fólico em comprimidos e em alimentos fortificados, como espinafre (MIRMOGHTADAIE *et al.*, 2013), farinha e arroz (SILVEIRA *et al.*, 2016). Os métodos eletroanalíticos possuem diversas vantagens, como por

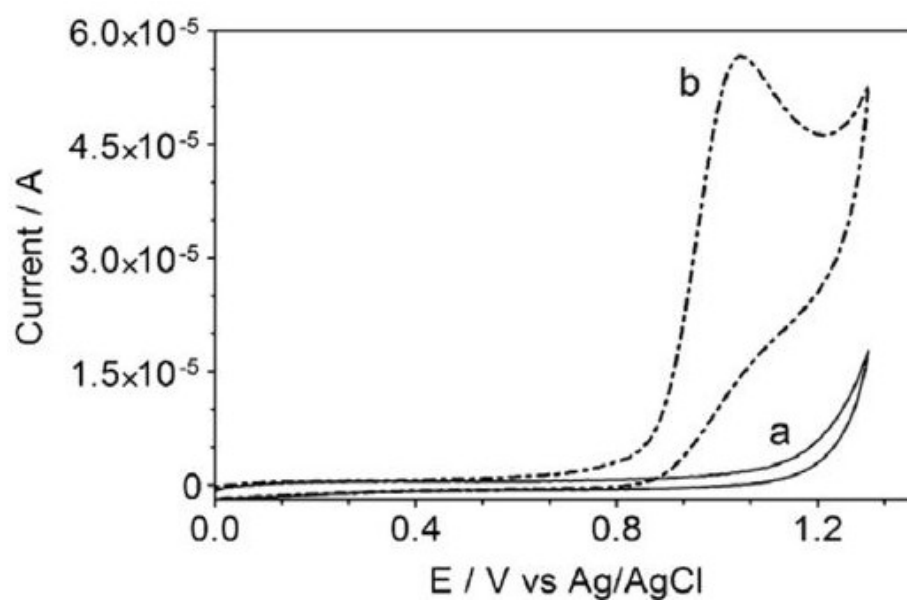
exemplo, são mais acessíveis, práticos, são de baixo custo, apresentam boa sensibilidade e moderada seletividade, possuem operações simples, tempo curto de análise, geram resultados rápidos e comparáveis ao método HPLC e outras técnicas cromatográficas de separação com detecção espectrofotométrica (SKOOG *et al.*, 2006; AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016)

As técnicas eletroanalíticas utilizadas para determinar e estudar o comportamento redox do ácido fólico foram voltametria de onda quadrada (ÇAKIR; ATAYMAN; ÇAKIR, 1997; TAHERKHANI *et al.*, 2013), cronoamperometria (RAOOF *et al.*, 2015); cronocoulometria (WEI *et al.*, 2005); voltametria de varredura linear (WANG *et al.*, 2005), voltametria de pulso diferencial (VAZE; SRIVASTAVA, 2007) e voltametria cíclica (ARAÚJO *et al.*, 2015).

O ácido fólico é um composto eletroquimicamente ativo, desta forma, o seu comportamento eletroquímico tem sido bastante estudado nos últimos anos. Kretzschmar e Jaenicke propuseram o mecanismo de reação e os produtos obtidos para a redução e oxidação eletroquímica da molécula em uma faixa de pH 1-12. A voltametria cíclica tem sido utilizada para estudar o comportamento eletroquímico da molécula de ácido fólico, e como resultado observou-se que a redução e oxidação eletroquímica é dependente do pH (KRETZSCHMAR; JAENICKE, 1971; AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

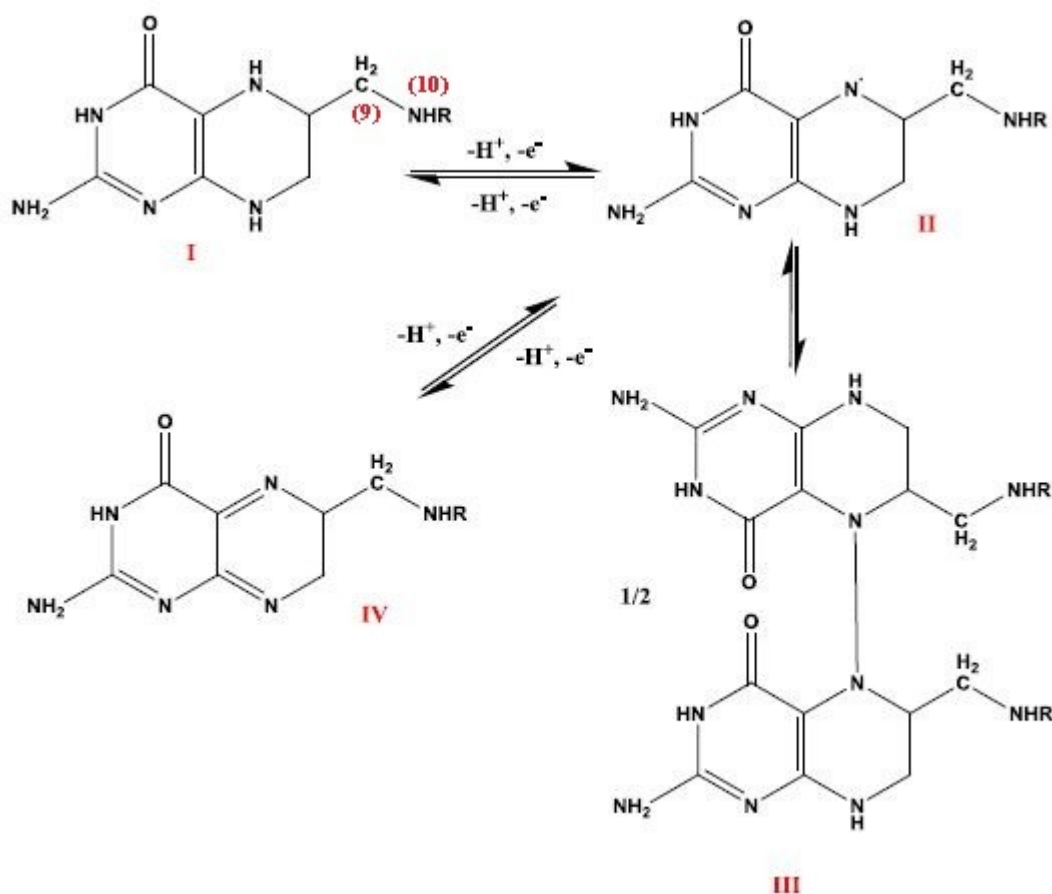
No estudo sobre a oxidação eletroquímica do ácido fólico em um intervalo de pH de 1-12, observou-se uma única onda para a oxidação anódica ($1e^-$, $1H^+$) do ácido 5,6,7,8 – tetrahidrofólico. Um voltamograma cíclico obtido neste estudo está apresentado na Figura 3. Um mecanismo de reação foi proposto para o estudo de oxidação anódica. Este é apresentado na Figura 4 (AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

Figura 3 - Voltamograma cíclico utilizando eletrodo de pasta de carbono em uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em (a) ausência e (b) presença de solução $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fólico entre os potenciais de varredura de 0,0 e 1,3 V. Utilizou-se eletrodo de referência Ag/AgCl.



Fonte: (AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

Figura 4 - Mecanismo de reação proposto para a oxidação anódica de ácido fólico em pH 6,8.



Fonte: (AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

A partir do mecanismo nota-se que o ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico inicialmente oxida para formar um radical (II), que por sua vez, pode oxidar novamente formando o ácido 6,7-dihidrofólico (IV) ou dimerizar-se e formar o composto III. A análise eletroquímica do ácido fólico tem como base a clivagem oxidativa ou redutiva da ligação do C (9) e do N (10). Kwee estudou e relatou a eletroatividade desta ligação C (9) e do N (10) a partir da voltametria cíclica e da polarografia de pulso, onde a clivagem oxidativa desta ligação foi estudada em condições aeróbicas e como produto obteve-se o derivado da pterina (KWEE, 1983; AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

Alguns estudos sobre a oxidação anódica do ácido fólico têm sido relatados na literatura. Araújo et al (2015) utilizaram o eletrodo de pasta de grafite juntamente com as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso para o estudos do comportamento da oxidação anódica do ácido fólico. Como resultado observou-se um pico bem definido e que o comportamento anódico do ácido fólico varia conforme ocorre uma alteração no pH

(ARAÚJO *et al.*, 2015). Taherkhani et al (2013) empregaram a técnica de voltametria de varredura linear juntamente com a utilização do eletrodo de pasta de carbono líquido iônico modificado por nanopartículas de ZnO para o estudo da oxidação anódica do ácido fólico. Observou-se uma onda bem definida em pH 9 (TAHERKHANI *et al.*, 2013). Como o resultado do comportamento da oxidação anódica apresentou-se bem definido, tem-se que as técnicas de voltametria podem ser aplicadas para a determinação do ácido fólico (AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

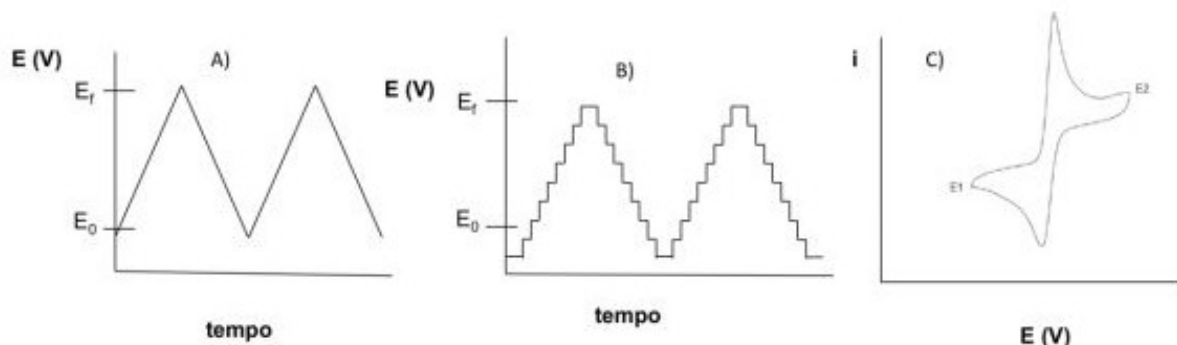
1.3.1. Voltametria cíclica (VC)

Uma das técnicas eletroquímicas empregadas neste trabalho é a voltametria cíclica e de todos os métodos disponíveis é provavelmente a mais utilizada para o estudo e também na obtenção de informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, até mesmo por pesquisadores não eletroquímicos, devido a sua facilidade de aplicação e interpretação. O método baseia-se na aplicação de um potencial ao eletrodo de trabalho que varia continuamente com o tempo, resultando na ocorrência de reações redox de espécies eletroativas na solução, supostamente devido à adsorção de espécies de acordo com o potencial aplicado e à produção de uma corrente capacitiva consequente ao carregamento da dupla camada elétrica (BRETT; BRETT, 1996; QUINTINO, 2003; PACHECO *et al.*, 2013).

A voltametria cíclica tem capacidade de gerar rápidos resultados sobre reações químicas vinculadas a processos adsorptivos, termodinâmica de processos redox e da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons. Desta forma, esta técnica encontra ampla aplicabilidade no estudo e na identificação de informações sobre mecanismos de reações redox, na detecção de espécies presentes no meio, no estudo de reversibilidade de um sistema e também em análises semi quantitativas de velocidade de reação sob várias condições (BRETT; BRETT, 1996; QUINTINO, 2003; SKOOG *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2013).

Esta técnica não é bastante usual para análise e determinação quantitativa, no entanto, é uma ótima opção quando se deseja iniciar o estudo eletroquímico de uma amostra desconhecida. A partir do gráfico adquirido é possível obter informações sobre a presença de intermediários e produtos formados da reação, bem como, em quais potenciais que ocorre o processo de transferência de elétrons (SKOOG *et al.*, 2006). Nomeia-se voltamograma o perfil de corrente elétrica em função do potencial aplicado.

Figura 5 - Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: A) potencial com varredura linear; B) potencial do tipo escada; C) voltamograma obtido para um sistema reversível.



Fonte: (PACHECO *et al.*, 2013)

Na voltametria cíclica, primeiramente a varredura de potencial é realizada em uma determinada direção e logo em seguida na direção inversa, enquanto isso a corrente é medida. Quando se utiliza esta técnica pode-se empregar um ciclo parcial, um ciclo inteiro ou até mesmo vários ciclos (SKOOG *et al.*, 2006).

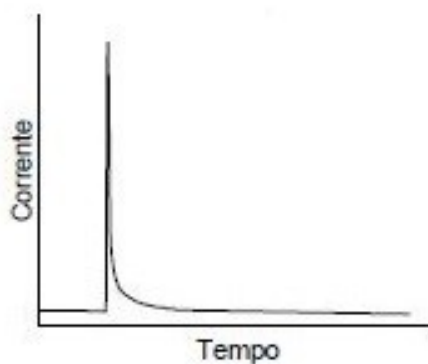
O modo que o potencial é aplicado na voltametria cíclica está apresentado na Figura 5-A, em que a resposta de corrente de um eletrodo estacionário em uma solução sem agitação é excitada na forma triangular. Outra forma de aplicação do potencial é na forma de escada (*staircase*) como ilustrado na Figura 5-B, com degraus de potenciais pequenos (da ordem de 10 mV) e tempo de duração curto (50 ms). Esta variação tem como objetivo a diminuição da contribuição da corrente capacitiva na corrente total. São denominados potenciais de inversão, os potenciais nos quais ocorre à reversão do sentido de varredura, desta forma, a partir destes potenciais de inversão é possível observar a redução ou oxidação das espécies. A Figura 5-C apresenta a resposta de corrente versus o potencial aplicado, sendo possível analisar os valores máximos de picos que corresponde à redução ou à oxidação de determinado analito (BRETT; BRETT, 1996; PACHECO *et al.*, 2013).

1.3.2. Amperometria

Outra técnica eletroquímica utilizada neste trabalho é a amperometria, a qual é bastante empregada para quantificação e estudos das reações de eletrodo e suas velocidades. Esta técnica também é utilizada como um complemento à voltametria cíclica para análise de

reações eletroquímicas. A amperometria baseia-se em um sensor amperométrico que mede uma corrente *vs.* tempo em um único potencial. Pode-se dizer que um sensor amperométrico é um sensor voltamétrico para um potencial fixo, isso porque, um sensor voltamétrico registra muitos pontos em uma região determinada do perfil corrente *vs* potencial (BRETT; BRETT, 1996; QUINTINO, 2003). Na Figura 6 é apresentado o pico da corrente que decai rapidamente com o tempo de um composto que sofre oxidação.

Figura 6 - Resposta da corrente em função do tempo para um experimento de único degrau de potencial.



Fonte: Adaptado de (QUINTINO, 2003).

Nesta técnica um potencial fixo é aplicado sobre o eletrodo de trabalho, sendo que neste potencial ocorre a redução ou oxidação eletroquímica do analito eletroativo estudado. A medida de interesse é a diferença entre a corrente produzida pelo analito e pelo eletrólito suporte, a qual deve ser proporcional à concentração do composto estudado. Antes da aplicação da amperometria alguns estudos devem ser realizados, como por exemplo, o emprego de técnicas de varredura de potencial para selecionar o potencial de redução ou oxidação adequado para a análise (QUINTINO, 2003).

Uma vantagem da amperometria é que a corrente residual alcançada apresenta medidas baixas e isto está relacionado à ausência de corrente capacitiva e a um menor efeito na contaminação da superfície do eletrodo de trabalho em consequência do menor tempo de contato do analito estudado com o eletrodo. Este fator faz com que a amperometria possua maior sensibilidade quando comparada a voltametria de varredura de potenciais. Esta técnica eletroquímica possui diversas aplicações, como por exemplo, na eletroanálise, nas medições em fluxo, em titulações amperométricas, entre outros. Quando correlacionada a métodos de

alta velocidade, tais como FIA e BIA, esta técnica fica ainda mais atrativa (BRETT; BRETT, 1996; QUINTINO, 2003).

A amperometria possui algumas limitações e desvantagens, como por exemplo, a baixa seletividade e alguns problemas associados com os processos adsorptivos dos compostos na superfície do eletrodo. Caso a análise seja realizada em potenciais extremos, pode ocorrer a oxidação ou redução de outras espécies eletroativas em potenciais abaixo daquele definido, sendo assim, uma solução para este problema é a utilização de valores mínimos de potenciais. Outra complicação é a contaminação da superfície do eletrodo de trabalho utilizado, pois podem reproduzir sinais eletroquímicos não desejáveis dos produtos adsorvidos, bem como, também pode afetar diretamente a taxa de transferência de carga entre o composto e o eletrodo (QUINTINO, 2003; STEFANO, 2016). Algumas alternativas estão sendo estudadas para evitar a contaminação ou realizar a limpeza da superfície do eletrodo, por exemplo, utilização da amperometria pulsada (STEFANO *et al.*, 2012) ou uso de eletrodos modificados (HAGHIGHI *et al.*, 2007).

1.4. Análise por Injeção em Batelada (BIA)

Para análises eletroquímicas existem diversos métodos quantitativos precisos para a detecção de inúmeros analitos (KAVOSI *et al.*, 2014; PACHECO *et al.*, 2015). Os sistemas eletroquímicos portáteis apresentam uma grande capacidade em obter informações analíticas mais rápidas e simples quando comparado aos métodos tradicionais encontrados em laboratórios. Desta forma, nota-se o aumento e intensificação da utilização desses sistemas eletroquímicos portáteis em diversas aplicações, como por exemplo, na área da saúde e da agricultura, principalmente onde os ambientes possuem recursos restritos (DOU *et al.*, 2016).

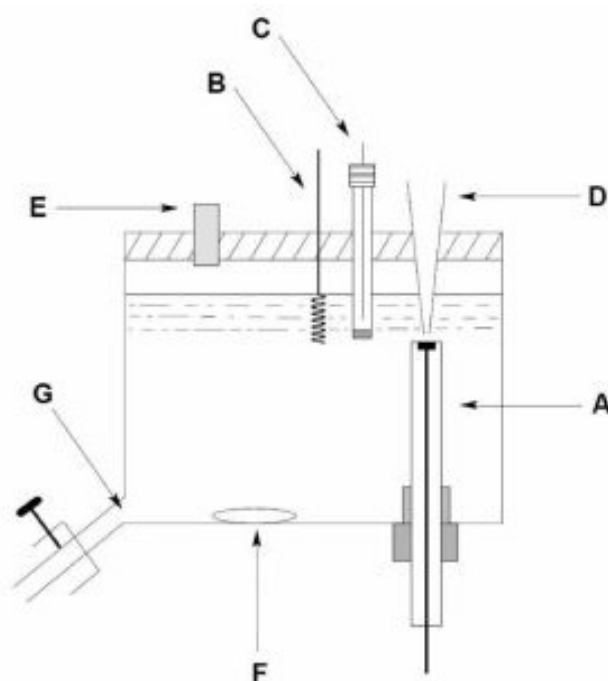
No início da década de 90, Wang e Taha desenvolveram um sistema portátil nomeado como análise por injeção em batelada (BIA, do inglês *Batch Injection Analysis*), o qual é uma opção para a realização de análises rápidas em relação aos métodos tradicionais. Em uma análise no sistema BIA com detecção eletroquímica, pequenas alíquotas compondo-se de analito são injetadas com o auxílio de uma micropipeta (mais comumente eletrônica) diretamente na superfície do eletrodo de trabalho imerso em um volume de solução inerte, sendo essa configuração chamada “*wall-jet*” (WANG; TAHA, 1991).

Antigamente a ponta da micropipeta, assim como os eletrodos de trabalho, referência e contra eletrodo ficavam submersos em um grande volume de solução, no entanto, atualmente esse volume diminuiu e está sendo utilizado aproximadamente 180 mL (QUINTINO, 2003).

Este volume encontrado dentro da célula provocará a diluição do analito ou do padrão posteriormente ao sinal analítico obtido.

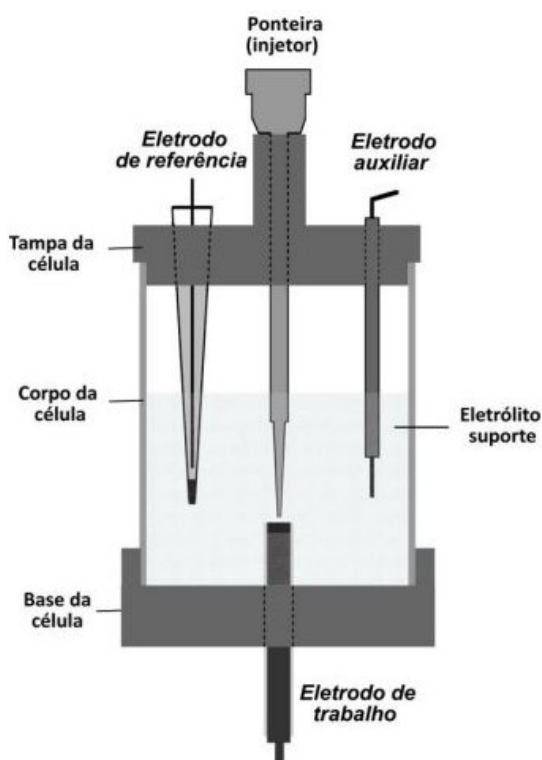
Na figura 7 encontra-se esquematizado a primeira montagem do sistema BIA quando associada à amperometria. Este sistema consiste em uma célula eletroquímica construída de acrílico, onde o eletrodo de trabalho (A) é posicionado no sentido oposto da injeção, normalmente fixado através de um orifício aberto na base da célula. Para as injeções das soluções pode ser utilizada uma micropipeta convencional ou micropipeta eletrônica (WANG *et al.*, 1992). A ponteira da micropipeta (B) é acomodada em um orifício na tampa da célula posicionado na direção oposta ao eletrodo de trabalho, de forma que as injeções sejam realizadas com a mesma distância entre a ponteira e a superfície do eletrodo. Em outros dois orifícios na tampa superior da célula são posicionados o eletrodo de referência (C) e o eletrodo auxiliar (D). Outro orifício (E) pode ser utilizado para inserir o eletrólito suporte, que é mantido sob agitação (F), caso seja necessário. Um dreno (G) pode ser adaptado à base da célula se for preciso.

Figura 7 - Diagrama esquemático da célula BIA. (A) eletrodo de trabalho; (B) eletrodo auxiliar; (C) eletrodo de referência; (D) ponteira da micropipeta; (E) orifício para preenchimento da célula; (F) barra de agitação; (G) dreno.



Conforme visto na Figura 7 a primeira montagem do sistema BIA contava alguns recursos como o dreno, barra de agitação e orifício para o preenchimento da célula, no entanto, na Figura 8 está representado um diagrama da célula BIA mais recentemente, a qual não conta com os recursos citados acima e se assemelha mais com a célula utilizada neste trabalho. As duas células exibidas possuem características semelhantes, como por exemplo, o eletrodo de trabalho é fixado no sentido oposto da injeção, o eletrodo auxiliar e de referência são posicionados na tampa superior.

Figura 8 - Diagrama esquemático da célula BIA atualmente contendo orifício para o eletrodo de referência, eletrodo auxiliar, ponteira da micropipeta e eletrodo de trabalho, tampa e base da célula.

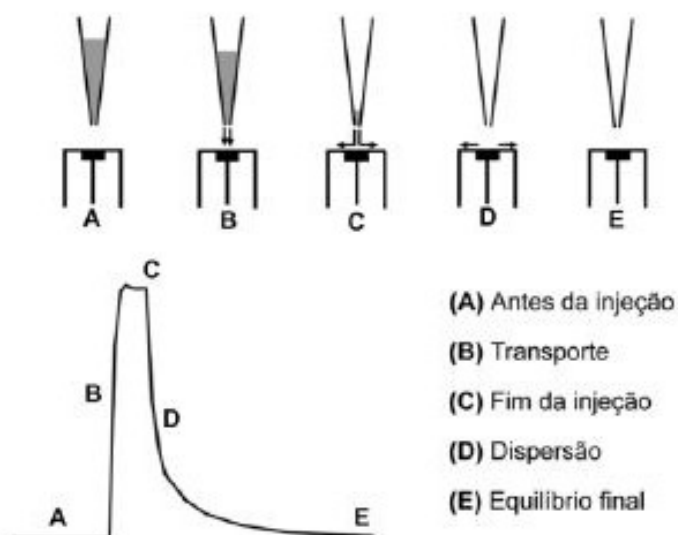


Fonte: (SANTOS, 2016).

Os conceitos sobre o sistema BIA podem ser explicados com base na Figura 8. Quando as soluções de amostra ou padrão são injetadas ocorre à formação de uma zona que se dispersa na distância da ponteira até o eletrodo, de forma que o transporte é reprodutível e a dispersão controlada em tempo e espaço. O sinal obtido como resposta das injeções tem forma de pico transiente, o qual apresenta queda rápida do sinal até a linha base (WANG, 1992;

BRETT; BRETT; MITOSERIU, 1995). A magnitude do pico encontrado é proporcional à concentração do analito injetado. A Figura 9 apresenta as etapas para a aquisição do sinal.

Figura 9 - Etapas de operação do sistema BIA e o amperograma obtido: (A) Antes da injeção; (B) Transporte; (C) Fim da injeção; (D) Dispersão; (E) Equilíbrio final.



Fonte: (QUINTINO; ANGNES, 2004).

Com base na Figura 9, observa-se que antes da injeção da solução que contém moléculas eletroativas há uma corrente constante (Etapa A), devido à corrente residual gerada pelo eletrólito suporte. Isto indica que nesta etapa não ocorre transferência de elétrons na interface eletrodo/solução. Logo que a amostra é injetada nota-se um rápido aumento da corrente, devido ao início do processo de oxidação ou redução do analito transportado até a superfície do eletrodo de trabalho por convecção (Etapa B). Durante a injeção do analito, a corrente atinge um valor máximo que permanece constante até o final da injeção (Etapa C). Após o fim da injeção ocorre uma queda acentuada do sinal analítico, em virtude da mudança do transporte que passa de convectivo para difusional (Etapa D). Neste momento, o analito começa a ser diluído pelo eletrólito suporte através do processo de difusão, atingindo, então, o equilíbrio existente antes da injeção (Etapa E) (QUINTINO; ANGNES, 2004). Para que o retorno da corrente ao patamar inicial da injeção seja acelerado, normalmente utiliza-se a agitação (mecânica ou magnética) na solução no interior da célula BIA (PEREIRA *et al.*, 2013).

A técnica BIA possui algumas características relevantes, como por exemplo: simplicidade, alta frequência analítica, rapidez, utilização de baixos volumes de amostras e reagentes, boa repetibilidade e sensibilidade. O sistema BIA possui a vantagem de baixa contaminação da superfície do eletrodo de trabalho em relação às técnicas estacionárias e isto se deve ao pequeno tempo de contato entre o analito e o eletrodo de trabalho durante as análises (QUINTINO, 2003; STEFANO, 2016).

Na técnica BIA normalmente utiliza-se micropipetas eletrônicas, as quais proporcionam ótimos resultados quando se refere à precisão no processo de injeção, devido à reprodutibilidade do movimento do pistão e também pelas condições de volume e velocidade de injeção que podem ser reguladas eletronicamente (WANG; TAHA, 1991). No entanto, muitas vezes estas pipetas eletrônicas não se encontram disponíveis nos laboratórios, como consequência nota-se a necessidade do uso de pipetas manuais, cuja repetibilidade depende da habilidade do operador.

O detector amperométrico é um dos mais utilizados no sistema BIA, sendo que são encontrados na literatura diferentes tipos de materiais utilizados como eletrodo de trabalho, como por exemplo, carbono vítreo (QUINTINO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2016), screen-printed (ALMEIDA *et al.*, 2016), ouro (TORMIN *et al.*, 2015).

Visto que o ácido fólico é um composto eletroativo bastante importante na indústria farmacêutica e na indústria alimentícia, nos últimos anos houve um crescimento no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação e quantificação deste composto. Alguns eletrodos têm sido empregados na determinação do ácido fólico, cita-se como exemplo, eletrodo de carbono vítreo modificado com nanofios de bismuto (ANANTHI; KUMAR; PHANI, 2015), eletrodo de grafite modificado com DNA (MIRMOGHATAIE *et al.*, 2013) e eletrodo de ouro modificado com nanotubos de carbono de parede múltipla (WEI *et al.*, 2005). No entanto, ainda não são conhecidos trabalhos que empregam eletrodos impressos e/ou eletrodo folha de grafite pirolítico, os quais são favoráveis para o avanço de métodos eletroanalíticos portáteis.

1.5. Eletrodo Folha de Grafite Pirolítico (FGP)

Os sensores descartáveis são produzidos com diferentes materiais de baixo custo e possuem diversas vantagens, dentre elas, a possibilidade de serem produzidos em larga escala, apresentam respostas rápidas, alta sensibilidade e reprodutibilidade. Alguns exemplos destes sensores descartáveis incluem: eletrodos de folha de grafite, os quais foram empregados na

determinação de fármacos (OLIVEIRA; MUNOZ; ANGNES, 2010), assim como a sua utilização como substratos para a imobilização enzimática para a preparação de biossensores (PALLESCHI; TURNER, 1990), e formação de polímeros condutores (HRISTEA; GHEORGHE; GHEORGHE, 2006); eletrodos impressos (*SPEs, do inglês screen-printed electrodes*), que foram utilizados na determinação de diferentes analitos em amostras ambientais (ALMEIDA; RICHTER; MUNOZ, 2014) e em amostras farmacêuticas (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016; STEFANO, 2016; BACKES *et al.*, 2017).

A escolha do transdutor é um dos principais fatores para o desenvolvimento de um sensor eletroquímico. Grande parte dos estudos científicos escolheu materiais a base de carbono, pois este elemento se apresenta em diferentes formas e diferentes alótropos, o que faz com que seja um material bastante atrativo (SILVA, 2017).

Os nanotubos de carbono, fulereno, grafite e o diamante são exemplos de alótropos do carbono, sendo os dois últimos citados os mais conhecidos e são materiais com propriedades bastante distintas. O diamante apresenta alto índice de refração, transparência e possui outra característica importante, seu poder isolante. Diferentemente do diamante, o grafite é um material opaco e possui como propriedades físicas a condutividade térmica e elétrica, devido a sua estrutura peculiar. Essas diferentes formas de alótropos do carbono com suas respectivas características faz com que este elemento seja atrativo e importante para inúmeras aplicações (MUSCELLI, 2012).

Nos últimos anos houve um enorme crescimento no desenvolvimento e na utilização de eletrodos nas diversas formas do carbono no meio eletroanalítico. Estes materiais apresentam diversas vantagens, se destacam: baixo custo, estabilidade mecânica e química, boa condutividade elétrica, versatilidade química, ampla área superficial, entre outras (OLIVEIRA; MUNOZ; ANGNES, 2010; ZHANG *et al.*, 2016).

Vários trabalhos foram publicados onde se descreve a aplicação de eletrodos baseados nas formas alotrópicas do carbono: eletrodos de pasta de carbono (BERGAMINI *et al.*, 2006; JANEGITZ; MARCOLINO JUNIOR; FATIBELLO-FILHO, 2007), diamante dopado com boro (DE ALBUQUERQUE PEDROSA; CODOGNOTO; AVACA, 2003; SVORC *et al.*, 2012), nanotubos de carbono (WANG *et al.*, 2002; SHAHROKHIAN; GHALKHANI; AMINI, 2009) e carbono vítreo (HU *et al.*, 2001; ALOTHMAN *et al.*, 2010), grafeno (PUMERA *et al.*, 2010; PING *et al.*, 2012).

Mais recentemente, os eletrodos à base de papel vem ganhando espaço na literatura pois possuem algumas características positivas quando comparado a outros eletrodos, por exemplo, podem ser descartáveis, adapta-se em sistemas portáteis, facilidade no manuseio,

robustez e são provenientes de fontes renováveis, desta forma, não agredem o meio ambiente (HU *et al.*, 2014).

Giuliani *et. al* (GIULIANI *et al.*, 2016) relatou pela primeira vez a viabilidade de obtenção de eletrodos a base de carbono a partir da pirólise de diferentes fontes de papel disponíveis. O material obtido foi testado na construção de um biossensor eletroquímico para ácido úrico e também na determinação amperométrica não-enzimática da glicose (DURAN *et al.*, 2016). Assim como os eletrodos de papel, as folhas de grafite possuem características importantes como o baixo custo (podem ser descartáveis), fácil manuseio e robustez e além disso, apresentam maior resistência mecânica o que permite maior número de configurações e aplicações, mantendo elevada condutividade.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo demonstrar o uso do sistema de análise por injeção em bateladas (BIA) com a técnica de amperometria convencional utilizando um eletrodo de grafite pirolítico para a determinação e quantificação do ácido fólico em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos do método desenvolvido foram comparados com os resultados alcançados por meio do método HPLC.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e soluções

Para o preparo das soluções foi utilizado água deionizada ($R \geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$) do sistema de purificação Milli-Q Plus da Millipore (Bedford, MA, EUA), sendo que todas as soluções foram feitas com reagentes de grau analítico. Foram utilizadas soluções de ácido acético glacial de Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), ácido fosfórico de Synth (São Paulo, Brasil), ácido bórico de Applechem (Hessen, Alemanha), hidróxido de sódio de Panreac (Barcelona, Espanha), metanol de Applechem (Hessen, Alemanha), tetrabutilamônio dihidrogenofosfato de Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), sal de sódio ácido 1-octanesulfônico de Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil), trietilamina de Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). O ácido fólico empregado foi adquirido da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). As amostras de ácido fólico 2 e 5 mg utilizadas durante este trabalho foram obtidas em farmácias locais. As soluções foram preparadas antes dos testes realizados.

3.2. Instrumentação

Para a realização das análises eletroquímicas utilizou-se um μ -Autolab Tipo III (Eco Chemie, Utrecht, Holanda), este foi conectado em um sistema de análises por injeção em batelada (BIA), com a utilização de uma célula produzida no próprio laboratório de pesquisa. Um software NOVA versão 1.11 foi responsável por fazer contato da célula com o potenciostato e pela coleta e tratamento de dados.

A célula do sistema BIA utilizada para a realização do experimento consiste em uma cavidade cilíndrica de polipropileno e ainda possui duas tampas de polipropileno presas na extremidade superior e inferior do cilindro, este tem um diâmetro interno de 6 cm e o volume de 100 mL. A tampa superior contém três furos onde se encaixará o eletrodo auxiliar e de referência, e também para entrada da micropipeta eletrônica (diâmetro 3,7 mm). A parte inferior da célula possui um orifício, onde é inserido o eletrodo de trabalho. Um O-ring de 0,8 cm de diâmetro foi utilizado para delimitar a área do eletrodo e para que não houvesse vazamento. A distância do centro do eletrodo de trabalho e da ponta da micropipeta é de aproximadamente 1 mm.

Uma micropipeta eletrônica Eppendorf (Multipette® stream) foi utilizada para a realização das injeções das soluções padrões e amostras, a qual libera injeções de 10 até 1000

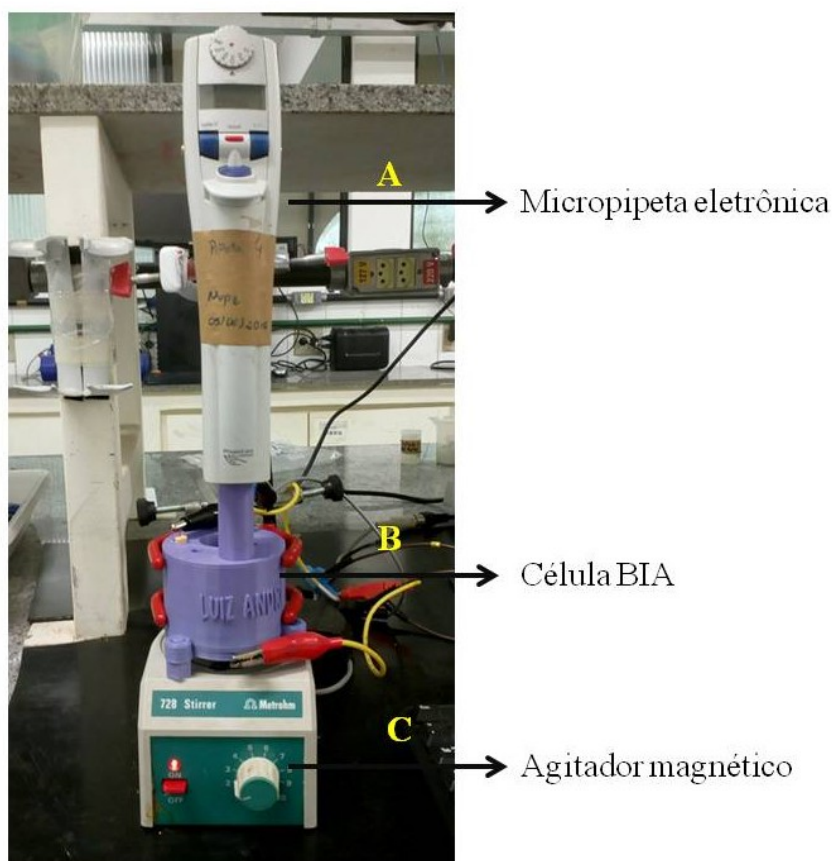
μL (utilizando uma ponteira Combitip® de 1mL) a uma velocidade de dispensa programável (de 28 a 330 $\mu\text{L s}^{-1}$). Um agitador magnético (HI 190M, HANNA instruments) com velocidade de 500 rpm foi empregado neste trabalho.

Figura 10 - Imagem de uma célula utilizada no sistema BIA para eletrodos impressos.



Fonte: A autora.

Figura 11 - Imagem da montagem do sistema BIA utilizado durante a análise, utilizando uma célula produzida no próprio laboratório (B), micropipeta eletrônica Eppendorf (A) e o um agitador magnético (HI 190M) (C).



Fonte: A autora.

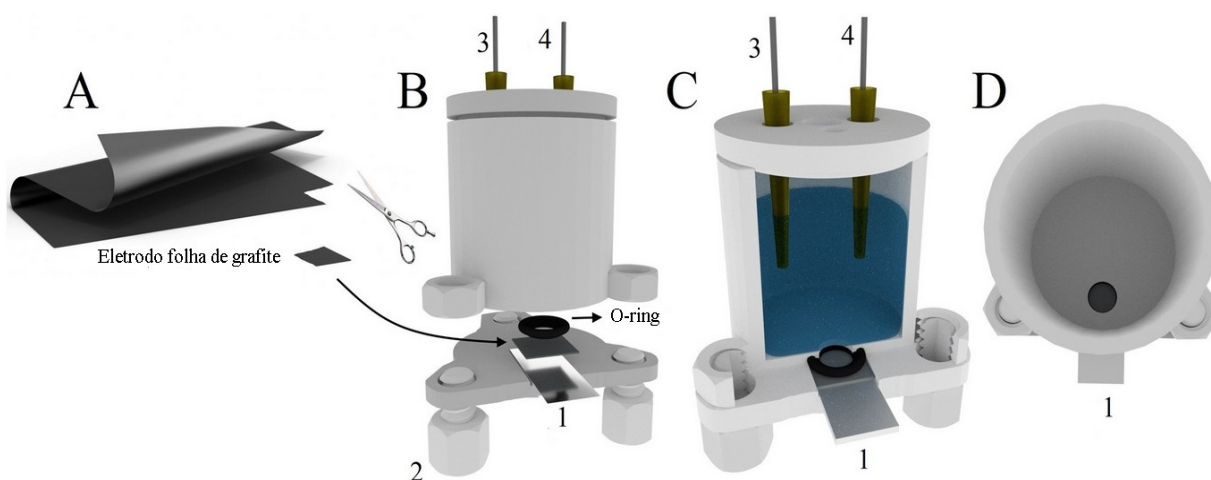
As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema de HPLC do tipo Shimadzu LC-10 com detector UV-Vis (SPD-10AV) e uma coluna C_{18} (Phenomenex, 100 mm x 4.60 mm, 5 μ m). As condições cromatográficas foram adaptadas de (OSSEYI; WEHLING; ALBRECHT, 1998). A fase móvel empregada compõe-se de 25:75 de uma mistura de sal de sódio ácido 1-octanesulfônico (25%) com trietilamina (0,1%) em metanol (v/v). O ajuste de pH foi realizado com ácido fosfórico.

3.3. Eletrodos

O contra eletrodo consiste em um fio de platina e o eletrodo de referência é um eletrodo miniaturizado de Ag/AgCl/saturado com KCl. O eletrodo de trabalho utilizado foi o

eletrodo de grafite pirolítico “Pyrolytic graphite sheets” da Panasonic - Mouser Electronics (Mansfield, Texas) com espessura de 0,025 mm. O eletrodo de trabalho foi cortado em uma medida de aproximadamente 10x10cm, sendo que foi cortado novamente para ao ajuste na célula eletroquímica, onde se obteve uma medida em torno de 1x1cm. Antes das análises serem iniciadas, foram realizadas 10 voltametrias cíclicas para a limpeza da superfície do eletrodo, desta forma o eletrodo de trabalho estava pronto para as análises. Na Figura 12 está representado o corte do eletrodo de folha de grafite e seu posicionamento na célula BIA.

Figura 12 - Representação esquemática da fabricação de eletrodos descartáveis: (A) substrato em folha de grafite; (B) posicionamento de uma peça de folha de grafite (1x1cm) na célula impressa em 3D (área do eletrodo definida pelo diâmetro do O-ring); (C) vista interna da célula impressa em 3D; (D) vista superior da célula impressa em 3D com a folha de grafite como eletrodo de trabalho na parte inferior da célula. (1) Base de placa metálica para contato elétrico do eletrodo de trabalho; (2) parafusos impressos em 3D; (3) eletrodo auxiliar; (4) eletrodo de referência.



Fonte: Adaptado de (SILVA et al., 2019).

3.4. Preparo de amostras

Para a realização das análises eletroquímicas macerou-se três comprimidos de cada amostra e uma quantidade adequada foi pesada e dissolvida em hidróxido de sódio em uma concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, logo após foram levadas para o banho ultrassônico por aproximadamente 20 minutos. As amostras foram filtradas e depois foram diluídas em

eletrólito suporte (tampão BR pH 6 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para a injeção no sistema BIA. Pouco antes dos experimentos serem realizados, as soluções padrões de ácido fólico foram preparadas por meio de diluição em eletrólito.

Para a injeção no HPLC as amostras foram dissolvidas diretamente em hidróxido de sódio e filtradas com filtro de seringa de porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ com membrana de PTFE. Logo após, foram diluídas na fase móvel (25:75 de uma mistura de sal de sódio ácido 1-octanesulfônico (25%) com trietilamina (0,1%) em metanol (v/v)) e injetadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ácido fólico é parcialmente solúvel em água, apresentando melhor solubilidade em meios básicos, desta forma, foi necessário realizar a solubilização de ácido fólico em solução básica (solução estoque concentrada), com posterior diluição em eletrólito suporte. Realizou-se o teste para averiguar a solubilidade do ácido fólico em hidróxido de sódio, em concentração que não altere de forma considerável o pH da solução tampão (eletrólito suporte), a qual foi utilizada para diluir a solução estoque de ácido fólico antes de realizar a injeção na célula eletroquímica. Solução de hidróxido de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foi então utilizada para o preparo da solução estoque de ácido fólico (1 mmol L^{-1}).

Para observar o comportamento eletroquímico do ácido fólico, alguns voltamogramas cíclicos foram obtidos em diferentes pHs, de forma a otimizar o pH e a solução que compõem o eletrólito suporte. Observou-se nas Figuras 13 e 14 que o meio que contém pH aproximadamente neutro favorece a oxidação do ácido fólico, resultando em picos bem definidos. A oxidação do ácido fólico foi estudada em diferentes meios, dentre eles solução tampão Britton-Robinson (BR) (fosfato, borato e acetato de sódio) $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ em pH de 2, 4, 6, 7 e 8, tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 4,75) e em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,5).

Figura 13- Voltamogramas cíclicos para 1 mmol L^{-1} de ácido fólico em uma solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs (2, 4, 6, 7 e 8). Eletrodo: FGP.

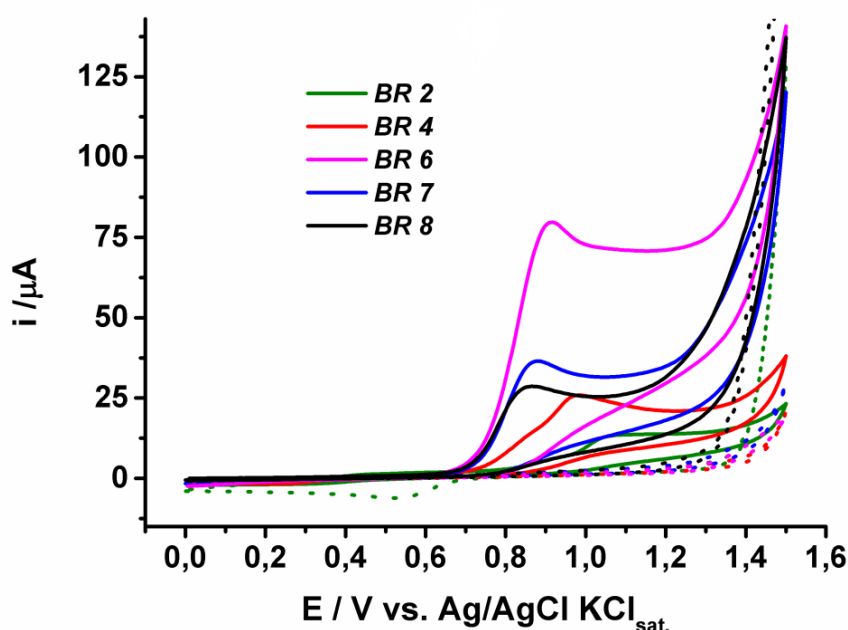
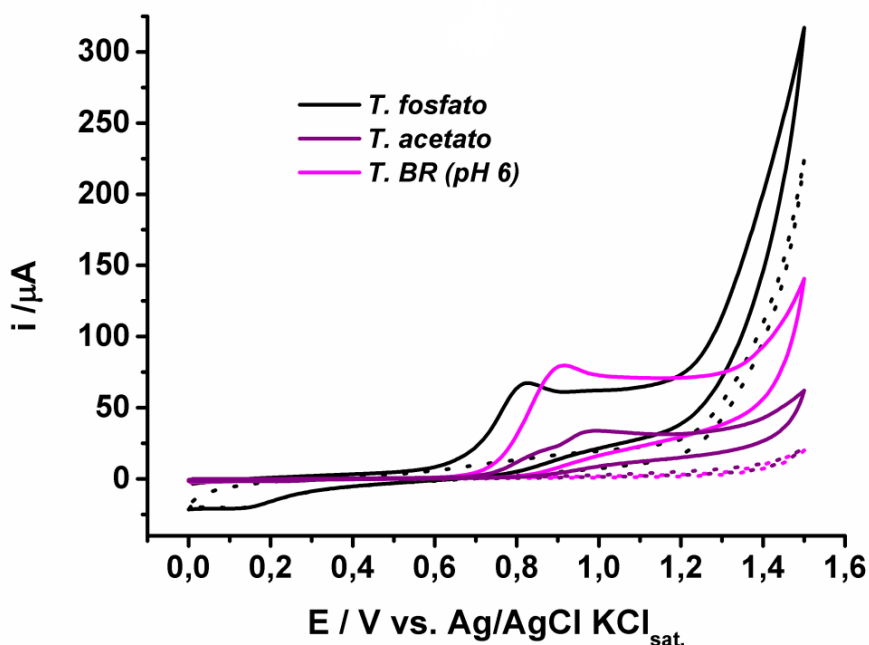


Figura 14 - Voltamogramas cíclicos para 1 mmol L⁻¹ de ácido fólico em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 4,75), em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 7,5) e em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 6. Eletrodo: FGP.



A partir dos voltamogramas cíclicos pode-se observar que a oxidação do ácido fólico apresenta um pico anódico em aproximadamente 0,9 V. O meio escolhido como eletrólito suporte para a realização dos próximos procedimentos de análise foi o tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ em pH 6 por fornecer melhores resultados de corrente quando comparado aos outros meios estudados.

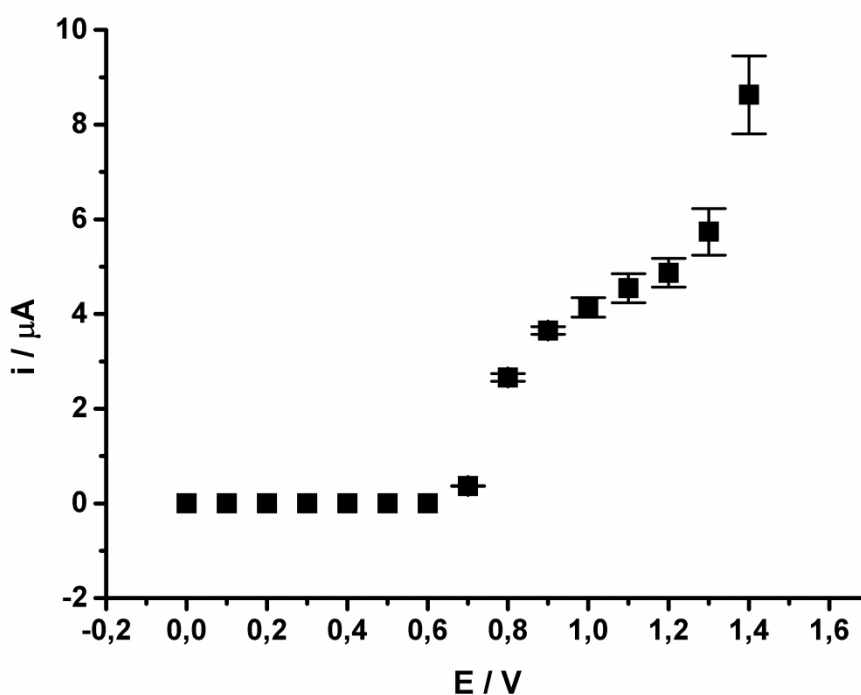
Observou-se forte adsorção das moléculas de ácido fólico na superfície do eletrodo de trabalho, uma vez que nos testes amperométricos realizados, os picos apresentaram alargamento e demandaram um longo tempo para retorno à linha base. Na literatura há trabalhos que relatam a adsorção da molécula de ácido fólico na superfície de eletrodos diferentes, e vários estudos estão sendo realizados para investigar o comportamento adsorvente do ácido fólico. Essa adsorção na maioria das vezes é atribuída ao anel fenílico da parte ácido p-aminobenzóico. Gall e Berg utilizaram a técnica de voltametria cíclica para estudar o comportamento eletroquímico do ácido fólico e compostos relacionados. Neste estudo, propuseram que na molécula de ácido fólico o sítio de adsorção está localizado entre a ligação C (9) e N (10) e atribuíram o fenômeno de absorção ao anel fenílico do benzeno relacionado aos elétrons dos orbitais p disponíveis (LE GALL; VAN DEN BERG, 1993; AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

Na literatura são apresentados estudos sobre os diferentes fatores que podem afetar a adsorção da molécula de ácido fólico. Alguns desses fatores que afetam diretamente a resposta eletroquímica do ácido fólico são: etapa de pré-concentração, mudança no pH do meio eletrolítico, métodos de varredura e presença de impurezas ativas na superfície (AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016).

De forma a amenizar o problema de adsorção foi necessário empregar um sistema de agitação, e o escolhido foi a agitação magnética. Logo após a escolha foi fundamental realizar as otimizações dos parâmetros do sistema sob agitação.

Voltamogramas hidrodinâmicos foram realizados para a oxidação do ácido fólico em eletrodo de folha de grafite pirolítico na solução tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6). Nesta análise, soluções padrões contendo $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido fólico foram injetadas em triplicata no sistema BIA com detecção amperométrica, nas condições de velocidade de injeção em $153 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção em $100 \text{ } \mu\text{L}$. A Figura 15 apresenta o voltamograma hidrodinâmico obtido, correspondente à média ($n=3$) dos valores de corrente encontrados em função dos potenciais aplicados, variando na faixa de 0,0 a +1,4 V.

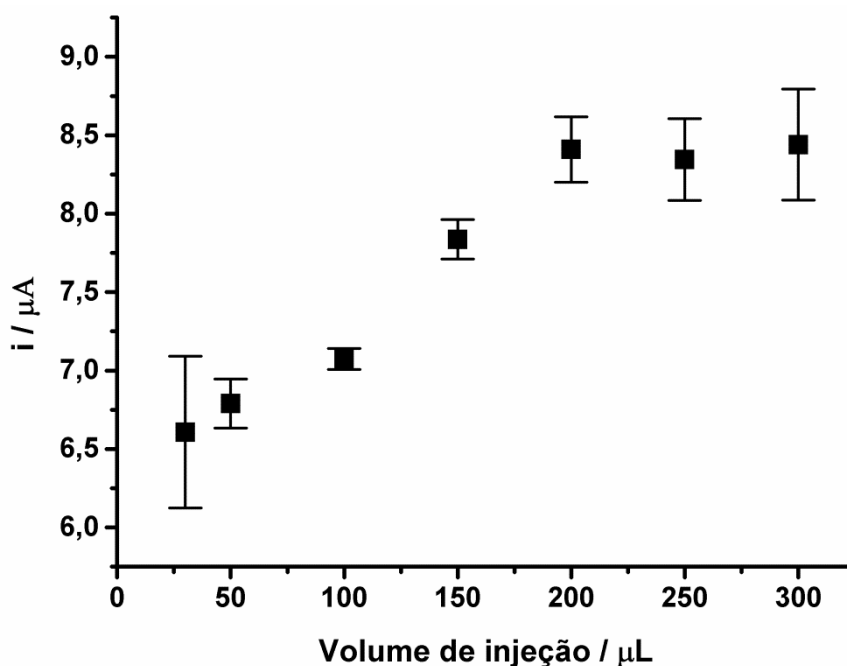
Figura 15 - Voltamograma hidrodinâmico para $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido fólico em solução tampão BR pH = 6, concentração $0,12 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo: FGP; Condições: vazão = $153 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$; volume de injeção = $100 \text{ } \mu\text{L}$; agitação magnética = 500 rpm.



O potencial de trabalho escolhido foi de +1,0 V, pois é um potencial que forneceu uma corrente satisfatória, um pequeno desvio padrão. Optou-se por um potencial não tão elevado para diminuir a possibilidade de interferência de excipientes presentes na amostra.

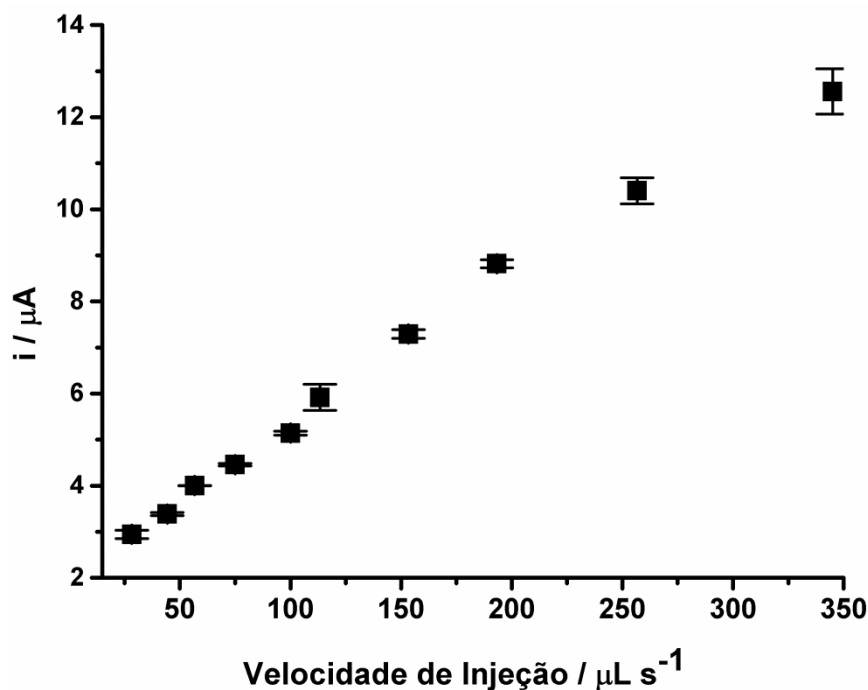
Os parâmetros do sistema BIA como velocidade de injeção e volume injetado são controlados pela micropipeta eletrônica e foram otimizados utilizando a agitação magnética na velocidade 500 rpm, usando uma barra magnética de 1 cm. A Figura 16 apresenta a variação da corrente em função do volume de injeção e a Figura 17 apresenta a variação da corrente em função da velocidade de injeção, no qual foi aplicada 1,0 V para ambas análises.

Figura 16 - Estudo do volume de injeção para ácido fólico $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em BR pH = 6. Eletrodo: FGP; E = +1,0 V. Sob agitação magnética, velocidade = 500 rpm.



De acordo com a Figura 16 observou-se que a corrente de pico aumentou com o aumento do volume injetado, no entanto, nota-se um aumento significativo na corrente a partir do volume de injeção de 100 μL de ácido fólico no sistema BIA, atingindo um patamar a partir de 200 μL . Portanto, devido à melhor resposta de corrente, o volume de 200 μL foi usado posteriormente para as análises seguintes.

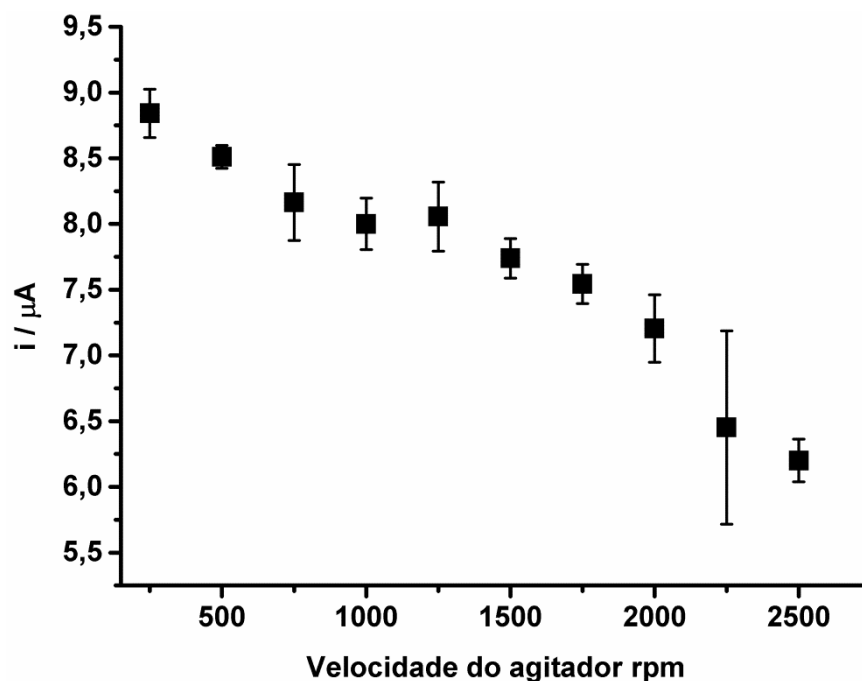
Figura 17 - Estudo da velocidade de injeção para ácido fólico $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em BR pH = 6. Eletrodo: FGP; $E = +1,0 \text{ V}$. Sob agitação magnética, velocidade = 500 rpm.



A velocidade de injeção do sistema BIA foi estudada mantendo o volume de $200 \mu\text{L}$ constante. A relação entre velocidade de injeção e corrente de pico seguiu um comportamento linear, não chegando a um patamar máximo de corrente, priorizou-se maiores valores de corrente de pico, no entanto, uma velocidade de injeção muito alta gera maiores desvios nas análises (257 e $345 \mu\text{L s}^{-1}$), logo escolheu-se para as demais análises amperométricas, uma velocidade de injeção de $193 \mu\text{L s}^{-1}$, pois contém uma corrente de pico satisfatória e um desvio padrão pequeno.

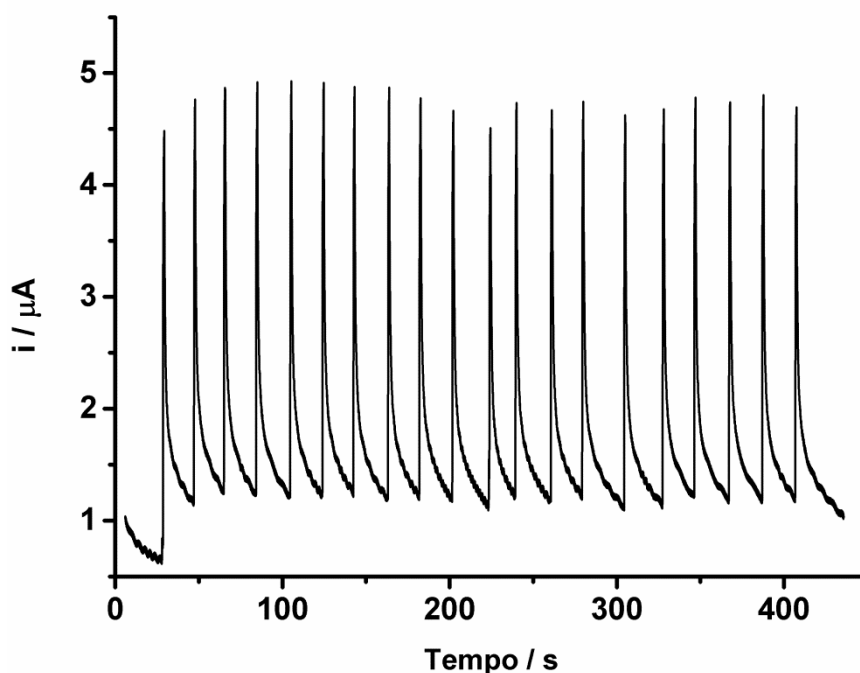
A velocidade de agitação foi otimizada empregando a velocidade de injeção e o volume de injeção já otimizados anteriormente ($193 \mu\text{L s}^{-1}$ e $200 \mu\text{L}$, respectivamente). A Figura 18 apresenta a variação da corrente em função da velocidade do agitador.

Figura 18 - Estudo de velocidade agitação para ácido fólico $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em BR pH = 6. Eletrodo: FGP; $E = +1,0 \text{ V}$. Condições: vazão = $193 \mu\text{L s}^{-1}$; volume de injeção = $200 \mu\text{L}$.



A partir da Figura 18 observou-se que 500 rpm pode ser utilizado devido ao seu baixo desvio padrão e a resposta satisfatória em relação a corrente, além disso, os amperogramas apresentaram-se melhores, sem maiores alargamentos na base dos picos e retorno mais rápido para a linha base, portanto foi a velocidade escolhida para a continuação da análise. Sob as condições otimizadas realizou-se o estudo de repetibilidade ($n=20$) com uma concentração de ácido fólico ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$) apresentado na Figura 19.

Figura 19 - Teste de repetibilidade (n = 20) para ácido fólico em concentração de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em BR pH = 6. Eletrodo: FGP; E = +1,0 V. Condições: vazão = $193 \mu\text{L s}^{-1}$; volume de injeção = $200 \mu\text{L}$. Sob agitação magnética, velocidade = 500 rpm.



Nesta análise, o desvio padrão foi calculado conforme a Equação 1 e obteve-se 2,8%, portanto tem-se que o desvio padrão encontrado foi menor que o desvio padrão aceito (5%). Com base nisto, conclui-se que a utilização da agitação foi necessária para a melhoria nos resultados, pois ajudou significativamente nos problemas de adsorção do ácido fólico no eletrodo, melhorando a precisão do método. O baixo desvio padrão pode ser atribuído à posição da micropipeta eletrônica em relação ao eletrodo de trabalho, bem como, também à precisão da micropipeta eletrônica na dispensa do volume e da velocidade de injeção. A equação 1 mostra o cálculo do desvio padrão relativo (DPR).

$$DPR = \frac{DPx}{\bar{x}} \times 100 \quad (1)$$

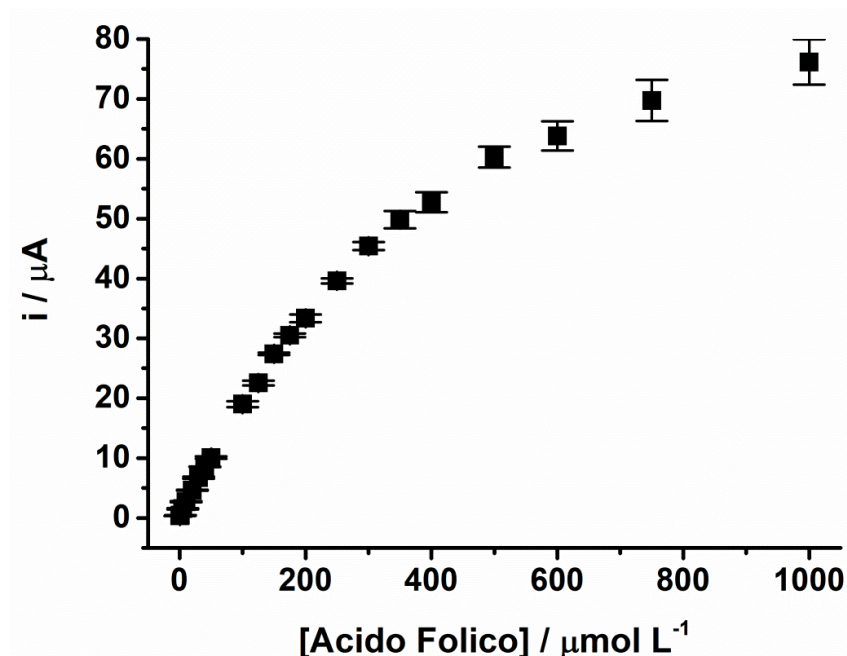
Onde:

DPx = Desvio padrão absoluto das medidas realizadas;

$\bar{x}$ = Média aritmética das medidas realizadas.

Para determinar a faixa linear correspondente ao analito, foi realizado um estudo de linearidade do ácido fólico, por meio da injeção de ácido fólico em diferentes concentrações, nas condições anteriormente otimizadas para o sistema BIA. A faixa testada variou de 0,5 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido fólico. A Figura 20 apresenta o comportamento da corrente em função da concentração injetada.

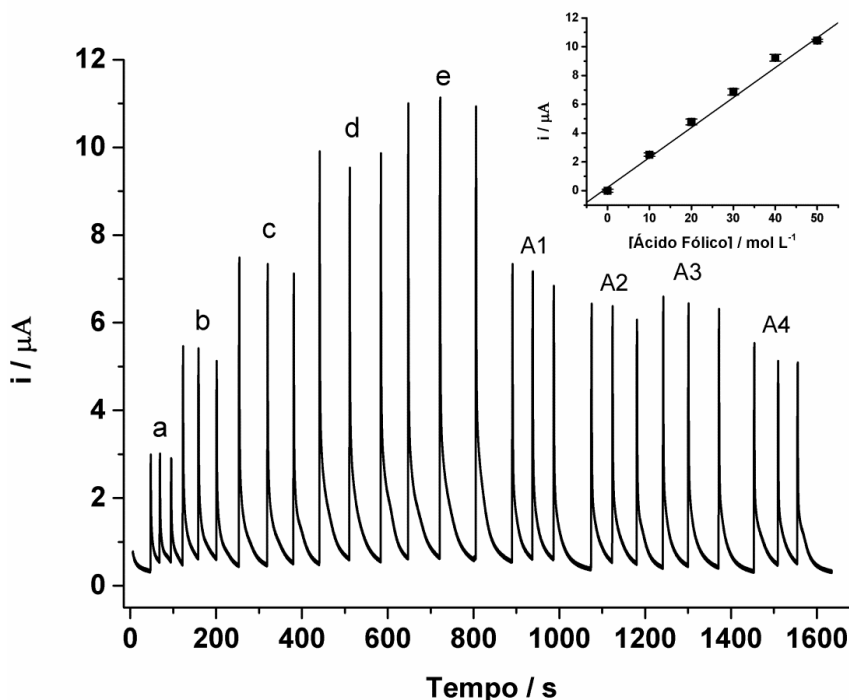
Figura 20 - Curva de faixa linear para ácido fólico em concentrações de 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 125, 150, 200, 300, 350, 400, 500, 600, 750 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em BR pH = 6. Eletrodo: FGP; E = +1,0 V. Condições: vazão = 193 $\mu\text{L s}^{-1}$; volume de injeção = 200 μL . Sob agitação magnética, velocidade 500 rpm.



A corrente não aumenta linearmente com a concentração de ácido fólico a partir de valores maiores que 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A faixa linear de 0,5 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apresenta um bom coeficiente de correção (R: 0.9979), seguindo a equação de reta $y = 2,28 \times 10^{-7} + 2,08 \times 10^{-7} \mu\text{A L}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} x$.

A Figura 21 apresenta a curva analítica de calibração, na qual são apresentadas as respostas amperométricas para injeções em triplicata de soluções compondo-se das seguintes concentrações de ácido fólico: 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a-e). As amostras dos fármacos (A1, A2, A3 e A4) foram injetadas após a curva analítica, sendo que estas foram preparadas em uma concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 21 - Amperograma para injeção no sistema BIA de ácido fólico nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a - e) e de amostras de fármacos (A1), (A2), (A3) e (A4). Eletrólito suporte: Tampão BR pH = 6. Eletrodo: FGP; E = +1,0 V. Condições: vazão = 193 $\mu\text{L s}^{-1}$; volume de injeção = 200 μL . Sob agitação magnética, velocidade = 500 rpm. Curva analítica (de calibração) inserida no canto superior direito da figura.



A partir da curva analítica pode-se obter algumas características do método proposto, dentre elas a faixa linear, coeficiente de correlação, sensibilidade, frequência analítica, e os limites de detecção e quantificação. Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram calculados a partir do método recomendado pela IUPAC, apresentados na equação 2 e 3 respectivamente:

$$LD = \frac{3 \times DPb}{a} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{10 \times DPb}{a} \quad (3)$$

Onde:

DPb = Desvio padrão do branco;

a = Coeficiente angular da curva de calibração ou sensibilidade analítica.

Os valores obtidos para LD e LQ foram $0,023 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,078 \mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente. Estes valores estão abaixo do que realmente se detecta, já que o primeiro ponto da curva analítica é em $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ que poderia ser considerado o LQ mais realístico do método, resultando num LD aproximado de $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$. A frequência analítica foi estimada em 61 injeções por hora. Na Tabela 1 são apresentadas algumas características analíticas do método apresentado.

Tabela 1 - Características analíticas do método proposto.

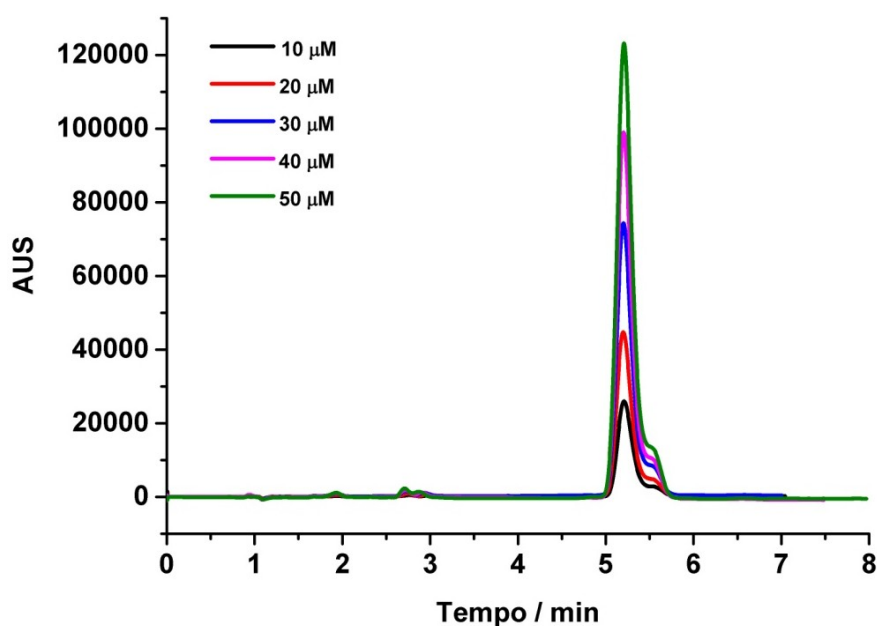
	BIA-AMP
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,5 – 100
Coef. Correlação	0,9979
Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,023
Limite de quantificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,078
Sensibilidade ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	0,208
Frequência analítica (h^{-1})	61
DPR (% para $n = 20$)	2,8

A partir da Tabela 1 observa-se que o método apresenta uma faixa linear extensa com um bom coeficiente de correlação, visto que ficou próximo de 1, para as injeções de 0,5 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido fólico. A frequência analítica encontrada no método proposto não foi alta como é esperado no sistema BIA devido à tendência de adsorção do analito na superfície do eletrodo, que foi eliminada utilizando sistema de agitação magnética. Os valores de LD e LQ no método proposto foram baixos e, portanto, permitem a análise de fármacos. A sensibilidade do método BIA-AMP para a determinação de ácido fólico foi adequada para análise dos fármacos, concluindo assim que o método proposto é sensível para a detecção de ácido fólico. O valor de desvio padrão relativo foi pequeno e dentro do aceitável, desta forma, obtém que o método proposto possui uma elevada precisão.

Como pode ser observado na Tabela 1, o método BIA é um método com potencial para ser aplicado na determinação de ácido fólico em fármacos. Para completar os parâmetros de

validação do método, as amostras foram analisadas também pelo método de HPLC. Na Figura 22 é apresentado o cromatograma obtido pelo método HPLC.

Figura 22 - Cromatograma obtido pelo método HPLC. Condições: fase móvel (25:75 de uma mistura de sal de sódio ácido 1-octanesulfônico (25%) com trietilamina (0,1%) em metanol (v/v)) e Coluna C₁₈.



Os valores obtidos para a comparação dos resultados das análises das amostras são demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação dos resultados obtidos pelo método eletroquímico com HPLC para as quatro amostras de fármacos (A1, A2, A3 e A4) contendo ácido fólico.

	Rótulo (mg)	BIA-AMP (mg)	HPLC (mg)
A1	2	2,03 ± 0,09	2,00 ± 0,02
A2	5	4,50 ± 0,20	4,90 ± 0,12
A3	5	4,67 ± 0,12	5,00 ± 0,06
A4	5	3,70 ± 0,22	3,65 ± 0,05

Os resultados obtidos para as amostras (A1, A2, A3 e A4) pelo método BIA-AMP encontram-se concordantes com os resultados encontrados pelo método oficial de HPLC, de

acordo com o teste t pareado, com 95% de confiança. O valor de $t_{\text{crítico}}$ é de 3,18 e o valor de $t_{\text{calculado}}$ foi de 0,78, desta forma, tem-se que $t_{\text{crítico}} > t_{\text{calculado}}$. Logo, a partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o método BIA-AMP é satisfatório para a determinação de ácido fólico em fármacos.

Na Tabela 3 são apresentados alguns trabalhos que utilizaram métodos eletroquímicos para a determinação do ácido fólico e algumas características obtidas por esses métodos. Para comparação, na última linha são apresentadas as mesmas características do método proposto nesse trabalho.

Tabela 3 - Métodos eletroquímicos de análise aplicados para determinação de ácido fólico reportados na literatura.

Eletrodo	Método de detecção	Faixa linear (μM)	LD (μM)	Ref.
ECLI- NOG	VC e VPD	0,01 – 50	0,027	(AKBAR; ANWAR; KANWAL, 2016)
ECN- Mn SnO ₂ (NPs)	VC, EIE e VOQ	1-500	0,038	(LAVANYA <i>et al.</i> , 2016)
NC-T	VC e AMP, VVL	0,0001-50	2,50E ⁻⁵	(DAI <i>et al.</i> , 2016)
EPCIN- ZnO	VC e VOQ	0,05-500	0,01	(TAHERKHANI <i>et al.</i> , 2013)
EGL-DNA	VPD	0,1-10	1,06E ⁻⁸	(MIRMOGHATAIE <i>et al.</i> , 2013)
EPC-ZnO	VOQ	3,0-700	1	(RAOOF <i>et al.</i> , 2015)
PGR-Calixareno	VPD	8,79E ⁻⁶ – 1,93E ⁻³	1,24E ⁻⁶	(VAZE; SRIVASTAVA, 2007)
ECV-B	VC, VPD, VOQ e VVL	0,01-0,15	9,53E ⁻³	(ANANTHI; KUMAR; PHANI, 2015)
ECV- α -Fe ₂ O ₃	VC, VPD e AMP	0,06-60	1,12E ⁻⁴	(MAIYALAGAN <i>et al.</i> , 2013)
ECV-NCPS	VPD	0,002-4	0,001	(XIAO <i>et al.</i> , 2008)
EFGP	VC e AMP	0,5-100	0,023	Este trabalho

VC - Voltametria Cíclica; **VPD** - Voltametria de Pulso Diferencial; **EIE** - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica; **VOQ** - Voltametria de Onda Quadrada; **VVL** - Voltametria de Varredura Linear; **VRA** – Voltametria de redissolução adsorptiva; **AMP** – Amperometria; **ECLI-NOG** - Eletrodo de carbono líquido iônico modificado nanopartículas de ouro e grafeno; **ECN- SnO₂ Mn (NPs)** - Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de SnO₂ dopadas com Mn (NPs); **NC-T** - Nanotubos de carbono modificado com partículas

de titânio; **EPCIN- ZnO** - Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas ZnO; **EGL-DNA** - Eletrodo de grafite de lápis modificado com DNA; **EPC-ZnO** - Eletrodo de pasta de carbono modificado quimicamente com ZnO; **PGR-Calixareno** - Pó de grafite revestido de Calixareno; **ECV-B** - Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanofios de Bismuto; **ECV α -Fe₂O₃** - Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanofibra de α -Fe₂O₃; **ECV-NCPS** - Eletrodo de carbono vítreo revestido com nanotubos de carbono de parede simples; **EFGP** - Eletrodo de folha de grafite pirolítico.

A partir da Tabela 3 observa-se que o método proposto apresenta características atrativas, uma vez que o limite de detecção obtido foi um dos menores apresentados na literatura, sendo inferior apenas para os trabalhos que utilizaram o eletrodo de carbono vítreo, grafite ou pasta de carbono modificados quimicamente. Vale ressaltar que o eletrodo apresentado neste trabalho não possui nenhuma modificação química. Outro parâmetro que indica a inovação do trabalho é a utilização do sistema eletroquímico BIA-AMP, o qual nos demais trabalhos foram empregados outros métodos eletroquímicos.

A partir da tabela de comparação dos métodos utilizados para a determinação do ácido fólico (Tabela 3) pode-se concluir que o método proposto neste trabalho tem potencial para a determinação de ácido fólico em fármacos e encontra resultados satisfatórios.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi apresentado o potencial uso do eletrodo de folha de grafite pirolítico juntamente com a técnica BIA para a determinação de ácido fólico em formulações farmacêuticas. De acordo com os estudos realizados pode-se concluir que o método proposto para a determinação do ácido fólico apresenta várias vantagens quando comparado aos métodos de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS), espectrofotometria e a quimioluminescência, pois estes métodos são demorados, possuem equipamentos caros e precisam de um pré-tratamento de amostra bastante elaborado.

A técnica utilizada apresenta o uso de equipamentos portáteis, simplicidade, baixo custo e pequenos volumes de amostra e solventes. Foi possível determinar o ácido fólico em amostras de fármacos através do sistema BIA, sendo que os resultados obtidos estão de acordo com os resultados obtidos pelo método de HPLC que foi utilizado como método para comparação. Algumas características do método que podem ser apresentadas são uma boa frequência analítica (61 h^{-1}), elevada precisão ($n = 20$, desvio padrão 2,83% ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$)), boa sensibilidade e um limite de detecção satisfatório. Logo, pode-se afirmar que o método proposto pode ser empregado como substituto ao método HPLC, já que os resultados encontrados para os métodos são equivalentes, a 95% de confiança.

Observou-se que o eletrodo de folha de grafite pirolítico empregado para as análises apresenta-se ser eficaz, no entanto, foi necessário empregar o sistema de agitação devido aos problemas adsorptivos do ácido fólico e/ou dos seus produtos de oxidação. O eletrodo à base de folhas de grafite utilizado possuem vantagens quando comparado a outros eletrodos, são descartáveis, robustos e têm boa adaptação em sistemas portáteis.

Desta forma, conclui-se que o método BIA juntamente com o eletrodo de folha de grafite pirolítico pode ser empregado para determinação de ácido fólico em formulações farmacêuticas. O método proposto possui diversas vantagens frente a outros métodos, como por exemplo, a praticidade, pois este método pode ser adaptado em diversas análises fora do ambiente do laboratório, visto a utilização de eletrodos descartáveis e potenciostatos portáteis.

6. REFERÊNCIAS

AKBAR, S.; ANWAR, A.; KANWAL, Q. Electrochemical determination of folic acid: A short review. **Anal Biochem**, v. 510, p. 98-105, Oct 1 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27449133> >.

ALMEIDA, E. S.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. On-site fuel electroanalysis: determination of lead, copper and mercury in fuel bioethanol by anodic stripping voltammetry using screen-printed gold electrodes. **Anal Chim Acta**, v. 837, p. 38-43, Jul 21 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25000856> >.

ALMEIDA, E. S. et al. Organic-resistant screen-printed graphitic electrodes: Application to on-site monitoring of liquid fuels. **Anal Chim Acta**, v. 934, p. 1-8, Aug 31 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27506338> >.

ALOTHMAN, Z. A. et al. Simultaneous electrochemical determination of dopamine and acetaminophen using multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 146, n. 1, p. 314-320, 2010.

ANANTHI, A.; KUMAR, S. S.; PHANI, K. L. Facile one-step direct electrodeposition of bismuth nanowires on glassy carbon electrode for selective determination of folic acid. **Electrochimica Acta**, v. 151, p. 584-590, 2015.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 51, 2002. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[2635-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[2635-1-0].PDF)>. Acesso em: 13 de Maio de 2019.

ARAÚJO, E. G. et al. Voltammetric Determination of Folic Acid Using a Graphite Paste Electrode. **Electroanalysis**, v. 27, n. 2, p. 398-405, 2015.

BACKES, R. S. et al. Determinação rápida e simples de citrato de sildenafila (Viagra® e genéricos) empregando eletrodo impresso de carbono em sistemas FIA e BIA com detecção amperométrica. **Química Nova**, 2017.

BERGAMINI, M. et al. Determinação de chumbo em álcool combustível por voltametria de redissolução anódica utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com resina de troca iônica Amberlite IR 120. **Eclética Química**, p. 45-52, 2006.

BRETT, A. M. C. F. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Almedina Coimbra, 1996.

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

ÇAKIR, S.; ATAYMAN, İ.; ÇAKIR, O. Simultaneous square-wave voltammetric determination of riboflavin and folic acid in pharmaceutical preparations. **Microchimica Acta**, v. 126, n. 3-4, p. 237-240, 1997.

CHANDRA SEKAR, N. et al. A paper-based amperometric glucose biosensor developed with Prussian Blue-modified screen-printed electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 204, p. 414-420, 2014.

COUTO, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; QUINAZ, M. B. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. **Talanta**, v. 146, p. 801-814, 2016.

DAI, H. et al. Delicate photoelectrochemical sensor for folic acid based on carbon nanohorns supported interwoven titanate nanotubes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 222, p. 120-126, 2016.

DE ALBUQUERQUE PEDROSA, V.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. **Quim. Nova**, v. 26, n. 6, p. 844-849, 2003.

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

DOU, Y. et al. Portable detection of clenbuterol using a smartphone-based electrochemical biosensor with electric field-driven acceleration. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 781, p. 339-344, 2016.

DURAN, G. M. et al. Synthesis of CuNP-Modified Carbon Electrodes Obtained by Pyrolysis of Paper. **Sens Actuators B Chem**, v. 227, p. 626-633, May 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26858513>>.

GALLI, A. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105, 2006.

GIULIANI, J. G. et al. Development and Characterization of Carbon Based Electrodes from Pyrolyzed Paper for Biosensing Applications. **J Electroanal Chem (Lausanne)**, v. 765, p. 8-15, Mar 15 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27175108> >.

HAGHIGHI, B. et al. Carbon Ceramic Electrodes Modified with Laccase from *Trametes hirsuta*: Fabrication, Characterization and Their Use for Phenolic Compounds Detection. **Electroanalysis**, v. 19, n. 9, p. 907-917, 2007.

HRISTEA, G.; GHEORGHE, S.; GHEORGHE, M. Electrochemical Electrode Based on Carbon Foil Used as Substrate for Conducting Polymer Deposition. **Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 340, n. 1, p. 405-412, 2006.

HU, J. et al. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. **Biosens Bioelectron**, v. 54, p. 585-97, Apr 15 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24333570> >.

HU, S. et al. Voltammetric determination of 4-nitrophenol at a sodium montmorillonite-anthraquinone chemically modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 54, n. 1, p. 115-123, 2001.

JANEGITZ, B. C.; MARCOLINO JUNIOR, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação voltamétrica por redissolução anódica de Cu(II) em águas residuárias empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com quitosana. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1673-1676, 2007.

KAVOSI, B. et al. Au nanoparticles/PAMAM dendrimer functionalized wired ethyleneamine-viologen as highly efficient interface for ultra-sensitive alpha-fetoprotein electrochemical immunosensor. **Biosens Bioelectron**, v. 59, p. 389-96, Sep 15 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24755256> >.

KOHN, J.; MOLLIN, D.; ROSENBACH, L. Conventional voltage electrophoresis for formiminoglutamic-acid determination in folic acid deficiency. **Journal of clinical pathology**, v. 14, n. 4, p. 345-350, 1961.

KRETZSCHMAR, K.; JAENICKE, W. Polarographic examination of the system folic acid--dihydrofolic acid--tetrahydrofolic acid. **Zeitschrift fur Naturforschung. Teil B, Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie und verwandte Gebiete**, v. 26, n. 3, p. 225, 1971.

KWEE, S. Electrochemistry of the C (9)-N (10) bond in folic acid and related compounds. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 156, p. 467-475, 1983.

LAPA, R. A. et al. Photochemical-fluorimetric determination of folic acid in a multicommutated flow system. **Analytica chimica acta**, v. 351, n. 1-3, p. 223-228, 1997.

LAVANYA, N. et al. Electrochemical sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid and folic acid based on Mn-SnO₂ nanoparticles modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 770, p. 23-32, 2016.

LE GALL, A.-C.; VAN DEN BERG, C. M. Determination of folic acid in sea water using adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Analytica chimica acta**, v. 282, n. 3, p. 459-470, 1993.

LIMA, J. L. et al. Electrochemical behaviour of Venlafaxine and its determination in pharmaceutical products using square wave voltammetry. **Il Farmaco**, v. 54, n. 3, p. 145-148, 1999.

MAIYALAGAN, T. et al. Nanostructured alpha-Fe₂O₃ platform for the electrochemical sensing of folic acid. **Analyst**, v. 138, n. 6, p. 1779-86, Mar 21 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23364807> >.

MIRMOGHATAIE, L. et al. Highly selective electrochemical biosensor for the determination of folic acid based on DNA modified-pencil graphite electrode using response surface methodology. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 3, p. 1753-8, Apr 1 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23827633> >.

MUSCELLI, W. C. **Preparação e Caracterização de Materiais de Carbono via Termopolimerização de Pré-Polímero Fenol-Formaldeído**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área: Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2012.

NAGARAJA, P.; VASANTHA, R. A.; YATHIRAJAN, H. S. Spectrophotometric determination of folic acid in pharmaceutical preparations by coupling reactions with iminodibenzyl or 3-aminophenol or sodium molybdate-pyrocatechol. **Analytical biochemistry**, v. 307, n. 2, p. 316-321, 2002.

NELSON, B. C.; SHARPLESS, K. E.; SANDER, L. C. Quantitative determination of folic acid in multivitamin/multielement tablets using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1135, n. 2, p. 203-11, Dec 1 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17018234> >.

NUCHTAVORN, N.; MACKA, M. A novel highly flexible, simple, rapid and low-cost fabrication tool for paper-based microfluidic devices (muPADs) using technical drawing pens

and in-house formulated aqueous inks. **Anal Chim Acta**, v. 919, p. 70-77, May 5 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27086101> >.

OLIVEIRA, A. G.; MUNOZ, R. A. A.; ANGNES, L. Disposable Graphite Foil Based Electrodes and Their Application in Pharmaceutical Analysis. **Electroanalysis**, v. 22, n. 12, p. 1290-1296, 2010.

OLIVEIRA, G. K. et al. Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. **Food Chem**, v. 192, p. 691-7, Feb 1 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26304399> >.

OSSEYI, E. S.; WEHLING, R. L.; ALBRECHT, J. A. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products1. **Journal of Chromatography A**, v. 826, n. 2, p. 235-240, 1998.

PACHECO, J. G. et al. Molecularly imprinted electrochemical sensor for ochratoxin A detection in food samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 215, p. 107-112, 2015.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, 2013.

PALLESCHI, G.; TURNER, A. P. Amperometric tetrathiafulvalene-mediated lactate electrode using lactate oxidase absorbed on carbon foil. **Analytica Chimica Acta**, v. 234, p. 459-463, 1990.

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

PING, J. et al. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using high-performance screen-printed graphene electrode. **Biosens Bioelectron**, v. 34, n. 1, p. 70-6, Apr 15 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22341755> >.

PUMERA, M. et al. Graphene for electrochemical sensing and biosensing. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 954-965, 2010.

QUINTINO, M. S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a Batch Injection Analysis (BIA) para aplicações analíticas**. Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes. 2003. 105 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

QUINTINO, M. S. et al. Amperometric quantification of sodium metabisulfite in pharmaceutical formulations utilizing tetra-ruthenated porphyrin film modified electrodes and batch injection analysis. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1281-6, Feb 15 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18970461> >.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513-523, 2004.

RAOOF, J. B. et al. A high sensitive electrochemical nanosensor for simultaneous determination of glutathione, NADH and folic acid. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 47, p. 77-84, Feb 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25492175> >.

RUGGERI, S. et al. Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 855, n. 1, p. 237-245, 1999.

SANTOS, R. B. **Determinação rápida de citrato de sildenafila empregando eletrodo impresso acoplado a sistemas BIA e FIA**. Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva. 2016. 60 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Mato Grosso do Sul, 2016. Disponível em: <http://files.ufgd.edu.br/arquivos/arquivos/78/MESTRADO-QUIMICA/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Rafael%20Backes.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2019.

SHAHROKHIAN, S.; GHALKHANI, M.; AMINI, M. K. Application of carbon-paste electrode modified with iron phthalocyanine for voltammetric determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid and uric acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 137, n. 2, p. 669-675, 2009.

SHAMS, E. Determination of Trace Amounts of Copper by Adsorptive Stripping Voltammetry. **Analytical Letters**, v. 33, n. 3, p. 465-478, 2000.

SILVA, L. A. J. **Desenvolvimento de métodos eletroquímicos de análise empregando papel pirolisado como eletrodo de trabalho**. 2017. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SILVA, L. A. J. et al. Evaluation of graphite sheets for production of high-quality disposable sensors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 833, p. 560-567, 2019.

SILVEIRA, C. M. M. et al. Methods for analysis of thiamin and folic acid by HPLC—DAD in fortified rice pure and mixed to milled rice before and after different cooking techniques. **Acta Chromatographica**, v. 28, n. 4, p. 455-472, 2016.

SKOOG, D. et al. Fundamentos de Química Analítica, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006. **Skoog, DA**, p. 627-663.

SONG, Z.; WANG, L. Chemiluminescence inhibition assay for folic acid using flow injection analysis. **Phytochem Anal**, v. 14, n. 4, p. 216-20, Jul-Aug 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892416> >.

SOUZA, D. D.; MACHADO, S. A. Estudo eletroanalítico do herbicida paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultramicroeletrodos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 644-647, 2003.

STEFANO, J. S. et al. Fast determination of naproxen in pharmaceutical formulations by batch injection analysis with pulsed amperometric detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1834-1838, 2012.

STEFANO, J. S. **Utilização de análise por injeção em fluxo e em batelada com detecção amperométrica e eletrodos impressos para a determinação de ciprofloxacina**. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

SVORC, L. et al. Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode. **Food Chem**, v. 135, n. 3, p. 1198-204, Dec 1 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22953843> >.

TAHERKHANI, A. et al. ZnO nanoparticle-modified ionic liquid-carbon paste electrode for voltammetric determination of folic acid in food and pharmaceutical samples. **Ionics**, v. 20, n. 3, p. 421-429, 2013.

TORMIN, T. F. et al. Batch-injection stripping voltammetry of zinc at a gold electrode: application for fuel bioethanol analysis. **Electrochimica Acta**, v. 164, p. 90-96, 2015.

ULUSOY, H. İ. et al. Development of a New Methodology for Determination of Vitamin B9 at Trace Levels by Ultrasonic-Assisted Cloud Point Extraction Prior to HPLC. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 3, p. 799-808, 2016.

VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T. H. **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes - Ácido Fólico**. São Paulo: [s. n.], 2010. 24 p. v. 10. ISBN 978-85-86126-23-9. Disponível em: <http://ilsa.org/brasil/wp-content/uploads/sites/9/2016/05/10-A%CC%81cido-Fo%CC%81lico.pdf>> Acesso em: 14/05/2019.

VAZE, V. D.; SRIVASTAVA, A. K. Electrochemical behavior of folic acid at calixarene based chemically modified electrodes and its determination by adsorptive stripping voltammetry. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 4, p. 1713-1721, 2007.

VITAMINAS. Dossiê Vitaminas. **Revista FIB – Food Ingredients Brasil**. Editora Insumos Ltda. São Paulo, Brasil. V. 26, n° 29, 2014. Disponível em: <<http://revista-fi.com.br/revista/61/#p=1>>. Acesso em: 13/05/2019.

VORA, A. et al. Thermal stability of folic acid. **Thermochimica Acta**, v. 392, p. 209-220, 2002.

WANG, C. et al. Application of a Single-Wall Carbon Nano-Tube Film Electrode to the Determination of Trace Amounts of Folic Acid. **Microchimica Acta**, v. 152, n. 3-4, p. 233-238, 2005.

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

WANG, J. Portable electrochemical systems. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 226-232, 2002.

WANG, J. et al. Computerized pipettes with programmable dispensation. **Analytica chimica acta**, v. 267, n. 1, p. 171-177, 1992.

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

WANG, Z. et al. Carbon nanotube-modified electrodes for the simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid. **The Analyst**, v. 127, n. 5, p. 653-658, 2002.

WEI, S. et al. Voltammetric Determination of Folic Acid with a Multi-Walled Carbon Nanotube-Modified Gold Electrode. **Microchimica Acta**, v. 152, n. 3-4, p. 285-290, 2005.

XIAO, F. et al. Single-walled carbon nanotube-ionic liquid paste electrode for the sensitive voltammetric determination of folic acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 134, n. 2, p. 895-901, 2008.

ZEN, J.-M. Selective voltammetric method for uric acid detection using pre-anodized Nafion-coated glassy carbon electrodes. **Analyst**, v. 123, n. 6, p. 1345-1350, 1998.

ZHANG, M. et al. Free-standing and flexible graphene papers as disposable non-enzymatic electrochemical sensors. **Bioelectrochemistry**, v. 109, p. 87-94, Jun 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26916736> >.

ZHAO, S. et al. Determination of folic acid by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. **J Chromatogr A**, v. 1107, n. 1-2, p. 290-3, Feb 24 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413558> >.