



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

GABRIELA LUCINDO NUNES

**DETERMINAÇÃO DE NAPROXENO EM FARMACOS UTILIZANDO O SISTEMA
DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) EM ELETRODO DE
CARBONO VITREO LIMPO E MODIFICADO COM ALUMINA**

UBERLÂNDIA

2019

GABRIELA LUCINDO NUNES

**DETERMINAÇÃO DE NAPROXENO EM FARMACOS UTILIZANDO O SISTEMA
DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) EM ELETRODO DE
CARBONO VITREO LIMPO E MODIFICADO COM ALUMINA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do curso de
Química Industrial do Instituto de Química
da Universidade Federal de Uberlândia
como requisito parcial para a obtenção do
título de bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro
Abarza Muñoz

Co-orientadora: Doutoranda Ana Paula
de Lima

UBERLÂNDIA

2019

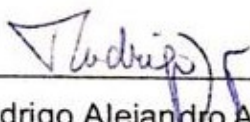
GABRIELA LUCINDO NUNES

DETERMINAÇÃO DE NAPROXENO EM FARMACOS UTILIZANDO O SISTEMA
DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) EM ELETRODO DE
CARBONO VITREO MODIFICADO COM ALUMINA

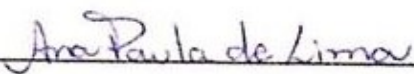
Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do curso de
Química Industrial do Instituto de Química
da Universidade Federal de Uberlândia
como requisito parcial para a obtenção do
título de bacharel em Química Industrial.

Uberlândia, 4 de julho de 2019.

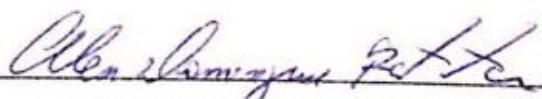
Banca examinadora:



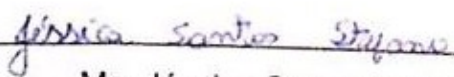
Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
(Orientador)



Me. Ana Paula de Lima
(Co-Orientadora)



Prof. Dr. Alex Domingues Batista
(Examinador)



Me. Jéssica Santos Stefano
(Examinadora)

RESUMO

O controle de qualidade dos medicamentos é de suma importância para garantia da sua eficácia e diminuição da ocorrência de efeitos indesejados provocados pela presença de princípios ativos em maior ou menor quantidade, impurezas e/ou produtos de degradação. Para este fim, técnicas analíticas têm sido recomendadas nas farmacopeias, envolvendo métodos clássicos e instrumentais, principalmente para a quantificação de princípios ativos em formulações farmacêuticas. Foram realizadas análises quantitativas com o objetivo de avaliar, comparativamente, o desempenho do eletrodo de carbono vítreo (GCE) limpo e modificado com alumina como sensor eletroquímico para detecção de naproxeno (NPX) em formulações farmacêuticas através do sistema de análise por injeção em batelada (BIA) e os resultados obtidos foram comparados com os métodos comumente utilizados, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e espectrofotometria UV-Vis. NPX é um importante anti-inflamatório não esteroide muito utilizado no alívio de dores em geral, o que justifica a importância de sua análise. O método proposto foi aplicado a três amostras de fármacos popularmente consumidos. Os estudos preliminares mostraram que não é possível a determinação de NPX em GCE limpo devido à grande adsorção em sua superfície por isso, este trabalho apresenta modificação do GCE com alumina para a determinação de NPX além da aplicação de um potencial de limpeza e sistema de agitação para obter respostas reprodutíveis e estáveis (DPR = 5,2% para $n = 10$), com baixo limite de detecção e quantificação ($LD = 0,32 \mu\text{mol L}^{-1}$ | $LQ = 1,08 \mu\text{mol L}^{-1}$), elevada frequência analítica de 120 injeções/hora.

Palavras-chave: Naproxeno, Eletrodo de Carbono Vítreo, Alumina, Análise por injeção em Batelada.

ABSTRACT

Quality control of medicines is paramount importance to ensure their effectiveness and reduce the occurrence of undesirable effects caused by the presence of more or less active ingredients, impurities and/or degradation products. For this, analytical techniques have been recommended in pharmacopoeias, involving classical and instrumental methods, mainly for the quantification of active ingredients in pharmaceutical formulations. Quantitative analyzes were performed to comparatively evaluate the performance of the clean and modified alumina glass carbon electrode (GCE) as an electrochemical sensor for detection of naproxen (NPX) in pharmaceutical formulations using the batch injection analysis system (BIA) and the results obtained were compared with commonly used methods, high performance liquid chromatography (HPLC) and UV-Vis spectrophotometry. NPX is an important non-steroidal anti-inflammatory drug widely used in general pain relief, which justifies the importance of its analysis. The proposed method was applied to three samples of popularly consumed drugs. Preliminary studies showed that it is not possible to determine NPX in bare GCE due to the large adsorption on its surface. Therefore, this work presents modification of GCE with alumina for the determination of NPX besides the application of a cleaning potential and agitation system. to obtain reproducible and stable responses (RPD = 5.2% for $n = 10$), with low limit of detection and quantification ($LD = 0.32 \mu\text{mol L}^{-1}$ | $LQ = 1.08 \mu\text{mol L}^{-1}$), high analytical frequency of 120 injections/hour.

Key words: Naproxen, Glassy Carbon Electrode, Alumina, Batch Injection Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do NPX.

Figura 2. Sistema BIA com detecção eletroquímica. a) corpo da célula; b) tampa superior; c) tampa inferior; d) eletrodo de trabalho (ET); e) eletrodo de referência (ER); f) ponteira da micropipeta para injeção; g) eletrodo auxiliar (EA); h) solução de eletrólito suporte.

Figura 3. Representação esquemática da escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de trabalho.

Figura 4. Representação esquemática do princípio de ação do modificador na superfície de um eletrodo para eletrocatalise.

Figura 5. Esquema representativo do espectrofotômetro UV-Vis.

Figura 6. Esquema representativo de aparelhagem HPLC.

Figura 7. Esquema representativo de uma célula de BIA “wall jet” semelhante à utilizada neste trabalho.

Figura 8. Voltamogramas cíclicos obtidos para GCE limpo e modificado com alumina na presença de 1 mmol L^{-1} de NPX e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,5) com velocidade de varredura igual a $277 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$.

Figura 9. Voltamograma hidrodinâmico obtido através da média da triplicata dos valores de corrente de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX, sistema com agitação. Eletrólito: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato (pH = 7,5), volume de injeção $100 \text{ } \mu\text{L}$, velocidade de injeção $277 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$.

Figura 10. Estudo da repetibilidade no sistema BIA para GCE limpo com injeções da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,5) com adição de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Volume de injeção: $100 \text{ } \mu\text{L}$, velocidade de injeção: $213 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$. Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ com agitação.

Figura 11. Estudo da repetibilidade no sistema BIA para GCE limpo com injeções da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,5) com adição de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Volume de injeção: $100 \text{ } \mu\text{L}$, velocidade de injeção: $213 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$. (A) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ e potencial de limpeza de $1,0 \text{ V}$ sem agitação. (B) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ e potencial de limpeza de $1,0 \text{ V}$ com agitação.

Figura 12. Estudo da repetibilidade no sistema BIA para GCE modificado com alumina com injeções da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,5) com adição de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Volume de injeção: $100 \text{ } \mu\text{L}$, velocidade de injeção: $213 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$. (A) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ sem agitação. (B) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ com agitação.

Figura 13. Estudo da repetibilidade no sistema BIA para GCE modificado com Alumina com injeções da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,5) com adição de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Volume de injeção: $100 \text{ } \mu\text{L}$, velocidade de injeção: $213 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$. (A) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ e potencial de limpeza de $1,0 \text{ V}$ sem agitação. (B) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ e potencial de limpeza de $1,0 \text{ V}$ com agitação.

Figura 14. Estudo da velocidade de injeção utilizando GCE modificado com Alumina empregado oito velocidades distintas de 17, 33, 49, 78, 164, 213, 277 e $370 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$ injetadas em triplicata da solução padrão de NPX em $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,5), sistema com agitação. Potencial de trabalho: $1,4 \text{ V}$, potencial de limpeza, $1,0 \text{ V}$, volume de injeção: $100 \text{ } \mu\text{L}$.

Figura 15. Estudo do volume injetado no sistema BIA utilizando GCE Alumina. Cada volume de 10, 20, 30, 50, 75, 100 e 200 μL foram injetados em triplicata, sistema com agitação. Potencial de trabalho: 1,4 V, potencial de limpeza: 1,0 V, velocidade de injeção: 213 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Figura 16. (A) Amperograma do estudo da faixa linear obtida no sistema BIA, utilizando GCE alumina, para injeções em triplicata de soluções padrão de NPX 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH = 7,5). Análise realizada em potencial constante de 1,4 V, potencial de limpeza de 1,0 V, volume de 100 μL e velocidade de injeção 213 $\mu\text{L s}^{-1}$. (B) Curva de calibração correspondente ao amperograma.

Figura 17. (A) Respostas amperométricas obtidas em sistema BIA, utilizando GCE alumina, para injeções crescentes e decrescentes (em triplicata) de soluções padrão de NPX 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 25, 50, e 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH = 7,5). Potencial constante de 1,4 V, potencial de limpeza de 1,0 V, volume de 100 μL e velocidade de injeção: 213 $\mu\text{L s}^{-1}$. (B) Curva analítica crescente e decrescente correspondente ao amperograma.

Figura 18. (A) Respostas amperométricas em sistema BIA do GCE alumina para injeções em triplicata de (1) 0,5, (2) 1,0, (3) 3,0, (4) 5,0, (5) 10,0, (6) 25,0, (7) 50,0 e (8) 75,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de padrões de NPX, três amostras comerciais (A_1 , A_2 e A_3) e as amostras dopadas (A_1D , A_2D e A_3D). (B) curva de calibração crescente mesmas condições da Figura 20-A.

Figura 19. Curva de calibração espectrofotométrica de absorção no UV-Vis das soluções padrão de NPX nas concentrações de 10, 15, 25, 30, 50, 60, 70, 75 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparadas em H_3PO_4 0,1 mol L^{-1} em pH=7,5.

Figura 20. Curva de calibração obtida após injeção em HPLC dos padrões de NPX nas concentrações de 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparadas na fase móvel de água deionizada acidificada com ácido acético concentrado em pH igual a 3 e metanol (85:15 v/v).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Listagem dos medicamentos utilizados nas análises.

Tabela 2. Desvio padrão relativo obtidos nos estudos de repetibilidade.

Tabela 3. Valores de concentrações de NPX obtidas pelo método proposto BIA em GCE modificado com alumina.

Tabela 4. Resultados obtidos das amostras após leitura espectrofotométrica de absorção no UV-Vis.

Tabela 5. Resultados obtidos das amostras após a análise HPLC.

Tabela 6. Massa de NPX obtida para cada amostra de medicamento por três diferentes métodos analíticos.

Tabela 7. Valores de t do cálculo do teste-t ($n = 3$).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs - anti-inflamatórios não esteroides

BIA - do inglês, "*Batch Injection Analysis*" – Análise por injeção em batelada

COX-1 - ciclooxigenase 1

COX-2 - ciclooxigenase 2

CV – do inglês, "*Cyclic Voltammetry*" – Voltametria cíclica

DPR - desvio padrão relativo

EA - eletrodo auxiliar

ER - eletrodo de referência

ET - eletrodo de trabalho

GCE - do inglês, "*Glassy Carbon Electrode*" – Eletrodo de carbono vítreo

HPLC - do inglês, "*High Performance Liquid Chromatography*" – Cromatografia líquida de alta eficiência

IUPAC - do inglês, "*International Union of Pure and Applied Chemistry*" – União Internacional da Química Pura e Aplicada

LD - limite de detecção

LQ - limite de quantificação

MPA - do inglês, "*Multiple Pulse Amperometry*" – Amperometria de múltiplos pulsos

NPX - Naproxeno

UV-Vis - espectrofotometria de absorção na região ultravioleta visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Análise por injeção em batelada	14
1.1.1. Voltametria cíclica	16
1.1.2. BIA com detecção amperométrica	16
1.2. Eletrodos quimicamente modificados	18
1.2.1. Eletrodo modificado com alumina	20
1.3. Espectrofotometria de absorção no UV-Vis	20
1.4. Cromatografia líquida de alta eficiência	21
2. OBJETIVOS GERAIS	23
2.1. Objetivos específicos	23
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
3.1. Reagentes e soluções	23
3.1.1. Análise por injeção em batelada	24
3.1.2. Análise por espectrofotometria UV-Vis	24
3.1.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	25
3.2. Instrumentação	25
3.2.1. Análise por injeção em batelada	25
3.2.1.1. Modificação do eletrodo com alumina	26
3.2.2. Análise por espectrofotometria UV-Vis	27
3.2.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1. Análise por injeção em batelada	27
4.2. Espectrofotometria UV-Vis	42
4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência	43
4.4. Comparação dos métodos	45

5. CONCLUSÃO

46

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

47

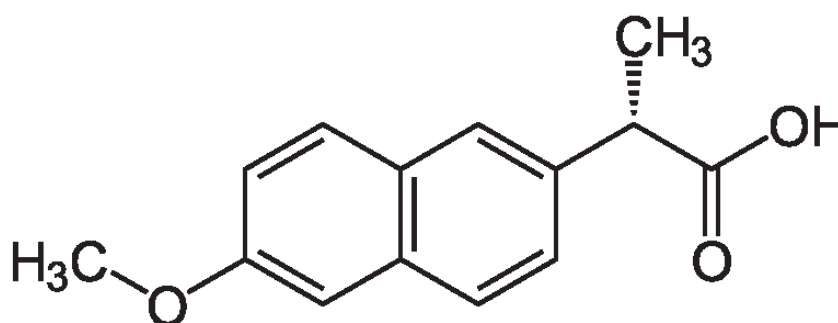
1. INTRODUÇÃO

Naproxeno (NPX), de nomenclatura IUPAC ácido 2-(6-metoxinaftalen-2-il) propanoico, com fórmula molecular $C_{14}H_{14}O_3$ e massa molar igual a $230,26 \text{ g mol}^{-1}$ [1] é um importante anti-inflamatório não esteroide que apresenta ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória. É o único anti-inflamatório não esteroide (AINEs) comercializado sob a forma enantiomericamente pura, (S)-naproxeno [2].

AINEs, tal como o NPX, constituem uma das classes de fármacos mais prescritos em todo o mundo. Essa vasta classe de fármacos atua como inibidores de prostaglandinas endoperóxido sintase, também conhecida como ciclo-oxigenases 1 (COX-1) e/ou ciclo-oxigenases 2 (COX-2). Os AINEs podem ser seletivos quando inibem apenas a COX-2 ou não seletivos quando inibem as COX-1 e COX-2. Os AINEs tradicionais, como o NPX, por ser um AINE não seletivo, inibem as COX-1 e COX-2, porém são inibidores mais ativos da COX-1 [2].

A segurança do uso dos anti-inflamatórios não esteroides tem sido questionada nos últimos anos, devido a inúmeros efeitos adversos e estudos clínicos. Dentre os efeitos adversos mais decorrentes estão os problemas gastrointestinais, renais e cardiovasculares. Diante disso, o controle de qualidade dos medicamentos é de suma importância para garantia da sua eficácia e diminuição da ocorrência de efeitos indesejados provocados pela presença de princípios ativos em maior ou menor quantidade, impurezas e/ou produtos de degradação. Para este fim, técnicas analíticas têm sido recomendadas nas farmacopeias, envolvendo métodos clássicos e instrumentais, principalmente para a quantificação de princípios ativos em formulações farmacêuticas [2].

Figura 1 – Formula estrutural do NPX.



O NPX possui em sua estrutura o ácido propiônico, derivado do ácido carboxílico que interage com o sítio catalítico das cicloxigenases, formando ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos localizados no canal do sítio catalítico [2].

O ácido propiônico faz com que o fármaco NPX seja suscetível a reações de oxidação, nesse caso, os métodos eletroanalíticos são uma opção favorável em relação a métodos reportados na literatura para controle de qualidade fármacos por ser um método mais simples, de análises rápidas, equipamentos portáteis além de fornecerem respostas de alta sensibilidade que podem ser comparáveis ou melhores do que métodos de HPLC e espectrofotometria UV-Vis, as quais serão estudadas neste trabalho. Esses métodos de análises são de alto de custo em todos os âmbitos, tanto de aquisição e instrumentação quanto de manutenção e operação, além de demandar tempo significativo de análise.

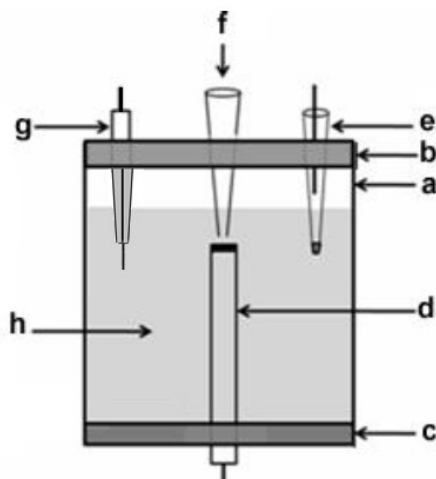
Diante desse contexto, estudos têm sido feitos buscando técnicas de análises de baixo custo, maior frequência analítica, menor tempo de análise e baixa geração de resíduos. O triunfo desses estudos pode permitir que laboratórios e empresas de menor poder aquisitivo implantem metodologias eletroanalíticas de controle de qualidade, pois os custos da técnica são inferiores.

O método eletroanalítico proposto é a análise por injeção em batelada com detecção amperométrica. Esse método envolve diversas características vantajosas como portabilidade, devido sua infraestrutura ser simples e de poucos equipamentos, baixo custo, alta sensibilidade, alta seletividade, alta frequência analítica e consumo mínimo de reagentes e amostras gerando menor volume de resíduos.

1.1. Análise por injeção em batelada

A análise por injeção em batelada (BIA, do inglês "*Batch Injection Analysis*") é um procedimento de análise introduzido na década de 90 como uma alternativa para a realização de análises simples e rápidas. Essa técnica envolve a injeção de uma alíquota de amostra ou solução padrão com o auxílio de uma micropipeta, geralmente eletrônica, diretamente na superfície de um eletrodo de trabalho (ET) posicionado em uma configuração tipo "*wall-jet*" imerso em um grande volume de solução. Este sistema apresenta características como rapidez, uso de pequenos volumes de amostras e padrões, simplicidade, repetibilidade e sensibilidade [4]. A Figura 2 apresenta um diagrama esquemático de uma célula BIA semelhante à utilizada neste trabalho.

Figura 2 – Sistema BIA com detecção eletroquímica. a) corpo da célula; b) tampa superior; c) tampa inferior; d) eletrodo de trabalho (ET); e) eletrodo de referência (ER); f) ponteira da micropipeta para injeção; g) eletrodo auxiliar (EA); h) solução de eletrólito suporte.



Fonte: [4].

Numa célula BIA, o ET é posicionado na direção oposta à da injeção do analito. A injeção das soluções de análise pode ser utilizada uma micropipeta convencional ou eletrônica, sendo a micropipeta eletrônica de maior precisão pelo fato ser programada eletronicamente, desta forma, operadores com pouca ou sem experiência podem efetuar as injeções no sistema de forma reprodutível. A ponteira da micropipeta é posta em um orifício na tampa da célula posicionada na direção oposta ao ET, de modo que todas as injeções sejam feitas com a mesma distância entre a ponteira e a superfície do eletrodo de trabalho. Em outros dois orifícios localizados na tampa da célula, são fixados o eletrodo de referência (ER) e o eletrodo auxiliar (EA). Por fim, a solução do eletrólito suporte é inserida na célula em volume suficiente para que os três eletrodos fiquem submersos e tenham contato elétrico entre si ^[4].

O método BIA apresenta diversas vantagens em comparação com outras técnicas analíticas, tais como, elevada frequência analítica, baixo consumo de amostras e reagentes, reduzida contaminação do eletrodo de trabalho, elevada sensibilidade e repetibilidade adequada no procedimento de injeção com o uso de pipeta eletrônica, possuindo ainda uma instrumentação versátil e portátil, baixo custo dos componentes do sistema, podendo ser facilmente miniaturizadas, pois o perfil hidrodinâmico da injeção “wall jet” elimina a necessidade de uma enorme diluição, logo

células com menores volumes de trabalho podem ser utilizadas. Além disso, o fenômeno de passivação ou contaminação do eletrodo de trabalho é menor nos sistemas em batelada, devido ao relativo pequeno tempo de contato entre o analito e a superfície do eletrodo ^[4].

Técnicas eletroanalíticas são muito utilizadas em processos de oxidação e redução, adsorção em superfícies e mecanismos de transferência de elétrons, pois permite determinar a concentração de compostos de interesse diretamente na amostra com grande sensibilidade, baixos valores de limite de detecção e modos de aquisição de sinal que proporciona baixo sinal de ruído ^[5]. A voltametria cíclica e amperometria são exemplos de técnicas eletroanalíticas muito utilizadas.

1.1.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV - do inglês cyclic voltammetry) é uma técnica eletroanalítica não muito utilizada para análises quantitativas, no entanto, é muito utilizada no estudo de reações redox, na detecção de intermediários de reação e na observação e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos. Na CV a varredura de potencial é feita em uma direção e, em seguida, na outra, enquanto a corrente é medida ^[4]. O perfil de corrente elétrica em função da variação do potencial do registro da corrente elétrica, denomina-se voltamograma ^[5].

A voltametria cíclica é uma técnica que deve ser empregada no estudo de um sistema desconhecido, ou seja, estudo eletroquímico de um composto que vai ser analisado pela primeira vez e a partir do voltamograma obtido se obtém informações dos potenciais em que ocorreram os processos de transferência de elétrons ^[5] indicando que houve oxidação ou redução do analito estudado.

1.1.2. BIA com detecção amperométrica

O sistema BIA pode ser acoplado com diferentes detectores, entre estes, os detectores amperométricos são mais frequentemente empregados. A amperometria é uma técnica eletroanalítica em que se aplica um potencial constante, no qual ocorre oxidação ou redução eletroquímica de compostos eletroativos de interesse e mede-se a corrente correspondente ao longo do tempo, relacionando a corrente à concentração ^[5].

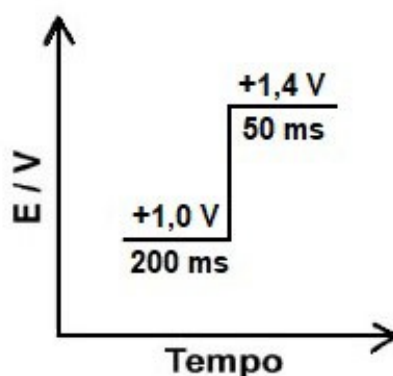
Uma das limitações desta técnica está relacionado com a contaminação da superfície do eletrodo durante as análises podendo produzir sinais eletroquímicos, devido às espécies adsorventes, interferindo no sinal desejado e ainda afetar a taxa de transferência de carga entre o eletrodo e o analito. Para contornar este problema, as técnicas amperométricas baseadas na amperometria de múltiplos pulsos (MPA) aparecem como boa alternativa ^[5].

A MPA permite a aquisição de corrente em múltiplos (a partir de 2) pulsos de potencial aplicados. Entre as aplicações da técnica destacam-se a determinação simultânea usando apenas um eletrodo de trabalho e a limpeza eletroquímica do eletrodo quando ocorrem processos adsorptivos no eletrodo de trabalho, alcançando uma boa estabilidade do sinal ao longo da análise, permitindo a obtenção de respostas estáveis e reprodutíveis.

Neste trabalho, a técnica de MPA será explorada visando à detecção do analito em um pulso de potencial e a aplicação de um segundo pulso de potencial para promover a limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho, isto é, o potencial de limpeza irá oxidar ou reduzir as espécies que estejam adsorvidas na superfície do eletrodo sejam o próprio analito ou produtos de oxidação do mesmo ^{[5][6]}.

A Figura 3 apresenta a representação da aplicação dos pulsos de potencial e o tempo em que cada um é aplicado.

Figura 3 – Representação esquemática da escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de trabalho.



Fonte: A autora

Os degraus de pulso de potencial, ainda que a técnica seja chamada de amperometria de múltiplos pulsos, não são aplicados ao mesmo tempo na superfície do

eletrodo. O eletrodo é perturbado mediante a aplicação de diferentes potenciais que são definidos por um período de tempo, sendo esses especificados no software utilizado (software GPES). No primeiro momento, é aplicado o pulso do potencial de determinação do analito de interesse por um tempo específico, como é mostrado na figura, no qual o potencial de interesse +1,4 V é aplicado por 50 ms. O programa aplica o potencial na superfície do eletrodo por esse período, no qual é feita a aquisição dos sinais de corrente, em sequência à aplicação do pulso, há um pequeno intervalo para a diminuição da corrente capacitiva, no qual é feito o registro de pontos dentro dos 50 ms que foram aplicados. Em seguida é aplicado o potencial de +1,0 V por 200 ms para promover a limpeza da superfície do eletrodo. Dessa forma o ciclo completo tem uma duração de 250 ms, ou seja, para que no eletrodo ocorra as reações de oxidação do analito de interesse (aplicando +1,4 V) e sua posterior limpeza (aplicando +1,0 V) tem-se um tempo total de 250 ms (1/4 de segundo). Para a aquisição dos dados de corrente nesse período, a cada 250 ms é registrado um ponto, sendo assim quatro pontos por segundo. Logo após a aplicação do potencial de limpeza, o software volta a aplicar o potencial de determinação do analito, por esse motivo a técnica é chamada de amperometria de múltiplos pulsos, no qual o potencial é aplicado em determinados valores, em intervalos de tempo específicos e o programa vai constantemente repetir a programação de pulsos de potencial que fora definida [6].

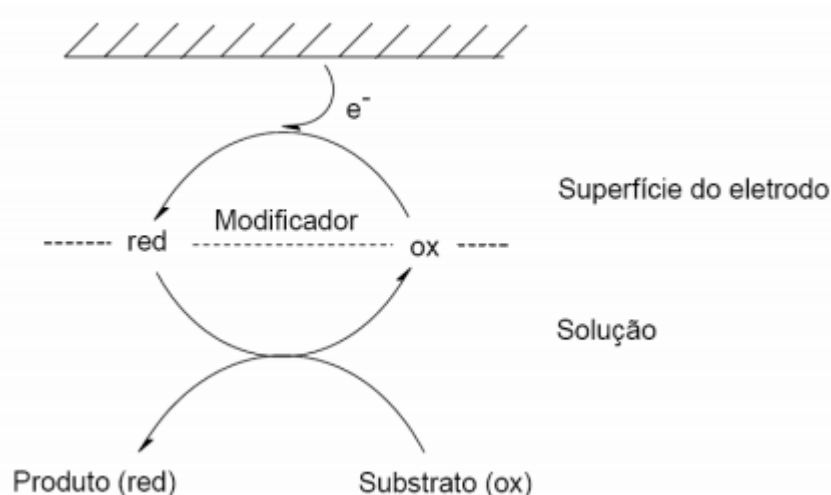
É importante ressaltar que os pulsos de potencial para a detecção do analito de interesse sejam em um tempo suficientemente necessário para que seja feita a aquisição dos dados (sinais de corrente). Esses pulsos não podem ser longos, porque quando as espécies chegam na superfície do eletrodo, esse potencial sendo aplicado por um tempo maior, uma quantidade grande do analito pode sofrer a reação na superfície do eletrodo, levando à contaminação do mesmo. Por esse motivo o potencial de determinação do analito de interesse é feito por um tempo menor e em seguida é realizado a aplicação do potencial de limpeza, que é feito por um tempo maior [6].

1.2. Eletrodos quimicamente modificados

No desenvolvimento de sensores, a sensibilidade, seletividade, estabilidade, precisão, resposta rápida, facilidade de uso, custo baixo e robustez constituem as características mais importantes [5].

A denominação eletrodo quimicamente modificado foi inicialmente utilizada na eletroquímica para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos. O principal objetivo dessa modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução, como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações, desde a utilização como agentes para transferências rápidas de elétrons, eletrocatalise ou íons em soluções para análises quantitativas, entre outros [5]. A Figura 4 mostra esquematicamente um eletrodo quimicamente modificado com função eletrocatalítica.

Figura 4 - Representação esquemática do princípio de ação do modificador na superfície de um eletrodo para eletrocatalise.



Fonte: [5].

A forma de preparação de um eletrodo quimicamente modificado é determinada pelas características analíticas desejadas do sensor. Os eletrodos quimicamente modificados possuem uma ampla aplicação em estudos eletroanalíticos devido à versatilidade de técnicas de modificações e modificadores químicos, e geralmente empregam as técnicas voltamétricas ou amperométricas para detecção [5].

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto muito importante da preparação de um eletrodo quimicamente modificado. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização

selecionado. Entre os materiais convencionais podemos citar ouro, platina e carbono vítreo.

1.2.1. Eletrodo quimicamente modificado com alumina

Nas últimas décadas, houve um considerável estímulo na área de sensores devido às recentes descobertas da nanotecnologia. A possibilidade de empregar materiais nanoestruturados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos conferindo melhoria no desempenho destes tem atraído atenção de diversas áreas de atuação como, por exemplo, em diagnósticos clínicos, indústria de alimentos, fármacos e ambiental ^[5].

A alumina é muitas vezes utilizada como material de polimento mecânico da superfície dos eletrodos por ser de baixo custo e, um estudo mostrou que uma possível contaminação no eletrodo com alumina devido à prática comum de limpeza pode alterar o comportamento eletroquímico de diferentes moléculas gerando efeitos catalíticos ^[7]. Dessa forma, o emprego de eletrodo modificado com partículas de alumina imobilizadas a sua superfície pode facilitar a transferência de elétrons de diferentes espécies, onde a alumina atua como um catalisador deste processo eletroquímico.

1.3. Espectrofotometria de absorção no UV-Vis

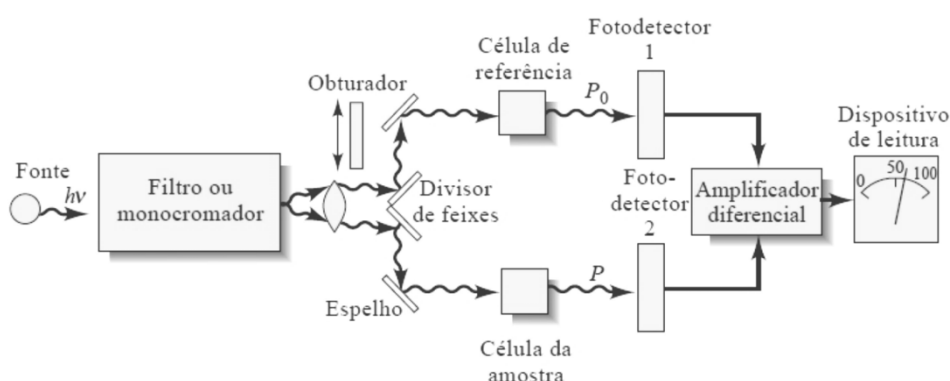
Os métodos espectrofotométricos são baseados na interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo amplamente empregados em química analítica para determinação qualitativa e quantitativa de compostos inorgânicos e orgânicos. Para este trabalho, destaca-se a espectrofotometria de absorção na região Ultravioleta-Visível (UV-Vis) em virtude do vasto campo de aplicação para determinação qualitativa e/ou quantitativa de compostos, já que boa parte dos compostos absorvem radiação na região do UV-Vis.

A espectroscopia de absorção molecular esta baseada na medida de transmitância (T) ou absorbância (A) de soluções contidas em células transparentes tendo um caminho ótico (b) em cm. Desta forma, a concentração (c) de um analito absorvente está relacionado linearmente à absorbância, essa relação representa a Lei de Beer ^[8], como segue na Equação 1 abaixo.

$$A = -\log T = \log \left(\frac{P_0}{P} \right) = \epsilon bc \quad \text{Equação 1}$$

Normalmente a transmitância e a absorbância são medidas quando a solução do analito está contida em um recipiente transparente, ou célula (material: quartzo ou vidro). Na incidência do feixe de luz ocorre reflexão nas duas interfaces ar/parede bem como nas duas interfaces parede/solução. A atenuação resultante do feixe de luz é substancial no qual se observa perda por reflexão ao passar através de uma célula de vidro contendo água ou branco. Além disso, pode ocorrer atenuação de um feixe de luz por espalhamento por moléculas grandes e por absorção pelas paredes do recipiente. Para compensar esses efeitos, a potência do feixe transmitido pela solução do analito P é comparada com a potência do feixe transmitido por uma célula idêntica P_0 contendo apenas o solvente [8]. O coeficiente de absorvidade é representado por ϵ na Equação 1.

Figura 5 – Esquema representativo do espectrofotômetro UV-Vis.



Fonte: [8].

A espectrofotometria UV-Vis é bastante reconhecida por suas vantagens relacionadas ao seu uso, sendo empregada principalmente no controle de qualidade de indústrias farmacêuticas que exigem rapidez, resultados confiáveis e fácil utilização.

1.4. Cromatografia líquida de alta eficiência

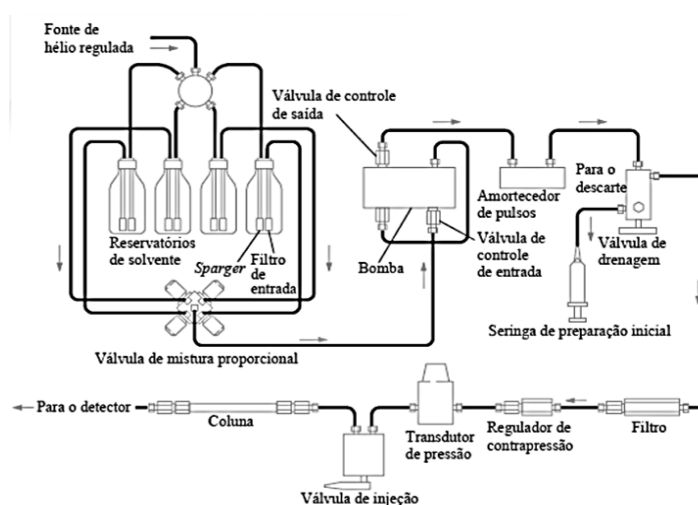
A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”) é uma das técnicas essenciais na obtenção de resultados

analíticos em um laboratório, sendo atualmente bastante utilizada na indústria farmacêutica uma vez que tem a capacidade de separar, identificar e quantificar compostos presentes numa mistura. O seu principal objetivo é então separar individualmente os diversos constituintes de uma mistura por meio de uma interação entre a amostra e de duas fases, uma estacionária e outra móvel, sendo estas imiscíveis reciprocamente.

Devido à utilização de colunas com grande capacidade de separação a realização do HPLC requer o emprego de equipamentos específicos, como o uso de bombas e colunas que suportem altas pressões necessárias para a eluição da fase móvel. Sendo assim, o HPLC necessita da utilização de um cromatógrafo composto de bomba, coluna cromatográfica, detector e registrador ^[9].

O sistema de bombas promove a circulação da fase móvel ao longo de todo o sistema cromatográfico. A fase móvel flui continuamente através do sistema arrastando a amostra injetada, pelo sistema de injeção, através da fase estacionária constituída pela coluna cromatográfica. A separação dos componentes da solução amostra ocorre mediante a interação dos mesmos simultaneamente com a fase móvel e a fase estacionária ^[10]. As substâncias presentes na amostra com maior afinidade com a coluna são aquelas que eluem por último e, por oposição, a substância que elui em primeiro lugar será a de menor afinidade com a fase estacionária.

Figura 6 – Esquema representativo de aparelhagem HPLC.



Fonte: [8].

2. OBJETIVOS GERAIS

O trabalho tem como objetivo geral explorar a oxidação eletroquímica do NPX visando sua determinação e quantificação, empregando o sistema de análise BIA acoplado à amperometria de múltiplos pulsos, fazendo o uso do eletrodo de carbono vítreo modificado com alumina e comparar os resultados obtidos com técnicas analíticas comumente utilizadas, espectrofotometria UV-Vis e HPLC.

2.1. Objetivos específicos

- Executar as otimizações da técnica BIA com o intuito de alcançar condições ótimas dos parâmetros BIA para realização das análises;
- Determinar a quantidade de NPX presente em três diferentes amostras de fármacos comerciais, sendo três destas na forma de comprimidos (sólidos);
- Realizar uma comparação entre as respostas obtidas pelo uso do eletrodo não-modificado e modificado com alumina;
- Comparar a metodologia proposta no sistema BIA com espectrofotometria de absorção no UV-Vis e HPLC.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e soluções

Para o preparo de todas as soluções aquosas foi utilizado água deionizada do sistema de purificação Milli-Q Plus da Millipore (resistividade $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) (Bedford, MA, EUA). Todas as soluções foram preparadas com reagentes de alta pureza e as soluções padrão de NPX foram preparadas com NPX padrão da Sigma Aldrich de pureza $\geq 98\%$.

As amostras de NPX presentes em medicamentos de uso popular, listadas na Tabela 1, foram adquiridas em farmácias locais estando todas dentro da validade.

Para cada amostra foram macerados 10 comprimidos a fim de se obter um lote de cada amostra, a partir do qual se preparou as soluções utilizadas neste trabalho. Esse procedimento é recomendado pela ANVISA para a determinação de analitos em fármacos que visa obter uma maior quantidade de massa de amostra mais homogênea em relação ao analito e os excipientes presentes nos fármacos, reduzindo os erros associados à pesagem de pequenas quantidades de amostra para o preparo das soluções pouco concentradas.

Tabela 1 – Listagem dos medicamentos utilizados nas análises.

Amostra	Forma física	Massa de NPX (mg/comprimido)
A ₁	Sólido	250
A ₂	Sólido	500
A ₃	Sólido	550

3.1.1. Análise por injeção em batelada

Para a análise no sistema BIA, foi utilizado como eletrólito tampão fosfato de pH igual a 7,5, preparado a partir do ácido fosfórico concentrado da Reagen de 85% (m/m) de pureza e pH corrigido com hidróxido de sódio PA da Dinâmica. O eletrólito foi utilizado no preparo das soluções padrão da curva e das amostras de NPX, além de ser utilizado no corpo da célula eletroquímica.

Preparou-se também uma solução padrão de NPX em 10 mmol L⁻¹, a qual foi utilizada para o preparo das soluções padrão da curva de calibração e nas dopagens das amostras. As amostras foram preparadas para a concentração de 25 µmol L⁻¹ considerando o valor rotulado.

3.1.2. Análise por espectrofotometria UV-vis

Para a análise espectrofotométrica na região do UV-vis, as soluções padrão de NPX para obtenção da curva de calibração foram preparadas em água deionizada nas concentrações de 10, 15, 25, 30, 50, 60, 70, 75 e 100 µmol L⁻¹, a partir de uma solução estoque de 10 mmol L⁻¹. As amostras de medicamentos foram preparadas também em água deionizada, todas a uma concentração de 50 µmol L⁻¹. As soluções padrão da

curva e as soluções das amostras foram preparadas antes de cada leitura de absorbância no equipamento.

3.1.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Para a análise via HPLC, utilizou-se como fase móvel uma solução diluída de ácido acético de pH igual a 3, a partir do ácido acético glacial da Synth com 99,7% (m/m) de pureza e metanol da Synth com 99,8% (m/m) de pureza numa proporção de 85:15 (v/v). As soluções padrão de NPX foram preparadas a partir do padrão nas concentrações de 20, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando a fase móvel e metanol na mesma proporção, como solvente. As amostras foram preparadas em 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ também na proporção de 85:15 (v/v) de fase móvel como solvente. As soluções padrão da curva e as soluções das amostras foram preparadas antes de cada injeção no equipamento.

3.2. Instrumentação

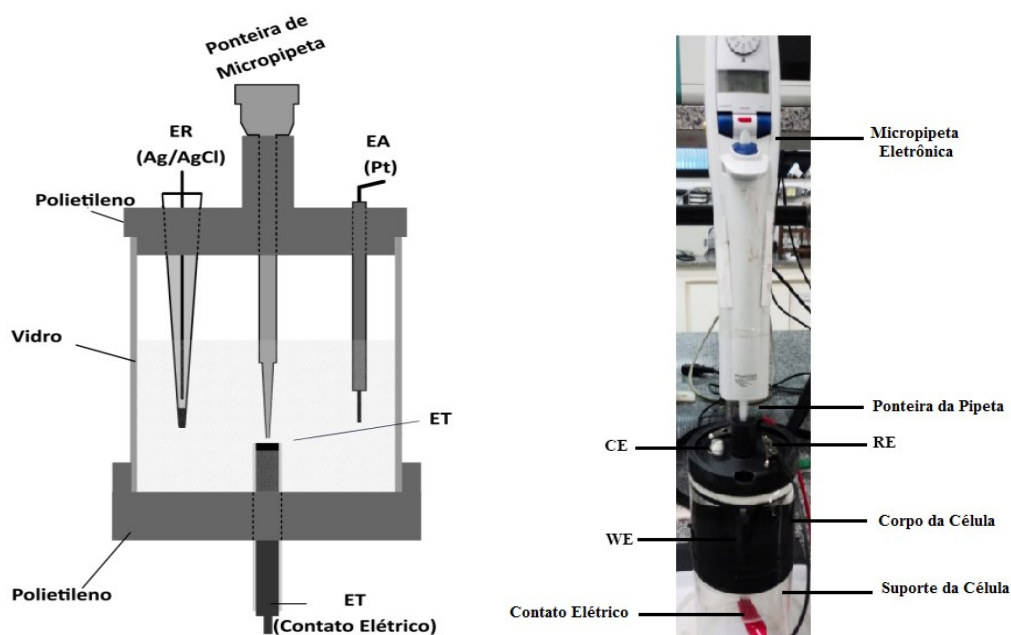
3.2.1. Análise por injeção em batelada

Para a realização das análises utilizou-se uma célula eletroquímica com três eletrodos distintos para as determinações. Um fio de platina, utilizado como eletrodo auxiliar ou contra eletrodo, um eletrodo miniaturizado de Ag/AgCl/KCl 3 mol L^{-1} como eletrodo de referência e um eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês "*Glassy Carbon Electrode*") de 1,5 mm de diâmetro (CH instrument, Austin, TX, USA) como eletrodo de trabalho.

A célula consiste em um tubo de vidro de 7,3 cm de diâmetro interno, 7,1 cm de altura e 200 mL de volume total, com quatro orifícios na parte superior feita de polietileno, os quais acomodam os eletrodos de referência e o auxiliar, oferece abertura para a ponta da micropipeta e para o agitador. Na parte inferior, também feita de polietileno, tem-se o eletrodo de trabalho, ligado a um contato elétrico. Os eletrodos e a ponta da micropipeta ficam submersos no eletrólito suporte utilizado na análise ^[5].

Parte do aparato utilizado neste trabalho para as determinações encontra-se esquematizado na Figura 7.

Figura 7 – Esquema representativo de uma célula de BIA “wall jet” semelhante à utilizada neste trabalho.



Fonte: [4].

As injeções das amostras na célula foram feitas com o auxílio de uma micropipeta eletrônica (Eppendorf® Multipipette stream) com a extremidade da pipeta mantida em distância fixa de 2 mm da superfície do eletrodo de trabalho e todas as medidas eletroquímicas do sistema foram todas realizadas utilizando um potenciostato μ -Autolab Tipo II (Eco Chemie, Utrecht, Holanda), controlado por software GPES 4.9.007 (General Purpose Electrochemical System).

3.2.1.1. Modificação do eletrodo com alumina

Para a limpeza do GCE, o mesmo foi submerso em uma solução 1:1 de etanol/água e deixado em um banho ultrassônico por 15 minutos. Após esse processo, o eletrodo foi polido através de movimentos circulares sob um tecido de feltro limpa e o mesmo foi lavado com água deionizada ^[7].

Após a limpeza, a modificação da superfície do eletrodo com partículas de alumina foi obtida após polimento do mesmo em um tecido de feltro contendo uma suspensão de alumina de 20 mg mL⁻¹ por 10 segundos em movimentos circulares, mantendo-se sempre o eletrodo voltado para o polidor. Após 30 segundos de espera

pós-polimento na alumina, o eletrodo foi lavado com água deionizada e colocado na parte inferior da célula eletroquímica para medidas eletroquímicas ^[7].

A alumina utilizada neste trabalho foi a alumina em pó 0,3 µm Micropolish II (α - Al_2O_3) obtida de Buehler (Lake Bluff, Illinois, EUA) ^[7].

3.2.2. Análise por espectrofotometria UV-vis

Para as análises por espectrofotometria no UV-vis, utilizou-se o espectrofotômetro UV-SPETROPHOTOMETER UV-1800 da Shimadzu com um comprimento de onda fixo de 240 nm. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente.

3.2.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Para os testes realizados em HPLC, utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD VP equipado com um detector UV-Vis (SPD-10A VP), uma coluna de HS C-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) CTO-20A da Prominence, um desgaseificador DGU-20A₅ da Prominence, um injetor manual de 20 µL de capacidade e uma bomba LC-10AD VP. A fase móvel foi constituída por metanol e uma solução diluída de ácido acético de pH igual a 3 (85:15 v/v) e uma vazão de 1 mL min⁻¹. O detector foi fixado em 240 nm. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente.

4.RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Análise por injeção em batelada

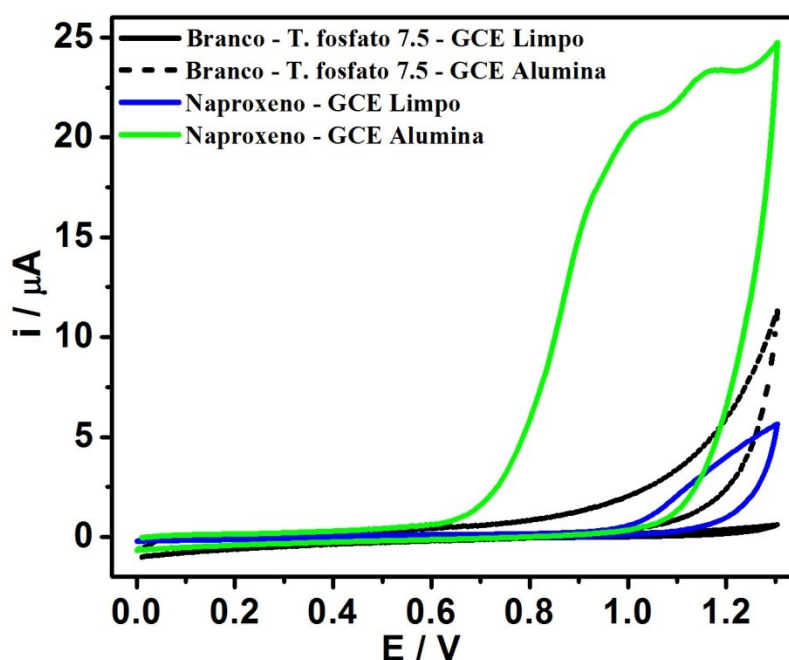
Antes de iniciar a determinação de NPX em medicamentos pelo método eletroanalítico BIA, é fundamental definir os parâmetros necessários para otimização do sistema para obtermos resultados reprodutíveis e com maior precisão. Para o estudo do potencial foi empregado os eletrodos limpo e modificado a fim de comparar as respostas obtidas e melhor definir os parâmetros do BIA e para o estudo do volume e velocidade, que são os outros parâmetros do sistema BIA, foram feitos somente para

o eletrodo modificado alumina, por causa dos efeitos de adsorção. Também foi acoplado ao sistema, um agitador mecânico para evitar espécies adsorventes e limpar a superfície do eletrodo.

No trabalho Montes, 2014, a determinação de NPX foi realizada utilizando-se o mesmo eletrodo de trabalho, o GCE, foram feitas as otimizações para o sistema BIA e empregado o tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,5$) como eletrólito. Baseado nesse trabalho foi o utilizado o mesmo eletrólito e também foi levado em consideração que o NPX é solúvel em soluções aquosas ligeiramente alcalinas, que é o caso deste tampão.

Foram realizados voltamogramas cíclicos, Figura 8, para uma solução padrão de NPX de 1 mmol L^{-1} , sendo o tampão fosfato o solvente, com o objetivo de avaliar o comportamento do analito em relação ao tampão fosfato como eletrólito suporte e o eletrodo limpo e modificado com alumina. O primeiro ciclo voltamétrico de NPX é apresentado para o eletrodo limpo e modificado.

Figura 8 – Voltamogramas cíclicos obtidos para GCE limpo e modificado com alumina na presença de 1 mmol L^{-1} de NPX e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,5$) com velocidade de varredura igual a $277 \mu\text{L s}^{-1}$.



Fonte: A autora.

Analisando a Figura 8, observa-se melhores respostas eletroquímicas para NPX, em termos de aumento de corrente, utilizando GCE modificado com alumina. O sinal de corrente obtido para o GCE limpo, foi consideravelmente pequeno quando comparado com o sinal obtido para GCE com alumina. O voltamograma para GCE modificado com alumina apresentou dois picos de oxidação do NPX entre os potenciais 0,9 e 1,2 V indicando que a modificação do eletrodo teve influência sobre a oxidação do analito, pois comparando o GCE limpo, podemos observar que a oxidação de NPX ocorre apenas um pico de oxidação próximo a 1,2 V.

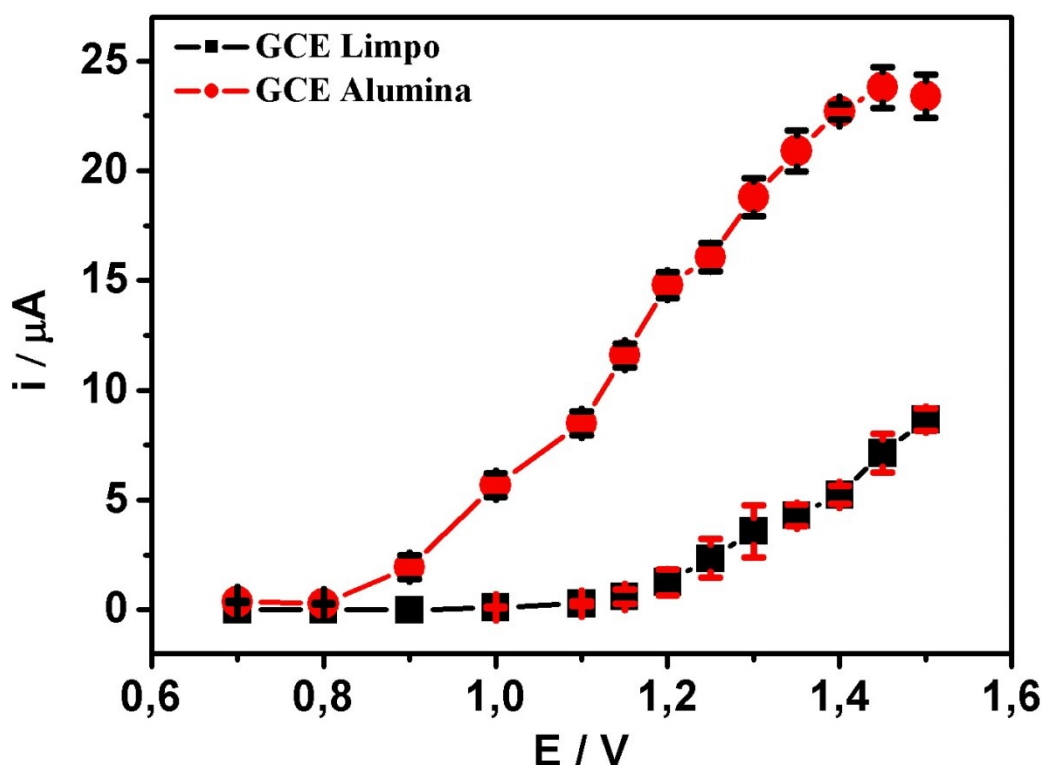
Analisando os voltamogramas observa-se que os sinais de corrente são bem inferiores para o eletrodo limpo em relação ao eletrodo modificado exibindo um comportamento de adsorção de NPX na superfície do eletrodo limpo, já que o analito é possui uma estrutura naftalênica com grande afinidade ao eletrodo de carbono ^[11].

A solução tampão fosfato (pH = 7,5) foi adotada para todas as análises que envolveram a determinação de NPX juntamente com GCE modificado com alumina, o qual apresentou bom desempenho em termos do alto valor de corrente, o que é muito importante já que correntes mais altas são mais favoráveis para as determinações resultando em uma maior sensibilidade para o analito ^[4]. Vale ressaltar também que a modificação no eletrodo favoreceu um efeito catalítico para determinação de NPX devido a presença da alumina pois ela facilita a oxidação do NPX.

Em sequência, foi realizado o estudo dos potenciais, em condições hidrodinâmicas, frente ao eletrodo limpo e modificado com alumina. Para isso, foi escolhida uma faixa de potenciais distintos e crescentes (0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,15, 1,2, 1,25, 1,3, 1,35, 1,4, 1,45 e 1,5 V) em que para cada potencial foram realizadas injeções em triplicata. Cada potencial estudado foi aplicado por 70 ms.

A coleta dos valores de corrente resultou em um voltamograma hidrodinâmico, Figura 9, para melhor visualização e facilidade na escolha do potencial adequado que será fixado nas próximas otimizações e na determinação amperométrica.

Figura 9 – Voltamograma hidrodinâmico obtido através da média da triplicata dos valores de corrente de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX, sistema com agitação. Eletrólito: 0,1 mol L^{-1} tampão fosfato (pH = 7,5), volume de injeção 100 μL , velocidade de injeção 277 $\mu\text{L s}^{-1}$.



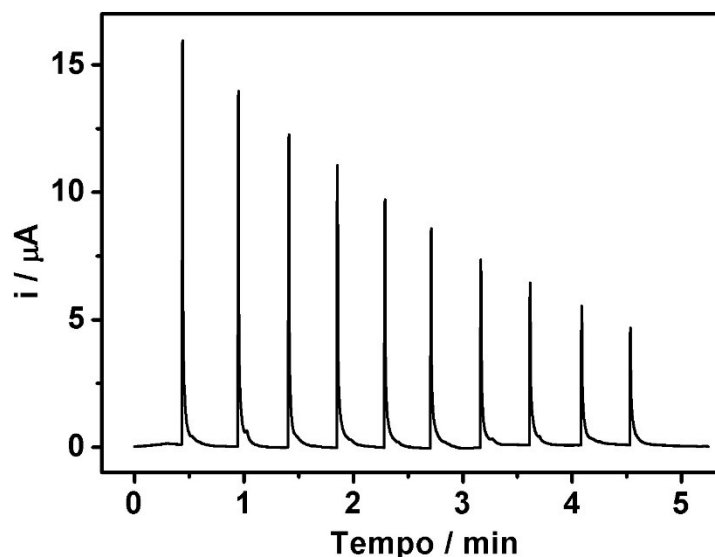
Fonte: A autora.

Para esta otimização constatou-se que para o GCE limpo os sinais de corrente para cada potencial foram baixos em relação ao GCE modificado com alumina, mesmo comportamento observado por voltametria cíclica. Observa-se que o melhor potencial é o de 1,4 V para os eletrodos limpo e modificado, visto que este potencial apresentou alto sinal de corrente e menor desvio em relação aos outros potenciais. Logo, o potencial adequado será aquele que se comportar de maneira semelhante para os eletrodos limpo e modificado, sendo assim o potencial de 1,4 V foi fixado para as demais análises.

Posteriormente, realizou-se os testes de repetibilidade para o sistema BIA. Esses testes foram realizados utilizando o eletrodo limpo e o modificado com alumina, com e sem agitação do sistema e aplicando e não aplicando o potencial de limpeza, tudo para fins comparativos.

As análises foram realizadas com uma serie de injeções de 100 μL e 213 $\mu\text{L s}^{-1}$ de velocidade, utilizando como eletrólito a solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH = 7,5) contendo uma solução padrão de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX, com potencial constante de trabalho de 1,4 V e potencial de limpeza de 1,0 V. A Figura 10 mostra o comportamento dos parâmetros otimizados para GCE limpo com agitação e potencial constante.

Figura 10 – Estudo da repetibilidade no sistema BIA para GCE limpo com injeções da solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH = 7,5) com adição de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Volume de injeção: 100 μL , velocidade de injeção: 213 $\mu\text{L s}^{-1}$. Potencial constante de trabalho 1,4 V com agitação.

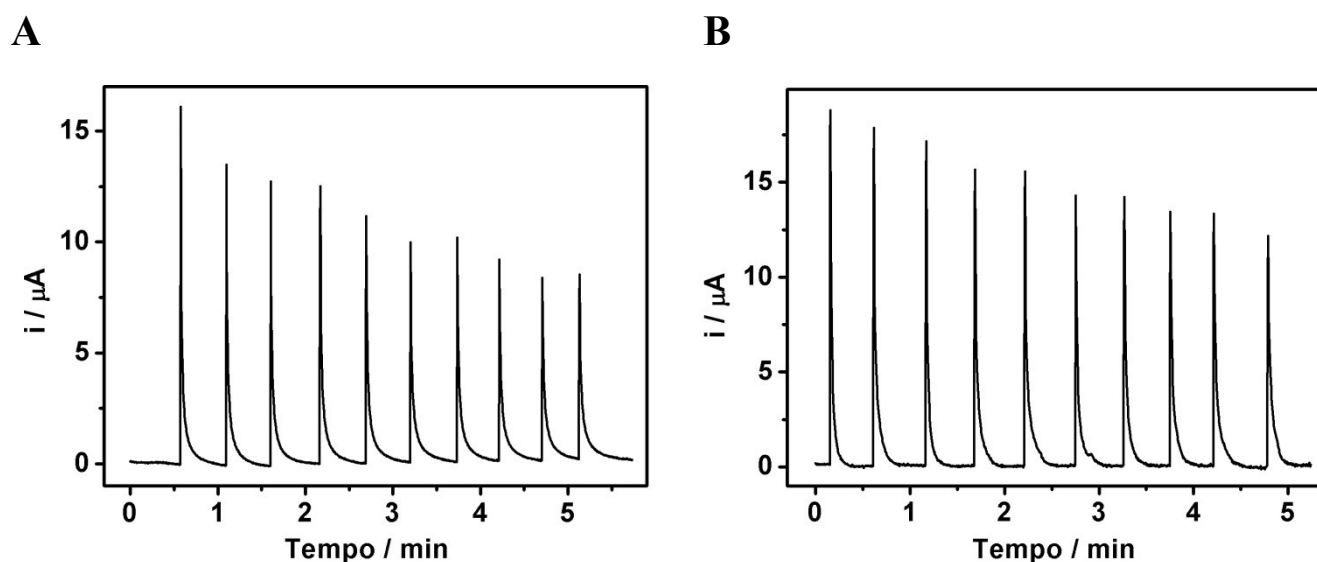


Fonte: A autora.

Como pode ser observado na Figura 10, o estudo da repetibilidade neste caso não resultou em respostas reprodutíveis. Ao longo das injeções o sinal de corrente foi caindo significativamente e de maneira constante indicando adsorção de NPX na superfície do eletrodo limpo e, mesmo com a agitação presente no sistema, a qual está sempre homogeneizando o eletrólito suporte na célula, não foi suficiente para corrigir essa problemática. Em 10 injeções de solução padrão de NPX obteve-se um desvio padrão relativo (DPR) de 39%, valor elevado que indica baixa precisão sendo o máximo DPR permitido de 5% ^[12].

Em seguida, foi realizado o teste de repetibilidade, Figura 11, para GCE limpo sem e com agitação, porém, aplicando dois potenciais, o potencial constante de trabalho e o potencial de limpeza.

Figura 11 – Estudo da repetibilidade no sistema BIA para GCE limpo com injeções da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,5$) com adição de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Volume de injeção: $100 \text{ } \mu\text{L}$, velocidade de injeção: $213 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$. (A) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ (50 ms) e potencial de limpeza de $1,0 \text{ V}$ (200 ms) sem agitação. (B) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ (50 ms) e potencial de limpeza de $1,0 \text{ V}$ (200 ms) com agitação.



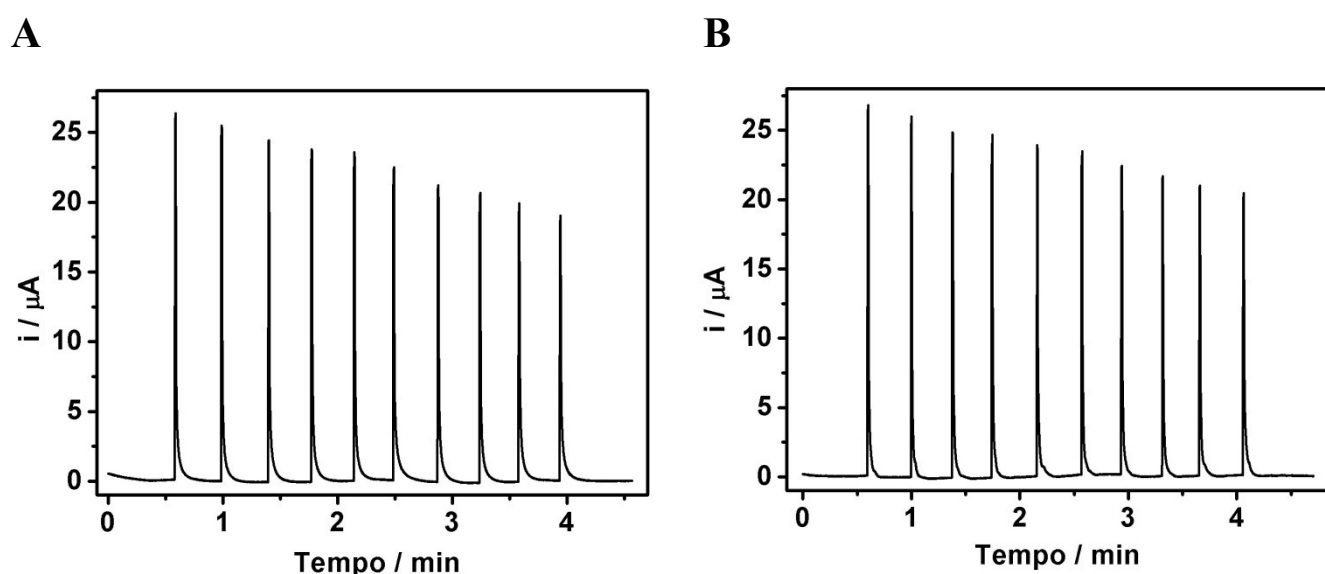
Fonte: A autora.

Observa-se que para o teste de repetibilidade sem agitação o sinal de corrente cai à medida que se injeta solução padrão no sistema de maneira significativa e constante, com DPR igual a 23%. Já para o teste de repetibilidade com agitação, o sinal de corrente também cai de forma constante, mas o caimento do sinal de corrente não é tão brusco quanto para a repetibilidade sem agitação, obteve-se DPR equivalente a 20%. Para ambos os casos, nota-se que ocorre adsorção do analito na superfície do eletrodo devido aos sinais de corrente caírem ao logo das injeções.

Diante dos testes de repetibilidade feitos e os valores dos DPR, constatou-se que a aplicação do potencial de limpeza e o sistema com agitação diminuem um pouco da adsorvidade do NPX na superfície do eletrodo limpo, mas não de maneira eficiente e reprodutível.

A Figura 12 apresenta o teste de repetibilidade para o eletrodo modificado com alumina avaliando também o sistema sem e com agitação aplicando apenas o potencial constante de trabalho.

Figura 12 – Estudo da repetibilidade no sistema BIA para GCE modificado com alumina com injeções da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,5$) com adição de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Volume de injeção: $100 \text{ } \mu\text{L}$, velocidade de injeção: $213 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$. (A) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ (50 ms) sem agitação. (B) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ (50 ms) com agitação.

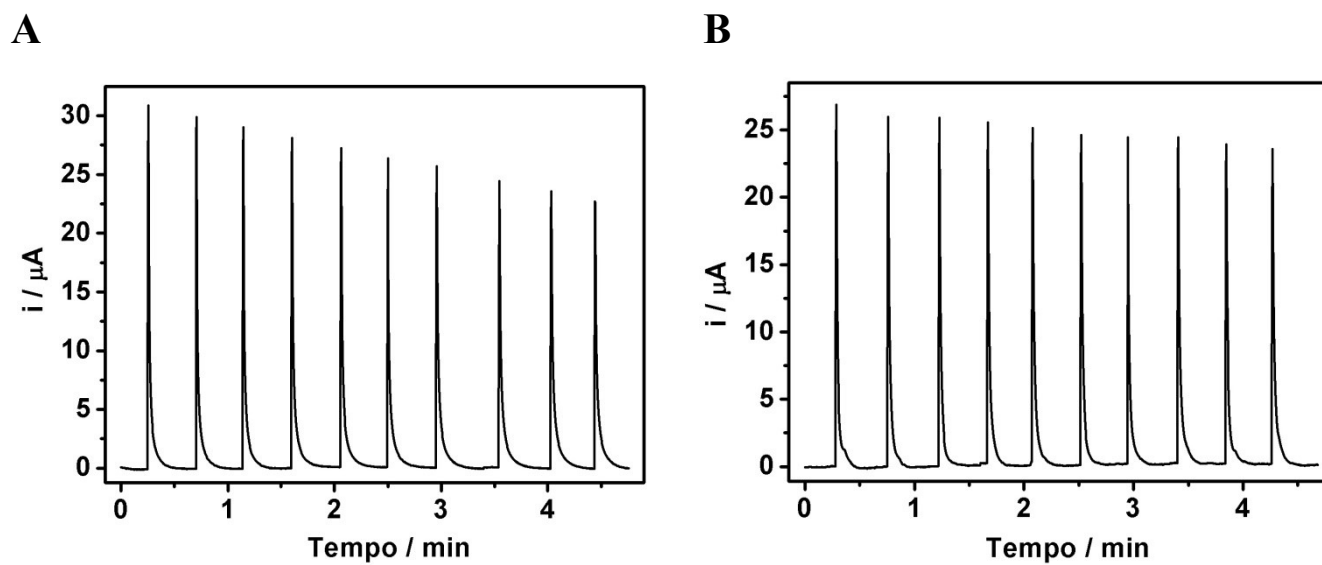


Fonte: A autora.

Primeiramente, nota-se que a escala de sinal de corrente aumentou para os dois casos, com e sem agitação indicando que o efeito catalítico da alumina e menor efeito de queda de corrente em relação ao eletrodo limpo analisado anteriormente. O sinal de corrente continua caindo ao longo das injeções de forma constante para ambas as situações. Na Figura 12-A, obteve-se DPR igual a 11% e para a Figura 12-B, obteve-se DPR equivalente a 9%.

Finalmente, a Figura 13, mostra o ultimo teste de repetibilidade com GCE modificado com alumina com e sem agitação só que agora aplicando potencial constante e potencial de limpeza.

Figura 13 – Estudo da repetibilidade no sistema BIA para GCE modificado com alumina com injeções da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,5) com adição de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de NPX. Volume de injeção: $100 \text{ } \mu\text{L}$, velocidade de injeção: $213 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$. (A) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ (50 ms) e potencial de limpeza de $1,0 \text{ V}$ (200 ms) sem agitação. (B) Potencial constante de trabalho $1,4 \text{ V}$ (50 ms) e potencial de limpeza de $1,0 \text{ V}$ (200 ms) com agitação.



Fonte: A autora.

Analisando a figura acima, verifica-se que a aplicação dos potenciais constante e de limpeza juntamente com o sistema de agitação em GCE modificado com alumina reduz significativamente a queda de corrente devido à adsorção e que a alumina está de alguma forma, facilitando a oxidação de NPX, ou seja, o eletrodo modificado com alumina funciona como um sensor eletrocatalítico, reduzindo a energia de ativação da transferência de elétrons, proporcionando o aumento da velocidade dessa transferência eletrônica, o que conseqüentemente, amplia o sinal analítico ^[11]. Percebe-se que o sistema de agitação também é muito importante para obtenção de resultados reprodutíveis visto que no estudo de repetibilidade sem agitação (Figura 13-A) o sinal de corrente cai constantemente permitindo a adsorção do analito sob a superfície do eletrodo mesmo modificado. O DPR para (13-A) foi de 8% e para (13-B) 5% sendo o máximo permitido pela Anvisa ^[12].

Tabela 2 – Desvio padrão relativo obtidos nos estudos de repetibilidade.

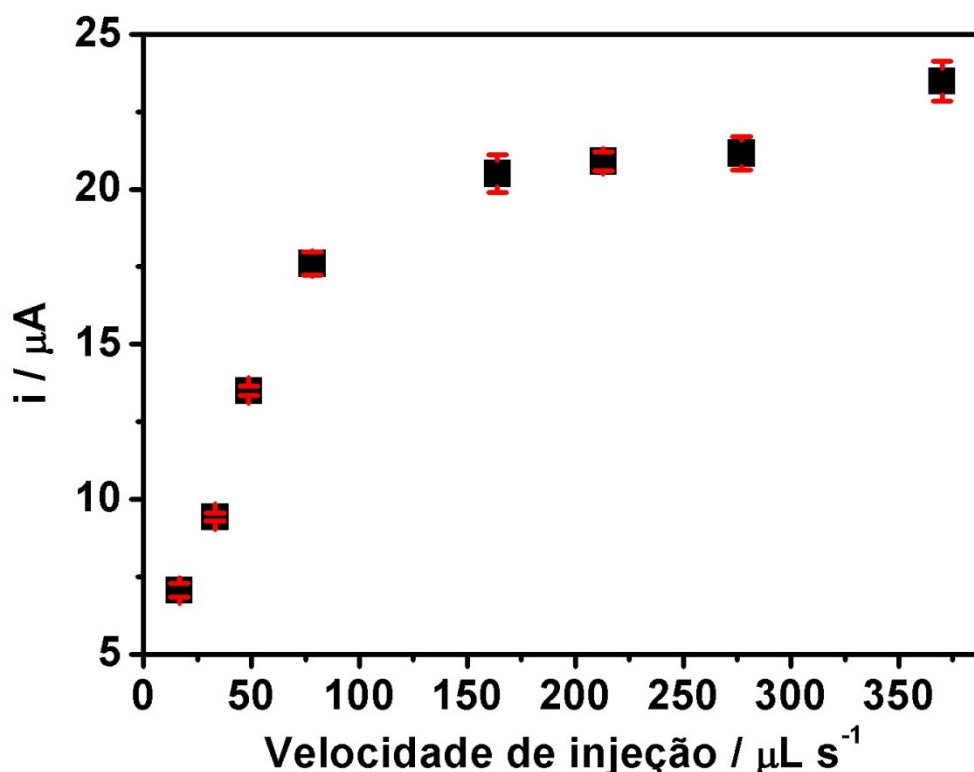
Estudo de repetibilidade	DPR
GCE limpo com potencial de trabalho 1,4V com agitação	39%
GCE limpo com potencial de trabalho 1,4V e potencial de limpeza 1,0V sem agitação	23%
GCE limpo com potencial de trabalho 1,4V e potencial de limpeza 1,0V com agitação	20%
GCE alumina com potencial de trabalho 1,4V sem agitação	11%
GCE alumina com potencial de trabalho 1,4V com agitação	9%
GCE alumina com potencial de trabalho 1,4V e potencial de limpeza 1,0V sem agitação	8%
GCE alumina com potencial de trabalho 1,4V e potencial de limpeza 1,0V com agitação	5%

Para as próximas otimizações do sistema, será adotado também um potencial adicional, o potencial de limpeza, para evitar que o NPX adsorva na superfície do eletrodo e buscar melhores resultados. Logo, para a realização das análises temos o potencial de trabalho adotado de 1,4 V aplicado durante 50 ms e o potencial de limpeza de 1,0 V aplicado durante 200 ms como mostra a Figura 3 que apresenta o esquema de aplicação dos potenciais.

Os seguintes parâmetros, volume e velocidade de injeção, do sistema estão relacionados à programação da pipeta eletrônica que é o principal instrumento utilizado nas determinações ^[4], e por isso também deve estar em suas condições ótimas.

A velocidade de injeção é a velocidade com que a solução entra em contato com a superfície do eletrodo de trabalho e qual o volume de amostra é injetado por segundo na velocidade indicada ^[4]. Oito velocidades de injeção foram selecionadas para o estudo sendo estas, selecionadas diretamente na pipeta eletrônica durante as injeções no sistema BIA. As velocidades são 17, 33, 49, 78, 164, 213, 277 e 370 $\mu\text{L s}^{-1}$ e foram avaliadas em função da resposta amperométrica do NPX. O estudo foi realizado apenas para o GCE modificado com alumina com o potencial constante de 1,4 V e com o potencial de limpeza de 1,0 V. A Figura 14 mostra os resultados obtidos.

Figura 14 – Estudo da velocidade de injeção utilizando GCE modificado com Alumina empregado oito velocidades distintas de 17, 33, 49, 78, 164, 213, 277 e 370 $\mu\text{L s}^{-1}$ injetadas em triplicata da solução padrão de NPX em 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH = 7,5), sistema com agitação. Potencial de trabalho: 1,4 V (50 ms), potencial de limpeza, 1,0 V (200 ms), volume de injeção: 100 μL .

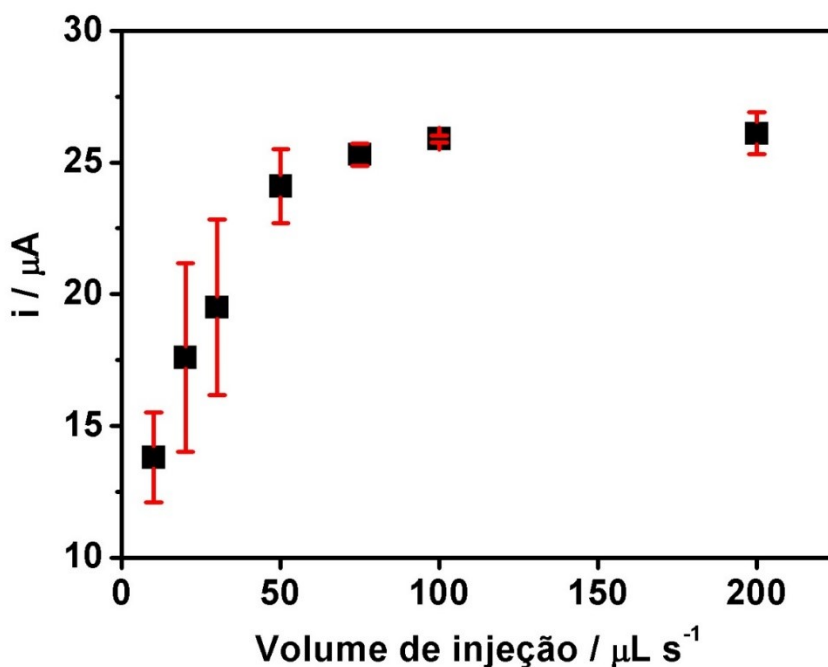


Fonte: A autora.

De acordo com a Figura 14, temos que com o aumento da velocidade, o sinal de corrente também aumenta. Considerando alto valor de corrente e menor desvio observados, a velocidade de injeção de 213 $\mu\text{L s}^{-1}$ é a mais adequada dentre as outras o que irá proporcionar maior sensibilidade na determinação de NPX.

O último parâmetro analisado foi o volume de injeção, também realizado apenas para o eletrodo modificado com alumina. Os volumes selecionados, de forma similar, foram programados diretamente na pipeta durante a análise, estes volumes foram 10, 20, 30, 50, 75, 100 e 200 μL . A velocidade de injeção foi fixada em 213 $\mu\text{L s}^{-1}$ com potencial constante de trabalho de 1,4 V e potencial de limpeza de 1,0 V. Foi injetada a solução padrão de NPX em 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os resultados obtidos estão dispostos na Figura 15.

Figura 15 – Estudo do volume injetado no sistema BIA utilizando GCE modificado com alumina. Cada volume de 10, 20, 30, 50, 75, 100 e 200 μL foram injetados em triplicata, sistema com agitação. Potencial de trabalho: 1,4 V, potencial de limpeza: 1,0 V, velocidade de injeção: $213 \mu\text{L s}^{-1}$.

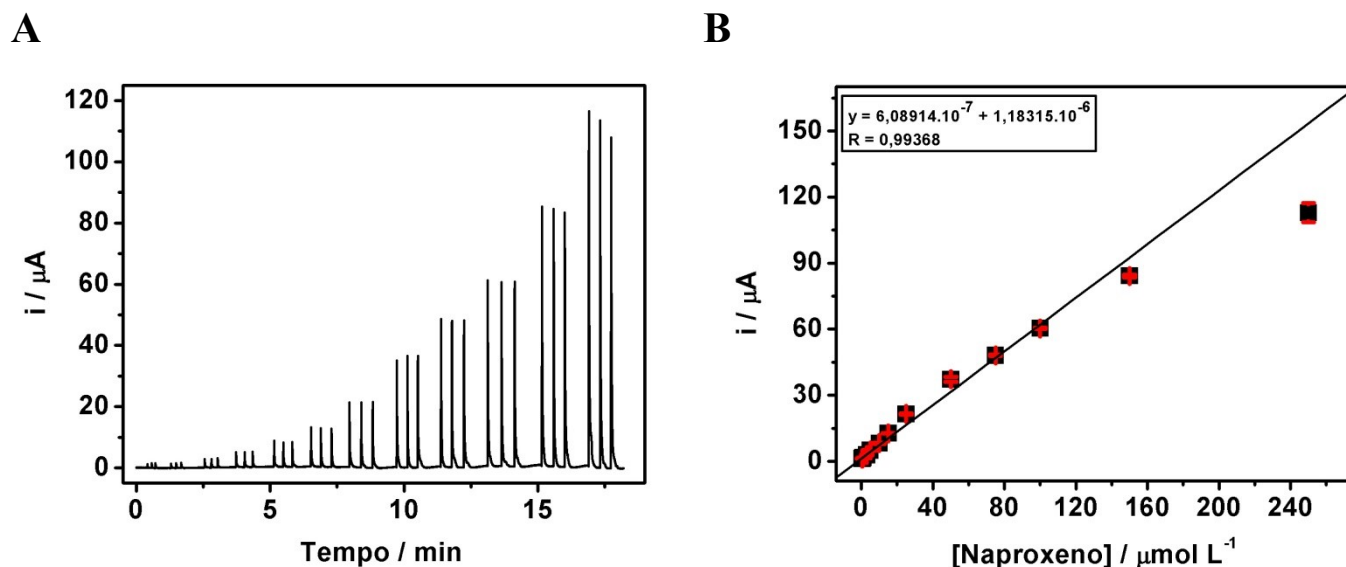


Fonte: A autora.

Conforme observa-se na Figura 15, assim como o comportamento da velocidade de injeção, o sinal de corrente aumenta com o aumento do volume injetado. Sendo assim, o melhor volume é de 100 μL , pois foi o volume de maior sinal de corrente e menor desvio.

Prosseguindo com as análises, o próximo passo foi o estudo da faixa linear que mostra o comportamento dos sinais de corrente com o aumento da concentração de soluções padrão de NPX. Foram injetados, em triplicata, 12 soluções padrão de NPX em concentrações diferentes os quais são 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150 e $250 \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando como eletrólito a solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,5$). Foram empregados na análise os parâmetros otimizados: eletrodo modificado com alumina, agitação, aplicação de potencial constante de trabalho de 1,4 V (50 ms), aplicação de potencial de limpeza de 1,0 V (200 ms), velocidade de injeção: $213 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de 100 μL . A Figura 16 mostra o amperograma desse estudo e a curva analítica.

Figura 16 – (A) Amperograma do estudo da faixa linear obtida no sistema BIA, utilizando GCE modificado com alumina, para injeções em triplicata de soluções padrão de NPX 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH = 7,5). Análise feita em potencial constante de 1,4 V, potencial de limpeza de 1,0 V, volume de 100 μL e velocidade de injeção: 213 $\mu\text{L s}^{-1}$. (B) Curva de analítica correspondente ao amperograma.



Fonte: A autora.

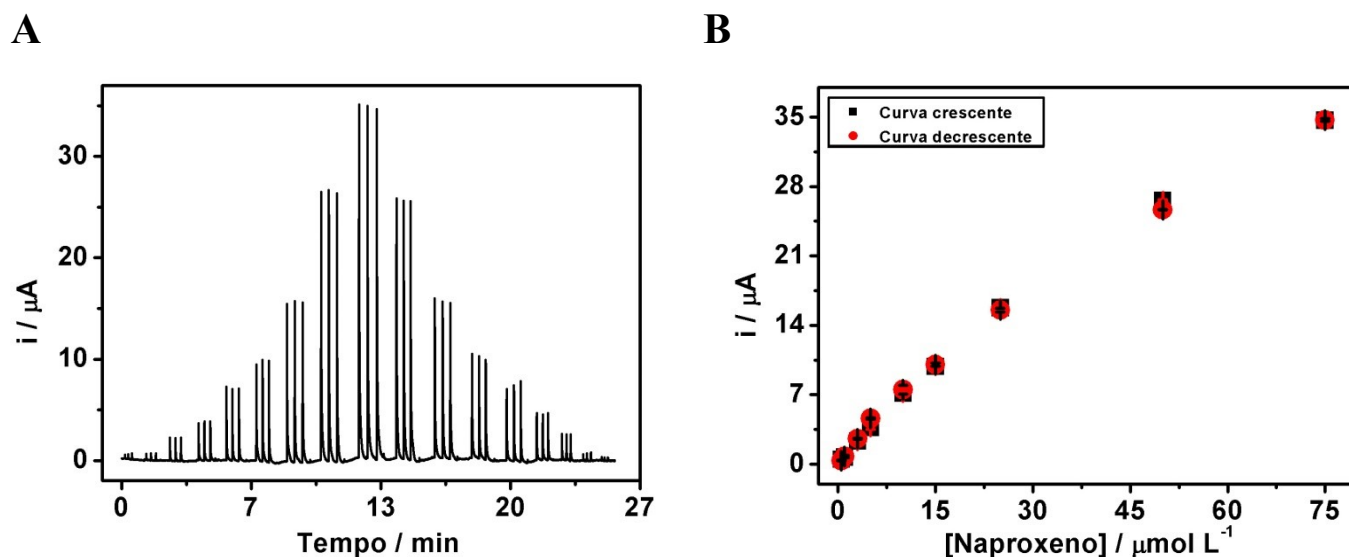
Diante da Figura 16 e a partir do gráfico da curva de calibração de 0,5 a 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obteve-se uma frequência analítica de 120 injeções/hora. Observando o gráfico com maior atenção temos que até o ponto de 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ há uma melhor linearidade entre os pontos devido à queda do sinal de corrente das triplicatas tornando a curva não tão reprodutível. Por isso, a curva de calibração foi determinada do ponto 0,5 até o ponto 75,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com $R = 0,9977$ o que nos trará resultados reprodutíveis quanto determinação de NPX. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) sob condições otimizadas foram estimados em 0,32 e 1,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (Equações 2 e 3).

$$\text{LD} = \frac{3_x \text{DPR}_{\text{branco}}}{\text{coeficiente angular}} \quad (2) \quad \text{LQ} = 3,333_x \text{LD} \quad (3)$$

O resultado obtido para limite de detecção $0,32 \mu\text{mol L}^{-1}$ é menor quando comparado com o valor obtido no trabalho de Montes, 2014 na determinação de NPX em GCE modificado com nanotubo de carbono, $\text{LD} = 0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ [11], mostrando que a modificação com alumina permite detecção de analitos em concentrações muito pequenas.

A fim de avaliar o efeito de memória do eletrodo, realizou-se injeções em triplicata de soluções contendo concentrações de NPX crescente e decrescente dos pontos 0,5 a $75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 17 mostra os resultados obtidos em forma de amperograma e as respectivas curvas analíticas crescente e decrescente.

Figura 17 – (A) Respostas amperométricas obtidas em sistema BIA, utilizando GCE modificado com alumina, para injeções crescentes e decrescentes (em triplicata) de soluções padrão de NPX 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 25, 50, e $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato ($\text{pH} = 7,5$). Potencial constante de $1,4 \text{ V}$ (50 ms), potencial de limpeza de $1,0 \text{ V}$ (200 ms), volume de $100 \mu\text{L}$ e velocidade de injeção: $213 \mu\text{L s}^{-1}$. (B) Curva analítica crescente e decrescente correspondente ao amperograma.



Fonte: A autora.

Para a curva crescente obteve-se equação da reta igual a $y = 4,68464 \cdot 10^{-7}x + 1,64274 \cdot 10^{-6}$ com $R = 0,9920$ e a curva decrescente resultou em uma equação da reta equivalente a $y = 4,5898 \cdot 10^{-7}x + 1,89055 \cdot 10^{-6}$ com $R = 0,9926$. Comparando esses dados com o trabalho de Montes, 2014, foi possível observar que o eletrodo modificado

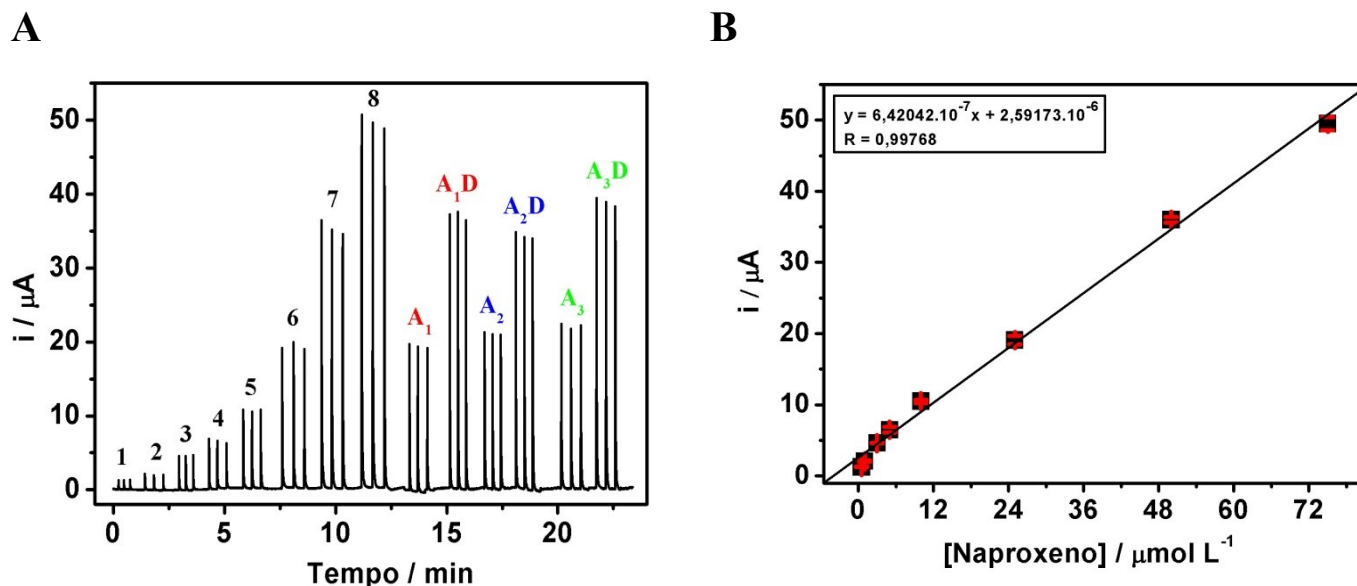
com alumina permitiu explorar concentrações do analito ainda menores em relação ao trabalho^[7] em que a modificação utilizada foi com o nanotubo de carbono. Com isso, pode-se confirmar que a simples modificação do GCE com alumina por polimento, mostrou-se tão eficaz quanto a modificação do GCE com nanotubos de carbono, possibilitando a análise de NPX em concentrações ainda menores.

Analisando as Figuras 17-A e 17-B, observa-se que o comportamento das soluções padrão em termos de corrente é semelhante na curva crescente e decrescente nos mostrando que não há efeito de memória e o comportamento linear permanece.

Não foi verificado processo de adsorção no eletrodo entre as injeções de soluções padrão, que foram evidenciados pelo fato de que as respostas de corrente não diminuíram durante as medições amperométricas, devido à aplicação de um pulso de potencial de limpeza (1,0 V – 200 ms), utilizando a técnica de detecção amperométrica de múltiplos pulsos juntamente com o sistema de agitação.

O método BIA otimizado com amperometria de múltiplos pulsos foi realizado para a determinação de NPX em fármacos. A Figura 18 apresenta o amperograma em GCE modificado com alumina com as injeções da curva de calibração crescente (0,5 a 75,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e as injeções das amostras farmacêuticas e suas respectivas dopagens, com quantidade conhecida de solução padrão de NPX, em uma concentração de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para as amostras farmacêuticas analisadas e valores de recuperação encontrados após dopagem das mesmas com solução padrão de NPX em 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 18 – (A) Respostas amperométricas em sistema BIA do GCE alumina para injeções em triplicada de (1) 0,5, (2) 1,0, (3) 3,0, (4) 5,0, (5) 10,0, (6) 25,0, (7) 50,0 e (8) 75,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de padrões de NPX, três amostras comerciais (A_1 , A_2 e A_3) e as amostras dopadas (A_1D , A_2D e A_3D). (B) curva de calibração crescente mesmas condições da Figura 20-A.



Fonte: A autora.

Tabela 3 – Valores de concentrações de NPX obtidas pelo método proposto BIA em GCE modificado com alumina.

Amostras	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado (mg)	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
A_1 (250 mg)	23 ± 1	234 ± 9	25	30 ± 1	121 ± 5
A_2 (500 mg)	25 ± 0	501 ± 7	25	25 ± 1	99 ± 3
A_3 (550 mg)	28 ± 2	551 ± 37	25	29 ± 3	116 ± 11

Observando-se os resultados obtidos de porcentagem de recuperação, percebe-se que todos os medicamentos apresentaram valores de recuperação dentro da faixa aceitável pela ANVISA (80% a 120% ^[12]).

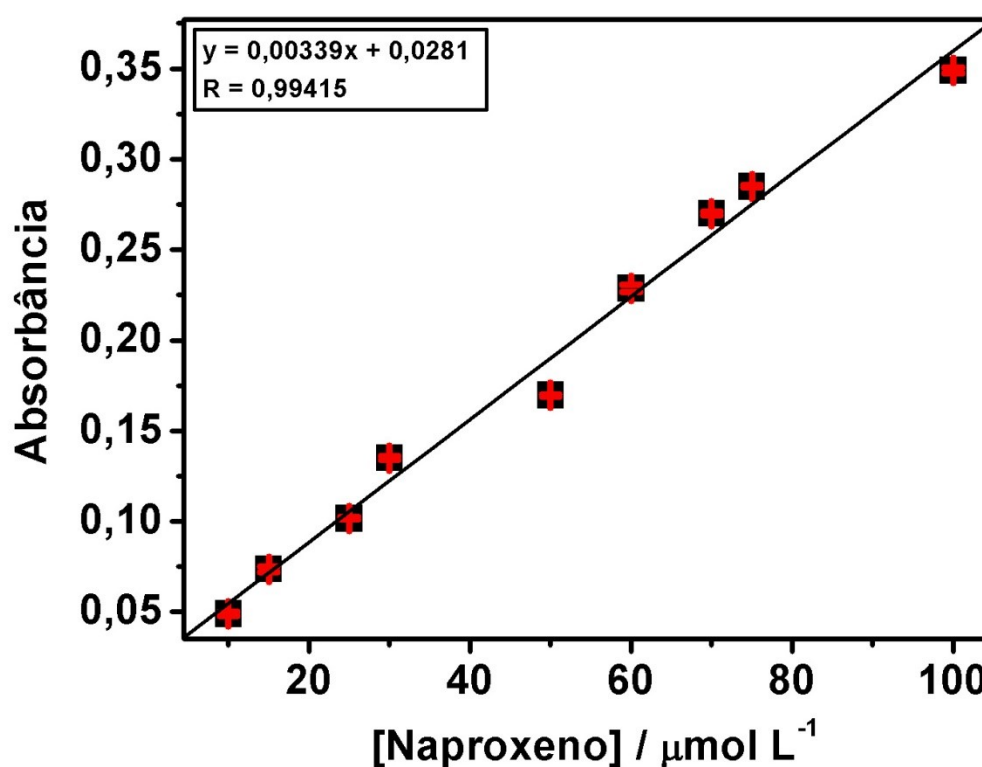
Observando-se agora os resultados obtidos em miligramas nas amostras, verifica-se também que todos os fármacos apresentaram valores próximos dos descritos em suas formulações. Pode-se dizer que todos os fármacos estudados pelo sistema BIA possuem, realmente, a mesma quantidade descrita em suas respectivas bulas.

4.2. Espectrofotometria UV-Vis

A princípio foi feita a curva analítica, Figura 8, fazendo a leitura das soluções padrão de NPX desde a concentração mais baixa até a concentração mais alta a fim de obter uma faixa linear.

Este estudo foi feito para obter resultados na análise de NPX e utilizá-las na validação do sistema proposto neste trabalho.

Figura 19 – Curva analítica espectrofotométrica de absorção no UV-Vis das soluções padrão de NPX nas concentrações de 10, 15, 25, 30, 50, 60, 70, 75 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparadas em solução de H_3PO_4 0,1 mol L^{-1} em pH=7,5.



Fonte: A autora.

A partir da curva analítica obteve-se a equação da reta para calcular a concentração de NPX em termos de concentração e massa de cada fármaco.

$$y = 0,00339x + 0,0281 \quad | \quad R = 0,9942$$

Observa-se, de acordo com o coeficiente de correlação R, uma boa linearidade entre os pontos indicando bons resultados em relação à quantificação do analito através desta técnica.

Após a confecção da curva, realizou-se a leitura das amostras, sendo estas preparadas em concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados obtidos das amostras após leitura espectrofotométrica de absorção no UV-Vis.

Amostras	Concentração preparada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração Encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração Rótulos (mg)	Concentração Encontrada (mg)
A₁	50	45,29	250	227 ± 1
A₂	50	43,71	500	437 ± 3
A₃	50	50,99	550	510 ± 2

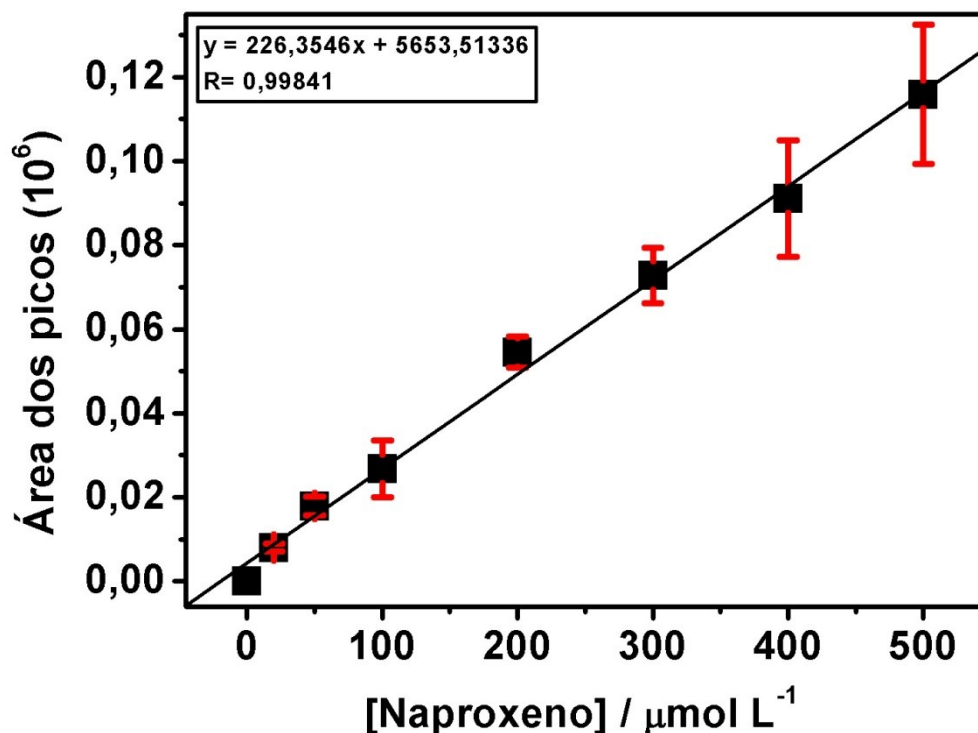
Diante dos resultados da Tabela 2, temos que as concentrações encontradas nas três amostras de NPX foram relativamente próximas da concentração esperada tanto em $\mu\text{mol L}^{-1}$ como em miligramas. A amostra A₂ apresentou menor massa em miligrama isso deve a interferências dos excipientes do fármaco.

4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

A Figura 20 mostra a curva analítica obtida através da análise via HPLC das soluções padrão de NPX em diferentes concentrações.

Este estudo tem como objetivo obter resultados na análise de NPX para comparação e avaliação do sistema proposto.

Figura 20 – Curva analítica obtida após injeção, em triplicata, via HPLC dos padrões de NPX nas concentrações de 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparadas na fase móvel de uma solução diluída de ácido acético de pH igual a 3 e metanol (85:15 v/v).



Fonte: A autora.

A partir da curva analítica, temos a equação da reta para cálculos quantitativos do NPX nas amostras de fármacos. Observa-se que o coeficiente de correlação resultou numa boa linearidade dos pontos da curva.

$$y = 226,3546x + 5653,51336 \quad | \quad R = 0,9984$$

Após a injeção das amostras de NPX preparadas em 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, encontrou-se os valores de NPX, os quais estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados obtidos das amostras após a análise HPLC.

Amostras	Concentração preparada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração Encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração Rótulos (mg)	Concentração Encontrada (mg)
A₁	200	222,39	250	278 $\pm$ 53
A₂	200	213,70	500	534 $\pm$ 41
A₃	200	253,43	550	573 $\pm$ 55

Diante dos resultados da Tabela 3, temos que as concentrações encontradas nas três amostras de NPX foram próximas das concentrações esperadas.

4.4. Comparação dos métodos

Considerando os resultados obtidos em cada método aqui estudado, pode-se perceber que os resultados encontrados entre os três métodos são similares, isto mostra que os estudos feitos buscando condições ótimas de análise foram eficientes e o comportamento linear das curvas de calibração foram efetivos na determinação do analito nas amostras farmacêuticas.

O método proposto apresentou diversas vantagens como rapidez, uso de pequenos volumes de amostras e padrões, equipamentos simples e apresentou resultados reprodutíveis e de alta sensibilidade.

Vale ressaltar também que os erros envolvidos na realização de todas as análises foram possivelmente erros aleatórios, sendo apenas erros de preparo de amostras e dos equipamentos.

A Tabela 6 apresenta um resumo dos valores encontrados de NPX de cada fármaco para cada método proposto. A amostra A₂ apresentou menor massa, em miligramas, na determinação de NPX via espectrofotometria UV-Vis devido a interferências dos excipientes do fármaco.

Tabela 6 – Massa de NPX obtida para cada amostra de medicamento por três diferentes métodos analíticos.

Amostras	Rótulo (mg)	BIA-AMP (mg)	HPLC (mg)	UV-Vis (mg)
A ₁	250	234 ± 9	278 ± 52	227 ± 1
A ₂	500	501 ± 7	533 ± 41	437 ± 3
A ₃	550	551 ± 37	573 ± 55	510 ± 2

Calculando-se o teste-t (GraphPad), Tabela 7, verificou-se que todos os resultados obtidos para todas as amostras de NPX estudadas pelo método BIA foram concordantes com os resultados obtidos por HPLC para todas as amostras ao nível de 95% de confiança, indicando que não há diferenças significativas entre os resultados obtidos entre ambos os métodos. Os resultados obtidos pelo método BIA também foram condizentes com os resultados obtidos por espectrofotometria UV-Vis com 95% de confiança exceto para a amostra A₂.

Tabela 7 – Valores de t do cálculo do teste-t (n = 3).

Amostras	BIA-AMP vs HPLC	BIA-AMP vs UV-Vis
A ₁	1,44	1,33
A ₂	1,33	14,55
A ₃	0,57	1,92

5. CONCLUSÃO

Perante todos os resultados obtidos pelos três métodos, foi possível quantificar a concentração de NPX em fármacos. Observou-se que todos os fármacos estavam dentro da faixa aceitável de 80 a 120% permitida pela Anvisa.

O método proposto usando sistema BIA apresentou excelentes resultados neste trabalho, mostrando que esse método é promissor para controle de qualidade de medicamentos assim com as técnicas oficiais. O método BIA foi eficaz para essa quantificação devido a suas vantagens instrumentais, alta frequência de amostragem, consumo reduzido de reagentes e redução na geração de resíduos. Em especial,

destaca-se nesse método a modificação do eletrodo com alumina, a qual foi de suma importância na quantificação de NPX, pois permitiu exploração de concentrações muito pequenas e repercutiu resultados de alta sensibilidade (alto valor de coeficiente angular) em relação a trabalhos já publicados com outra modificação do mesmo eletrodo trabalhado.

Comparando o método BIA com o método HPLC, ambos apresentam alta sensibilidade promovendo resultados mais precisos, consomem menos reagentes e amostras reduzindo a geração de resíduos e foram capazes de fornecer bons resultados que foram concordantes a um nível de confiança de 95%.

O objetivo de avaliar, comparativamente, o GCE limpo e modificado com alumina como sensor eletroquímico para detecção de NPX em formulações farmacêuticas através do sistema de BIA foi alcançado.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Naproxeno. Disponível em
<<http://www.quimica.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=1865&evento=5>>
- Acesso em: 10/06/2019
- [2]. CONEJO, H. J. F. Síntese e estudo in silico de derivados de naproxeno com potencial atividade anti-inflamatória. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.
- [3]. Naproxeno. Disponível em
<<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Naproxen.svg>> - Acesso em: 12/06/2019
- [4]. LIMA, A. P. Investigação do comportamento eletroquímico da cloroexidina em eletrodos modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas de diferentes diâmetros e sua determinação amperométrica em produtos comerciais. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Uberlândia.
- [5]. MONTES, R. H. O. Efeito do tamanho de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em sensores eletroquímicos para moléculas de interesse farmacêutico. 2015.

- [6]. OLIVEIRA, T. C. Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos empregando BIA para a determinação de nafazolina, zinco, feniramina e clorfeniramina em formulações farmacêuticas. 2015.
- [7]. LIMA, A. P., SOUZA, R. C., SILVA, M. N. T., GONÇALVES, R. F., NOSSOL, E., RICHTER, E. M., LIMA, R. C., MUNOZ, R. A. A. Influence of Al₂O₃ nanoparticles structure immobilized upon glassy-carbon electrode on the electrocatalytic oxidation of phenolic compounds. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 262, p. 646-654, 2018.
- [8]. SKOOG, D. A., HOLLER F. J., NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª Edição. Trad. Ignez Caracelli. Port Alegre: Bookman, 2002.
- [9]. GOULART, D. S. Aplicações das técnicas de cromatografia no diagnostico toxicológico. 2012.
- [10]. SILVA, A. F. A. Validação de métodos analíticos para controlo de qualidade de um medicamento, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). 2016. Tese de Doutorado.
- [11]. MONTES, R. H. O, STEFANO, J. S., RICHTER, E. M. & MUÑOZ, R. A. Exploring multiwalled carbon nanotubes for naproxen detection. **Electroanalysis**, v. 26, n. 7, p. 1449-1453, 2014.
- [12]. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução – RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003. Artigo 1º, Tabela 3.
- [13]. PEREIRA, P. F. Uso do eletrodo de diamante dopado com boro acoplado a um sistema BIA para determinação simultânea de princípios ativos em medicamentos. 2016.
- [14]. STEFANO, J. S., MONTES, R. H. O., RICHTER, E. M. & MUÑOZ, R. A. Flow-injection analysis with multiple-pulse amperometry for simultaneous determination of paracetamol and naproxen using a homemade flow cell for screen-printed electrodes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 3, p. 484-491, 2014.

[15]. STEFANO, J. S., LIMA, A. P., MONTES, R. H. O., RICHTER, E. M. & MUÑOZ, R. A. 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.

[16]. T test calculator. Disponível em

<<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>> - Acesso em: 16/06/2019