

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Desenvolvimento de Procedimentos Analíticos para a Determinação de
N-acetilcisteína em Produtos Farmacêuticos

WILLIAN TOITO SUAREZ*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE EM QUÍMICA (área de
concentração QUÍMICA ANALÍTICA)

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho

*Bolsista do CNPq

São Carlos – SP

2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S939dp

Suarez, Willian Toito.

Desenvolvimento de procedimentos analíticos para a
determinação de N-acetilcisteína em produtos farmacêuticos
/ Willian Toito Suarez -- São Carlos : UFSCar, 2006.
102 p.

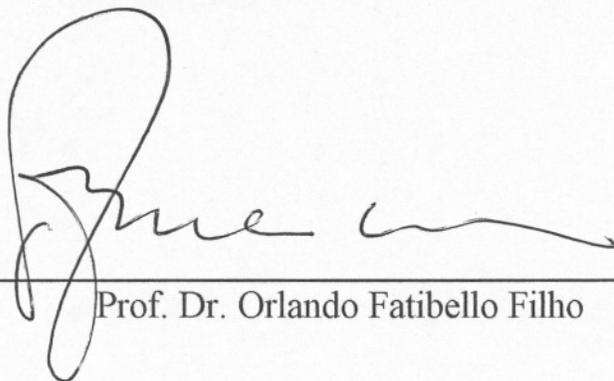
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2005.

1. Química analítica. 2. Análise por injeção de fluxo. 3. N-
acetilcisteína. 4. Produtos farmacêuticos - determinação. 5.
Potenciometria. 6. Eletrodos de pasta de carbono
modificados. I. Título.

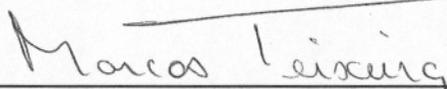
CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

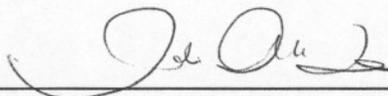
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou o
exame de dissertação de mestrado do candidato **Willian Toito Suarez**
realizado em 17 de fevereiro de 2005:*



Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira



Prof. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Lourdes e Alcides.*

*Aos meus irmãos, Luciane, Raquel,
Maísa e Isaías.*

À Fernanda, é claro.

Agradeço,

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho pela orientação, incentivo, confiança e amizade durante todos esses anos de trabalho.

Aos Profs. Marcos Fernando de Souza Teixeira e Ana Rita de Araújo Nogueira pelas sugestões, críticas e apoio dados durante a defesa da dissertação.

Aos colegas do LABBES: Karina, Viviane, Renata, Larissa, Cleones, Claudinéia, Odair e Evandro.

Aos meus e velhos e bons amigos Maurílio, Alexandre, Rodrigo, Vítor, Ricardo (CD), Maurão (PT), João Bad Trip, Daniel, Daniela e Joessil.

À galera do Poindexter: Alan, Matosinhos, Maurão e Coringa.

Aos grandes companheiros e amigos Alexandre (Itapira) e Rodrigo (Paratudo/Parabólico).

Aos sobreviventes do bloco 7: Cristiano, Daniel, Tchê, Paulão, Piteco, Pinga, Eduardo, Antônio, João, Baiano e outros que por lá passaram.

Ao Luíz Humberto pela ajuda, idéias e companheirismo.

Especialmente ao Heberth por ter me ajudado muito na iniciação científica e no mestrado, valeu irmão.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Mucolíticos e Expectorantes.....	2
1.2. N-acetilcisteína.....	3
1.2.1. Aspectos Gerais.....	3
1.2.2. Propriedades Farmacológicas.....	4
1.2.2.1. Mecanismo de Ação.....	4
1.2.2.2. Farmacocinética.....	4
1.2.3. Indicações Clínicas.....	5
1.2.3.1. Doenças Respiratórias.....	5
1.2.3.2. Câncer.....	5
1.2.3.3. Intoxicação por Paracetamol.....	5
1.2.3.4. Doenças Cardíacas.....	6
1.2.3.5. Toxicologia.....	6
1.2.4. Métodos para Determinação de N-acetilcisteína.....	7
1.2.4.1. Espectrofotometria no UV – visível.....	7
1.2.4.2. Métodos Eletroquímicos.....	8
1.2.4.3. Métodos Fluorimétricos.....	9
1.2.4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	9
1.2.4.5. Métodos Quimiluminescentes.....	9
1.2.4.6. Farmacopéias.....	10
1.3. Justificativa e Objetivos.....	10
CAPÍTULO II – FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	11
2.1. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA).....	12
2.1.1. Abordagem Histórica.....	12
2.1.2. Princípios Fundamentais.....	13
2.1.3. Constituição.....	14
2.1.4. Configurações Elementares.....	16
2.1.4.1. Sistema em Linha Única.....	16
2.1.4.2. Sistema em Confluência.....	17
2.1.4.3. Sistema com Zonas Coalescentes.....	17
2.2. Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM).....	18
2.2.1. Abordagem Histórica.....	18
2.2.2. Eletrodo de Pasta de Carbono.....	19
2.2.2.1. Abordagem Histórica.....	19
2.3. Métodos de Análise.....	20
2.3.1. Espectrofotometria no UV-vísivel.....	20
2.3.2. Voltametria Linear.....	22
2.3.3. Potenciometria.....	23
2.3.4. Turbidimetria.....	24
CAPÍTULO III – PARTE EXPERIMENTAL.....	26

3.1. Instrumentação.....	27
3.1.1. Balança Analítica.....	27
3.1.2. pHmetro.....	27
3.1.3. Eletrodo de Vidro Combinado.....	27
3.1.4. Eletrodo de Referência de Ag/AgCl.....	27
3.1.5. Eletrodo Auxiliar.....	27
3.1.6. Bureta Automática.....	28
3.1.7. Bomba Peristáltica.....	28
3.1.8. Tubos e Conexões.....	28
3.1.9. Injetor Comutador.....	28
3.1.9.1. Registrador.....	28
3.2. Medidas Potenciométrica.....	28
3.3. Medidas Espectrofotométricas.....	29
3.4. Medidas Voltamétricas.....	29
3.5. Determinação Turbidimétrica de N-acetilcisteína com Nitrato de Prata, Empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com Zonas Coalescentes.....	30
3.5.1. Reagentes e Soluções.....	30
3.5.1.1. Soluções Estoque.....	30
3.5.1.2. Preparo e Análise das Amostras.....	30
3.5.2. Procedimento Experimental.....	31
3.5.3. Método Comparativo.....	32
3.6. Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína com Nitrato de Ferro (III), Empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com Zonas Coalescentes... ..	33
3.6.1. Reagentes e Soluções.....	33
3.6.1.1. Soluções Estoque.....	33
3.6.1.2. Preparo e Análise das Amostras.....	33
3.6.2. Procedimento Experimental.....	34
3.6.3. Método Comparativo.....	35
3.7. Determinação Voltamétrica de N-acetilcisteína Utilizando um Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado (EPCM) com Hexacianoferrato (III) de Cobre (II).....	35
3.7.1. Reagentes e Soluções.....	35
3.7.1.1. Soluções Estoque.....	35
3.7.1.2. Preparação do Hexacianoferrato (III) de Cobre (II).....	36
3.7.1.3. Preparação do Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado.....	36
3.7.1.4. Preparo e Análise das Amostras.....	37
3.8. Determinação Potenciométrica de N-acetilcisteína Empregando Nitrato de Prata como Reagente Titulante.....	38
3.8.1. Reagentes e Soluções.....	38
3.8.1.1. Soluções Estoque.....	38
3.8.1.2. Preparo e Análise das Amostras.....	38
3.8.1.3. Método Comparativo.....	38
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
4.1. Determinação Turbidimétrica de N-acetilcisteína com Nitrato de Prata, Empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com Zonas Coalescentes.....	40
4.1.1. Estudos dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA.....	40

4.1.2. Estudos dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA.....	43
4.1.3. Estudo de Interferentes em Potencial.....	48
4.1.4. Teste de Adição e Recuperação.....	48
4.1.5. Estudo da Repetibilidade e Frequência de Amostragem.....	49
4.1.6. Curva Analítica.....	50
4.1.7. Aplicações.....	51
4.2. Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína com Nitrato de Ferro (III), Empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com Zonas Coalescentes.....	53
4.2.1. Estudo dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA.....	54
4.2.2. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA.....	57
4.2.3. Estudo de Interferentes em Potencial.....	62
4.2.4. Teste de Adição e Recuperação.....	63
4.2.6. Estudo da Repetibilidade e Frequência de Amostragem.....	64
4.2.7. Curva Analítica.....	65
4.2.8. Aplicação.....	66
4.3. Determinação Voltamétrica de N-acetilcisteína Utilizando um Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado (EPCM) com Hexacianoferrato (III) de Cobre (II).....	68
4.3.1. Estudo do Comportamento Voltamétrico do EPCM com Hexacianoferrato (III) de Cobre (II)	71
4.3.2. Efeito do Eletrólito de Suporte.....	72
4.3.3. Efeito da Composição da Pasta de Carbono Modificada.....	74
4.3.4. Efeito do pH.....	75
4.3.5. Efeito da Velocidade de Varredura de Potenciais.....	76
4.3.6. Estudo de Interferentes em Potencial.....	78
4.3.7. Curva Analítica.....	79
4.3.8. Aplicação.....	81
4.4. Determinação Potenciométrica de N-acetilcisteína Empregando Nitrato de Prata como Reagente Titulante.....	83
4.4.1. Teste de Adição e Recuperação.....	84
4.4.2. Estudo de Interferentes em Potencial.....	84
4.4.3. Aplicação.....	85
CAPÍTULO V – TRATAMENTO DE RESÍDUOS.....	88
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES.....	90
CAPÍTULO VII – ATIVIDADES FUTURAS.....	94
CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 Comprimento de onda aproximado das cores.....	21
TABELA 4.1. Efeito dos excipientes como possíveis interferentes em potencial na determinação de N-acetilcisteína.....	48
TABELA 4.2. Estudo de adição e recuperação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas.....	49
TABELA 4.3. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o método comparativo.....	52
TABELA 4.4. Efeito dos excipientes como possíveis interferentes em potencial na determinação de N-acetilcisteína.....	63
TABELA 4.5. Estudo de adição e recuperação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas.....	63
TABELA 4.6. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o método comparativo.....	67
TABELA 4.7. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando-se o método voltamétrico e o método comparativo.....	82
TABELA 4.8. Estudo de adição e recuperação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas.....	84
TABELA 4.9. Efeito dos excipientes como possíveis interferentes em potencial na determinação de N-acetilcisteína.....	85
TABELA 4.10. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando-se o método proposto e o método comparativo.....	87
TABELA 5.1. Figuras de mérito e resultados obtidos neste trabalho de mestrado....	92
TABELA 5.2. Figuras de mérito dos procedimentos analíticos descritos na literatura para a determinação de N-acetilcisteína.....	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Estrutura molecular da N-acetilcisteína.....	4
FIGURA 2.1. Representação esquemática de um sistema FIA de linha única.....	15
FIGURA 2.2 Configurações elementares de sistemas FIA.....	16
FIGURA 3.1. Representação esquemática de uma célula eletroquímica usada nas medidas voltamétricas.....	29
FIGURA 3.2. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação turbidimétrica de N-acetilcisteína.....	31
FIGURA 3.3. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação espectrofotométrica de N-acetilcisteína.....	34
FIGURA 3.4 Esquema do eletrodo de pasta de carbono modificado.....	36
FIGURA 4.1. Estudo da concentração da solução transportadora.....	41
FIGURA 4.2. Estudo da concentração da solução transportadora HNO ₃	42
FIGURA 4.3. Estudo da concentração do reagente AgNO ₃	43
FIGURA 4.4. Estudo do volume da alça de amostragem.....	44
FIGURA 4.5. Efeito do volume da alça do reagente.....	45
FIGURA 4.6. Efeito do comprimento da bobina reacional.....	46
FIGURA 4.7. Estudo da vazão da solução transportadora HNO ₃	47
FIGURA 4.8. Curva analítica para determinação de N-acetilcisteína utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto.....	50
FIGURA 4.9. Sinais transientes em triplicatas das soluções de referência de N-acetilcisteína.....	51
FIGURA 4.10. (a) Curva de adição múltipla de padrão (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de N-acetilcisteína.....	52
FIGURA 4.11. Espectro de absorção molecular.....	54
FIGURA 4.12 Estudo da concentração hidrogeniônica.....	55
FIGURA 4.13. Estudo da concentração do reagente Fe(NO ₃) ₃	56

FIGURA 4.14. Estudo da concentração do reagente 1,10-ortofenantrolina.....	57
FIGURA 4.15. Efeito da vazão da solução transportadora (água desionizada).....	58
FIGURA 4.16. Efeito do volume da alça do reagente.....	59
FIGURA 4.17. Efeito do volume da alça de amostragem.....	60
FIGURA 4.18. Efeito do comprimento da bobina B1.....	61
FIGURA 4.19. Efeito do comprimento da bobina B2.....	62
FIGURA 4.20. Estudo da repetibilidade.....	64
FIGURA 4.21. Curva analítica para determinação de N-acetilcisteína utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto.....	65
FIGURA 4.22. Sinais transientes em triplicatas.....	66
FIGURA 4.23. (a) Curva de adição múltipla de padrão. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de N-acetilcisteína.....	68
FIGURA 4.24. Estrutura cristalina do hexacianoferrato (III) de cobre (II).....	69
FIGURA 4.25. Mecanismo proposto para a resposta voltamétrica do eletrodo modificado (EPCM).....	70
FIGURA 4.26. Voltamograma cíclico de hexacianoferrato (III) de cobre (II).....	71
FIGURA 4.27. Determinação voltamétrica de N-acetilcisteína.....	72
FIGURA 4.28. Voltamogramas lineares para um EPCM em diferentes eletrólitos suporte.....	73
FIGURA 4.29. Voltamogramas lineares para um EPCM com $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ em diferentes concentrações de Na^+	74
FIGURA 4.30. Estudo da composição da pasta de carbono sobre a resposta voltamétrica.....	75
FIGURA 4.31. Influência do pH na resposta voltamétrica do eletrodo de pasta de carbono modificado.....	76
FIGURA 4.32. Efeito da raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais.....	77
FIGURA 4.33. Voltamogramas lineares para um EPCM com $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ em diferentes velocidades de varredura de potenciais.....	78

FIGURA 4.34. Curva analítica obtida para N-acetilcisteína empregando-se um EPCM com hexacianoferrato (III) de cobre (II).....	80
FIGURA 4.35. Voltamogramas lineares para um EPCM com $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ em diferentes concentrações de N-acetilcisteína.....	81
FIGURA 4.36 Voltamogramas obtidos na determinação de N-acetilcisteína utilizando o eletrodo de pasta de carbono modificado com hexacianoferrato (III) de cobre (II).....	82
FIGURA 4.37. Curva obtida pelo método de adição múltipla de padrões para a determinação de N-acetilcisteína.....	83
FIGURA 4.38. Curvas potenciométricas da titulação de 5,0 mL de uma solução padrão de N-acetilcisteína.....	85
FIGURA 4.39. Curvas potenciométricas da titulação de 5,0 mL de solução de amostra.....	86
FIGURA 4.40. Curvas potenciométricas da titulação de 5,0 mL de solução de amostra.....	87

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE N-ACETILCISTEÍNA EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS.

Nessa dissertação descreve-se quatro procedimentos analíticos para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas. O primeiro procedimento desenvolvido foi um sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação turbidimétrica de N-acetilcisteína empregando como reagente precipitante íons Ag^+ em meio ácido. Nesse sistema, solução do reagente AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e da amostra foram inseridos simultaneamente em zonas coalescentes em volume de 250 e 500 μL , respectivamente. Após a formação do precipitado em uma bobina reacional de 100 cm, o produto gerado foi monitorado turbidimetricamente em 400 nm. Adaptou-se um fluxo intermitente de água desionizada a uma vazão de $6,3 \text{ mL min}^{-1}$ para a limpeza do sistema durante a amostragem. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de N-acetilcisteína de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($3\sigma_B/\text{inclinação}$) e frequência de amostragem de 60 h^{-1} . Os desvios padrões relativos foram menores que 1% para soluções de N-acetilcisteína de $1,0 \times 10^{-4}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=20$). Os valores do teste de recuperação em duas amostras comerciais variaram na faixa de 104 a 122%. Como um segundo procedimento, um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica foi proposto. Nesse sistema, N-acetilcisteína foi oxidada por Fe(III), sendo o Fe(II) produzido monitorado espectrofotometricamente como Fe(II)-1,10-ortofenantrolina em 515 nm. Sobre as condições analíticas otimizadas, a curva analítica foi linear em um intervalo de concentração de N-acetilcisteína entre $1,8 \times 10^{-5}$ a $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O limite de detecção obtido foi de $6,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($3\sigma_B/\text{inclinação}$) e as recuperações variaram na faixa de 102 a 113%. A caracterização e a preparação de um eletrodo de pasta de carbono modificado com hexacianoferrato de cobre(II) (CuHCF) foi investigado. O comportamento eletroquímico do eletrodo modificado para eletrooxidação da N-acetilcisteína foi explorado usando voltametria linear. As melhores respostas voltamétricas foram: composição da pasta de carbono de 20% (m/m) do complexo de hexacianoferrato de cobre(II), solução tampão acetato como

solução eletrolítica e velocidade de varredura de potenciais de 10 mV s^{-1} . A curva analítica foi linear na região de concentração de N-acetilcisteína entre $1,2 \times 10^{-4}$ a $8,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de $6,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($3\sigma_B/\text{inclinação}$). O eletrodo proposto foi usado para o controle e análise de rotinas de formulações farmacêuticas. Finalmente, um método potenciométrico simples, preciso, rápido e de baixo custo foi proposto para a determinação de N-acetilcisteína na forma pura e em formulações farmacêuticas. A N-acetilcisteína presente em formulações farmacêuticas foi determinada potenciometricamente empregando-se como titulante uma solução aquosa de AgNO_3 . Interferências não foram observadas na presença de componentes comumente encontrados nas formulações farmacêuticas, a saber: sacarina, sacarose e EDTA. Os resultados analíticos obtidos a partir da aplicação do método proposto estão em uma boa concordância com aqueles obtidos pelo método comparativo. A recuperação obtida para a N-acetilcisteína em várias formulações farmacêuticas variou de 98,7 a 103,0%. Em comparação com a maioria dos procedimentos descritos na literatura, os procedimentos desenvolvidos nessa dissertação mostraram-se ser mais baratos e simples para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL PROCEDURES FOR THE DETERMINATION OF N-ACETYLCYSTEINE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS.

In this dissertation four analytical procedures for the determination of N-acetylcysteine in pharmaceutical formulations are described. The first procedure developed was a flow injection analysis system for turbidimetric determination of N-acetylcysteine employing Ag^+ ions in an acid medium as the precipitant reagent. In this system, 250 μL of 0.01 mol L^{-1} AgNO_3 solution and 500 μL of sample solution were inserted simultaneously into a merging zones flow system. After the precipitate formation in a 100 cm coil reactor, the precipitate generated was monitored turbidimetrically at 400 nm. Desionised water flowing intermittently at 6.3 mL min^{-1} was used to wash out the precipitate during the sampling stage. The analytical curve was linear in the N-acetylcysteine concentration range from 1.0×10^{-4} to 1.0×10^{-3} mol L^{-1} ; with a detection limit of 8.0×10^{-5} mol L^{-1} ($3\sigma_B/\text{slope}$) and sampling frequency of 60 h^{-1} was obtained. The relative standard deviation was smaller than 1% for N-acetylcysteine solutions in the concentrations of 1.0×10^{-4} and 5.0×10^{-4} mol L^{-1} ($n=20$). The recoveries obtained for two samples ranged from 104 to 122%. A flow injection system with spectrophotometric detection is proposed for determining N-acetylcysteine in pharmaceutical formulations. In this system, N-acetylcysteine was oxidized by Fe(III) and the Fe(II) produced is spectrophotometrically monitored as Fe(II)-1,10-phenantroline complex at 515 nm. Under the optimum analytical conditions, the linearity of the calibration graph for N-acetylcysteine ranged from 1.8×10^{-5} to 1.5×10^{-4} mol L^{-1} . The detection limit of 6.3×10^{-6} mol L^{-1} ($3\sigma_B/\text{slope}$) and recoveries between 102 to 113 % were obtained. The preparation and electrochemical characterization of a carbon paste electrode modified with copper (II) hexacyanoferrate(III) (CuCHF) as well as its behaviour as electrocatalyst toward the oxidation of N-acetylcysteine were investigated. The electrochemical behaviour of the modified electrode and the electrooxidation of N-acetylcysteine were explored using sweep linear voltammetry. The best voltammetric response was observed for a paste composition of 20%(w/w) copper (II) hexacyanoferrate(III) complex, acetate buffer solution at pH of 6.0 as the electrolyte and scan rate of 10 mV s^{-1} . A linear voltammetric response for N-acetylcysteine was obtained in the concentration range

from 1.2×10^{-4} to 8.3×10^{-4} mol L⁻¹, with a detection limit of 6.3×10^{-5} mol L⁻¹ ($3\sigma_B/\text{slope}$). The proposed electrode is useful for the quality control and routine analysis of N-acetylcysteine in pharmaceutical formulations. Finally, a simple, precise, rapid and low-cost potentiometric method for N-acetylcysteine determination in pure form and in pharmaceutical preparations is proposed. N-acetylcysteine present in tablets containing known quantity of drug was potentiometrically titrated in aqueous solution with AgNO₃. No interferences were observed in the presence of common components of the tablets as saccharin, sucrose and EDTA. The analytical results obtained by applying the proposed method compared very favorably with those obtained by the comparative method. Recovery of N-acetylcysteine from various tablets dosage formulations range from 98.7 to 103.0%. Compared to others procedures reported in the literature the procedures developed in this dissertation shows to be better and cheaper to determination of N-acetylcysteine in pharmaceutical formulations.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1.1. Mucolíticos e Expectorantes¹

A mucosa respiratória normal é recoberta por um fluído composto por mucoproteínas, mucopolissacarídeos, proteínas, gordura, água e eletrólitos. Esse fluído está em constante movimento ascendente e tem a função de aquecer e umidificar o ar inspirado, além de remover partículas inaladas. O indivíduo normal pode produzir até 100 mL por dia dessa secreção, que é conduzida pelo batimento ciliar até a faringe, onde é deglutida sem que o indivíduo perceba.

A composição desse fluído é complexa e depende da participação de várias células ou estruturas: as células mucosas e epiteliais da superfície mucosa, glândulas submucosas e vasos sanguíneos de mucosa. A lâmina fluida que recobre a mucosa tem uma espessura de 5 a 10 μm e é constituída por duas camadas distintas: a mais profunda mede cerca de 4 a 8 μm de espessura e é mais líquida, composta essencialmente de uma solução eletrolítica que contém poucos mucopolissacarídeos, denominada camada SOL. A camada GEL mede 1 a 2 μm de espessura e flutua sobre a camada SOL; sua superfície viscosa permite o aprisionamento de partículas inaladas que vençam a barreira das vias aéreas superiores. Os cílios movimentam-se livremente na camada SOL, e suas pontas atingem a onda metacronal, que emerge na camada GEL, impulsionando-a em direção a traquéia. Graças ao perfeito equilíbrio dessa relação dinâmica, a camada GEL é mantida em constante movimento, o que depende da atividade ciliar coordenada. As vias aéreas devem estar patentes e com umidade adequada, para evitar que a secreção se torne espessa, o que reduz a depuração mucociliar.

Diversas patologias do aparelho respiratório podem causar comprometimento da produção e do transporte do muco, perda da sincronização do movimento ciliar, perda da homogeneidade do transporte do muco e conseqüente retenção de secreções brônquicas, favorecendo a perpetuação de processos infecciosos pulmonares.

Os mucolíticos e expectorantes são drogas que alteram as características físicas do escarro, facilitando a sua expectoração. Podem ser divididas em quatro classes: 1) promotores do transporte do muco; 2) indutores da secreção reflexa; 3) estimuladores da atividade secretora das células mucosa e

glândulas submucosas; 4) modificadores das características físico-químicas das secreções.

Dentre a classe dos modificadores das características físico-químicas das secreções, a droga mais conhecida e mais aceita é N-acetilcisteína².

1.2. N-acetilcisteína

1.2.1. Aspectos Gerais

A N-acetilcisteína (FIGURA 1.1) (L- α -acetamido- β -ácido mercaptopropiônico) é um pó cristalino branco, tendo leve odor acético. É facilmente solúvel em água e em álcool; praticamente insolúvel em clorofórmio e éter. Foi introduzida no mercado na década de sessenta e foi o primeiro agente chamado como mucolítico³.

A N-acetilcisteína é um agente redutor, sendo degradada por agentes oxidantes. No laboratório, é mais eficaz em pH entre 7 e 9, onde é capaz de promover mucólise em poucos minutos.

N-acetilcisteína é o precursor acetilado dos aminoácidos L-cisteína e glutathiona reduzida (GSH). Historicamente, a N-acetilcisteína tem sido usada como um agente mucolítico em doenças respiratórias crônicas e também como um antídoto para intoxicação por paracetamol. Recentemente, estudos em animais e humanos têm mostrado ser a N-acetilcisteína um poderoso antioxidante e um agente terapêutico potente no tratamento do câncer, doenças do coração, infecção com o vírus do HIV, intoxicação com metais pesados, e outras doenças caracterizadas por radicais livres. N-acetilcisteína tem-se mostrado eficaz também no tratamento da síndrome de Sjogren, gripes, hepatite C e nos males causados pelo hábito de fumar⁴.

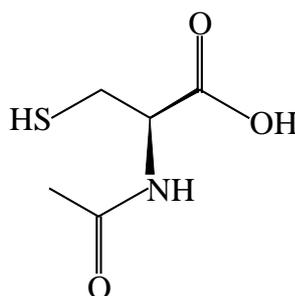


FIGURA 1.1 Estrutura molecular da N-acetilcisteína

1.2.2. Propriedades Farmacológicas

1.2.2.1. Mecanismo de Ação^{5,6}

N-acetilcisteína tem a habilidade de reduzir extracelularmente cistina para cisteína e agir intracelularmente como fontes de grupos sulfídrilas. Como fonte de grupo sulfídrilasm, a N-acetilcisteína estimula a síntese de glutationa (GSH), aumenta a atividade da glutationa S transferase, promove a desintoxicação do fígado e é um poderoso antioxidante capaz de reduzir drasticamente os radicais livres no organismo. N-acetilcisteína é um agente mucolítico capaz de romper as ligações ou pontes de dissulfetos das mucoproteínas, transformando-as em partículas menores e diminuindo a viscosidade das mesmas, facilitando a sua eliminação.

N-acetilcisteína também age como um expectorante pela estimulação da ação ciliar e do reflexo vagal gastro-pulmonar. Estudo tem mostrado que a N-acetilcisteína pode ser usada por pessoas que possuem doenças do coração por diminuir o nível de homocisteína e de lipoproteína.

1.2.2.2. Farmacocinética⁷

N-acetilcisteína é um composto que contem um grupo sulfidrilas que é rapidamente absorvida em vários tecidos do organismo quando administrada por via oral, é desacetilada e metabolizada no intestino e no fígado. Níveis de N-

acetilcisteína ocorrem aproximadamente uma hora após a dose oral e doze horas depois de ser administrada não é mais detectada no plasma

Não deve ser associada a tetraciclina, ampicilina, eritromicina, anfotericina ou lipídeo, uma vez que reagem com N-acetilcisteína, produzindo precipitação⁸.

1.2.3. Indicações Clínicas

1.2.3.1. Doenças Respiratórias^{9,10}

Estudos em animais e humanos tem investigado a N-acetilcisteína como um agente terapêutico para vários tipos de doenças respiratórias. Entre os diversos resultados obtidos pela administração de N-acetilcisteína foram a diminuição da dificuldade de expectoração, abrandamento de tosse fortes e a melhora da saúde de pessoas com fadiga do diafragma. Foi realizado um estudo com dezoito pacientes que tinham fibrose alveolar, que é caracterizada por um stress oxidativo e diminuição do nível de glutathione. N-acetilcisteína foi administrada em doses de 600 mg três vezes ao dia durante um período de doze semanas. Ao final do tratamento, houve uma melhora significativa da capacidade pulmonar e do nível de glutathione no organismo do grupo de pessoas estudadas.

1.2.3.2. Câncer^{11,12}

Pesquisas têm mostrado que a N-acetilcisteína pode ser usada como um agente quimiopreventivo e no tratamento de certos tipos de câncer, incluindo pele, garganta, pulmão e fígado. Estudos *In vitro* têm demonstrado que a N-acetilcisteína pode ser empregada como antimutagênico e como anticarcinogênico.

1.2.3.3. Intoxicação por Paracetamol^{13,14}

A N-acetilcisteína é considerada a droga de escolha para o tratamento de intoxicações pelo paracetamol, na dose inicial de 140 mg/kg diluídos em soluções a 5% m/v, seguidos por 70 mg/kg cada quatro horas, num total de 18 doses, por via oral. Resultados bastante eficazes têm sido obtidos quando a N-acetilcisteína é

administrada dentro de 10 horas de ocorrida a intoxicação e pouco eficaz após 16 horas do acidente tóxico. Tratamento após 24 horas do acidente tóxico utilizando a N-acetilcisteína não é recomendado.

1.2.3.4. Doenças Cardíacas

Diversos estudos têm demonstrado que a N-acetilcisteína pode ser utilizada como um agente terapêutico no tratamento de doenças cardíacas. Wiklund *et al.*¹⁵ demonstraram que a N-acetilcisteína reduz o nível de homocisteína em 45 %, enquanto Gavish *et al.*¹⁶ demonstraram que N-acetilcisteína, quando administrada de 2 a 4 gramas diariamente, durante um período de oito semanas, foi capaz de reduzir em 70% o nível de lipoproteína. N-acetilcisteína pode ser usada também no tratamento de isquemia e no infarte agudo do miocárdio.

1.2.3.5. Toxicologia¹⁷

O fármaco é relativamente livre de efeitos sistêmicos importantes, não tendo sido demonstrado efeito tóxico mesmo em indivíduos com hepatopatias. As reações adversas são mais freqüentes com soluções mais concentradas. O medicamento pode produzir uma sensação de queimação traqueal e seu sabor e odor sulfuroso pode provocar náuseas e anorexia, acompanhadas de eructações e vômitos. Alguns indivíduos podem apresentar tosse com nebulização de N-acetilcisteína, necessitando inalar concentrações menores.

Pacientes com hiper-reatividade brônquica podem apresentar broncoespasmo. Outro efeito para qual se deve atentar é a broncorréia abundante, que representa um problema em pacientes incapazes de tossir de maneira eficaz. O uso contínuo do medicamento produz irritação na mucosa oral, resultando em estomatite. Pode provocar rinite, laringite ou traqueíte, ocasionando rinorréia, rouquidão ou hemoptise importantes. Não tem sido observada irritação da pele ou dos olhos. Os pacientes devem ser orientados a lavar o rosto, os olhos e a boca após a nebulização.

1.2.4. Métodos para Determinação de N-acetilcisteína

1.2.4.1. Espectrofotometria no UV – visível

Há poucos procedimentos espectrofotométricos relatados na literatura para a determinação de N-acetilcisteína. Alguns desses procedimentos utilizam técnicas de derivatização a partir de espectros na região UV ($\lambda < 400 \text{ nm}$)¹⁸⁻²⁰. Esses métodos são relativamente sensíveis, porém existe a dificuldade de se trabalhar com amostras que já possuem alguma coloração, necessitando de um tratamento da amostra antes da medida espectrofotométrica. Já os métodos espectrofotométricos na região UV-visível empregados na determinação de N-acetilcisteína, envolvem reações de oxidação do grupo tiol que podem ser obtidas com bromo²¹ e ferro (III)²².

Raggi *et al.*²² determinaram N-acetilcisteína por espectrofotometria. O método consistia na reação de oxidação da N-acetilcisteína com o ferro (III) na presença de 1,10-ortofenantrolina. O ferro (II) resultante da reação redox foi quantitativamente e rapidamente convertido em um complexo estável, o (tris (1,10-fenantrolina) ferro (II)), que foi medido espectrofotometricamente em 515 nm após 20 minutos de reação. O procedimento apresentou uma resposta linear no intervalo de concentração de N-acetilcisteína de $4,5 \times 10^{-6}$ a $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, mostrando-se sensível na determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas.

Sánchez-Pedreño *et al.*²³ propuseram um procedimento em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas. Esse procedimento foi baseado na formação de um complexo amarelo estável entre a N-acetilcisteína e o paládio (II) em meio de HCl 1 mol L^{-1} , e o produto da reação foi monitorado em 385 nm. Os parâmetros selecionados do sistema FIA foram: volume da alça de amostragem de $70 \mu\text{L}$, bobina reacional de 3 m e vazão do fluxo carregador de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de N-acetilcisteína entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e a frequência de amostragem de 45 h^{-1} .

Alvarez-Coque *et al.*²⁴ descreveram um procedimento para determinação de N-acetilcisteína com detecção espectrofotométrica, baseado na reação de derivatização entre a N-acetilcisteína com o-ftalaldeído e isoleucina em pH 9,5, sendo o produto da reação monitorado espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 335 nm. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de N-acetilcisteína entre $5,0 \times 10^{-7}$ e $4,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, limite de

detecção de $9,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e desvio padrão relativo para uma concentração de $1,26 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 0,3%.

1.2.4.2. Métodos Eletroquímicos

São poucos os procedimentos eletroquímicos utilizados para a quantificação de N-acetilcisteína em produtos farmacêuticos encontrados na literatura.

Stradiotto *et al.*²⁵ incorporaram em um eletrodo de pasta de grafite nitroprussiato de ferro (Fe(II)NP), sendo os estudos eletroquímicos realizados empregando a técnica de voltametria cíclica. O voltamograma cíclico de Fe(II)NP exibiu dois pares redox com potencial formal $(E^{\circ})_1 = 0,24$ e $(E^{\circ})_2 = 0,85 \text{ V vs. SCE}$ atribuídos a Fe(II)/Fe(III) e Fe(II)(CN)₅NO / Fe(III)(CN)₅NO, respectivamente. O par redox com $(E^{\circ})_2 = 0,85 \text{ V}$ apresentou uma resposta eletrocatalítica para os compostos sulfidrílicos; L-cisteína e N-acetilcisteína. A oxidação eletrocatalítica dos compostos sulfidrílicos pelo mediador foi empregada para a determinação de L-cisteína e N-acetilcisteína. O eletrodo de pasta de grafite modificado para a determinação de L-cisteína e N-acetilcisteína apresentou uma linearidade de $9,2 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-2}$ e $9,6 \times 10^{-4}$ a $1,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e desvios padrão relativos de ± 5 e 4% (n=3) e sensibilidade amperométrica de 0,024 e 0,027 $\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção potenciométrica foi proposto por Kolar *et al.*²⁶ Esses pesquisadores imergiram um fio de prata em uma solução contendo cloreto de mercúrio (II), em seguida o eletrodo foi posto em uma solução de iodeto. Este pré-tratamento químico da superfície do eletrodo serviu para formar uma fina camada de iodeto de prata, que o transformou em um eletrodo íon-seletível para iodeto. O eletrodo foi usado como um sensor potenciométrico para determinação indireta de N-acetilcisteína em um fluxo carregador contendo iodo a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de N-acetilcisteína entre $1,0 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e inclinação de $64,8 \pm 1,0 \text{ mV/p(N-acetilcisteína)}$, com um coeficiente de correlação de $R = 0,998$ e frequência de amostragem de 25 h^{-1} .

1.2.4.3. Métodos Fluorimétricos

Al-Ghannam *et al.*²⁷ propuseram um método sensível para determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas. O método baseou-se na oxidação da N-acetilcisteína com ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico, em pH 6, formando o 1,2-ácido-dihidroxinaftaleno-4-sulfônico, que possui intensidade fluorescente máxima em 318/480 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$). O procedimento mostrou uma linearidade na faixa de concentração de $3,0 \times 10^{-6}$ a $2,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, limite de detecção de $3,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e duas determinações por hora.

1.2.4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Tsay *et al.*²⁸ desenvolveram um procedimento para determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando CLAE. Nesse procedimento foram empregadas uma coluna ODS e uma fase móvel isocrática de acetonitrila, metanol e tampão ácido hexanosulfônico de sódio (pH 2,7), vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção no UV em 220 nm. Metionina foi usada como padrão interno. O procedimento apresentou uma linearidade na faixa de concentração de 0,05 a 3,0 mg mL⁻¹. Para adições de 20 a 375 mg de N-acetilcisteína, os índices de recuperação variaram de 98,8 a 99,1%, com desvios padrões relativos variando de 0,02 a 0,09%.

1.2.4.5. Métodos Quimiluminescentes

Lu *et al.*²⁹ desenvolveram um procedimento de análise por injeção em fluxo para determinação de N-acetilcisteína baseado no aumento da intensidade de quimiluminescência a partir do sistema luminol-H₂O₂ em meio alcalino. O luminol em meio alcalino coalescia com o peróxido, ambos a uma vazão de 2,0 mL min⁻¹, e através de uma válvula de seis vias equipada com uma alça de amostragem de 40 µL a mistura era injetada em um fluxo contendo N-acetilcisteína produzindo a radiação quimiluminescente em uma cela de fluxo de 15 cm em forma de espiral. Uma fotomultiplicadora foi posicionada próxima à cela de fluxo para receber a radiação quimiluminescente. O procedimento apresentou uma linearidade na faixa

de concentração de $2,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, limite de detecção de $7,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e um desvio padrão relativo para uma concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ g mL⁻¹ de 2%.

1.2.4.6. Farmacopéias

A Farmacopéia Americana³⁰ preconiza a cromatografia líquida de alta eficiência empregando uma solução de bissulfito de sódio como padrão interno para a determinação quantitativa de N-acetilcisteína com detecção em 214 nm, enquanto a Farmacopéia Brasileira³¹ recomenda a titulação potenciométrica empregando nitrato de mercúrio como titulante, fio de ouro como eletrodo indicador e calomelano como eletrodo de referência.

1.3. Justificativa e Objetivos

Poucos procedimentos são descritos na literatura para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas. A determinação desse tiól em fluídos biológicos geralmente requer o uso de métodos extremamente sensíveis devido à pequena quantidade do analítico encontrada na matriz. Já a determinação destes compostos em formulações farmacêuticas não requer tanta sensibilidade, sendo mais importante o desenvolvimento de procedimentos simples, rápidos e facilmente aplicados em laboratórios de rotina.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de procedimentos analíticos em fluxo para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas com detecção turbidimétrica e espectrofotométrica, além de um procedimento voltamétrico empregando eletrodo de pasta de carbono modificado (EPCM) com hexacianoferrato de cobre (II) e outro procedimento envolvendo titulação potenciométrica empregando nitrato de prata como titulante.

CAPÍTULO II – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO II – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

2.1.1. Abordagem Histórica

A crescente necessidade de automação de procedimentos analíticos se deve ao aumento significativo do número de amostras laboratoriais a serem analisadas, por exemplo, nas áreas clínicas e ambientais, e à demanda por técnicas rápidas e confiáveis operando 24 horas por dia, freqüentemente requeridas para controle de processos industriais. Apesar dos esforços para desenvolver sensores seletivos e sensíveis para determinar diretamente a concentração de um analito em uma amostra a grande variedade dos analitos e a complexidade dos produtos a serem analisados tornam altamente improvável que sensores para a maioria dos compostos de interesse se tornem disponíveis em um futuro próximo. Desta forma, separação e/ou conversão química permanecem como etapas essenciais na maioria dos procedimentos de análise quantitativa. Nestes casos, a automação dos procedimentos analíticos implica na automação do processamento das amostras. Como a maioria das separações e conversões químicas é normalmente conduzida em fase líquida, o conceito lógico e engenhoso de Skeggs^{32,33}, possibilitou a execução dos processos analíticos em um fluxo que transporta a alíquota de amostra do ponto de introdução até a unidade de detecção. Esta abordagem tem sido denominada como CFA, Análise em Fluxo Contínuo (segmentado).

Durante aproximadamente vinte anos, foi aceito que a segmentação, dividindo o fluxo em compartimentos pequenos, regulares e separados por bolhas de ar, era a melhor estratégia para se evitar o alargamento de uma zona discreta do analito (freqüentemente denominada de *dispersão da amostra*) no percurso, desde o ponto de sua introdução até o detector.

Em analogia ao seu uso na área de tecnologia de processos, onde o transporte sem alargamento da zona é denominado de *fluxo em pluguea*, a zona da amostra é freqüentemente denotada como *plugue*. Apesar de algumas publicações ao final dos anos sessenta e início dos anos setenta já abordarem procedimentos nos quais a segmentação não era aplicada, somente a partir da metade da década

de setenta é que foi amplamente aceito que a segmentação podia ser omitida, utilizando-se sistemas em fluxo com dimensões e vazões adequadas, simplificando-se assim o sistema analítico e aumentando-se o número de amostras que poderiam ser analisadas por unidade de tempo (freqüentemente denominado de *freqüência de amostragem*). Esta abordagem tornou-se conhecida como Análise por Injeção em Fluxo (FIA)³².

O termo “análise por injeção em fluxo” assim como o uso da sigla “FIA” foi utilizado pela primeira vez em 1975 por RUZICKA e HANSEN³⁴ sendo estes considerados os verdadeiros pioneiros desta técnica. Nesse trabalho, foram discutidos os conceitos de analisadores utilizando um fluxo contínuo não segmentado como um suplemento aos analisadores com fluxo segmentado. Com a proposta do conceito FIA, demonstrou-se que a ausência de bolhas de ar não somente levava a um sistema mais simples como também expandia as potencialidades da técnica.

A partir de 1977, e até hoje, vem ocorrendo um desenvolvimento muito rápido da metodologia FIA em muitos países, assim, o número de pessoas que utilizam esse processo como ferramenta de trabalho e de pesquisa vem aumentando ao longo do tempo. Conseqüentemente, novos conceitos são introduzidos e cada vez mais registros de emprego da técnica são relatados na literatura.

Os primeiros trabalhos aplicando os conceitos discutidos por RUZICKA e HANSEN surgiram no Brasil, em 1976, em virtude de uma parceria entre a Agência Internacional de Energia Atômica de Viena e o Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo, que possibilitou a permanência de RUZICKA no Brasil por um ano e meio, onde em conjunto com pesquisadores da seção de química analítica, instalou o primeiro sistema FIA utilizado para análises rotineiras de nitrogênio e fósforo total em plantas e de cloreto em águas naturais³⁵.

2.1.2. Princípios Fundamentais³⁵

No processo de análise por injeção em fluxo, alíquotas de amostra (e eventualmente de reagentes) são inseridas em uma solução, que as transportada através do percurso analítico. No decorrer do processo, a amostra sofre dispersão na solução transportadora, produzindo uma *zona de amostra* caracterizada pela existência de gradientes de concentração. Caso necessário, reações químicas podem ocorrer durante o transporte da zona de amostra em direção ao sistema de

detecção. Em função da existência dos gradientes de concentração e da medida ser feita com a zona de amostra em movimento em relação ao sistema de detecção, obtém-se um sinal transiente, cuja altura pode ser relacionada à concentração inicial da espécie de interesse.

2.1.3. Constituição

A análise por injeção em fluxo é uma metodologia que permite automatizar a manipulação de soluções, visando economizar tempo, minimizar o consumo de reagentes e amostras, diminuir ou eliminar contaminação da amostra e/ou analista durante a operação, minimizar a instabilidade de produtos e/ou reagentes, aumentar a precisão e diminuir o custo operacional. Além disso, é caracterizada por alta simplicidade, versatilidade e pode ser implementada com instrumentação de baixo custo em qualquer laboratório analítico³⁵.

Os sistemas FIA são constituídos por uma unidade propulsora de fluídos, de inserção da amostra, de reação/mistura e de detecção (Figura 2.1). Opcionalmente, estas unidades podem ser controladas por uma unidade de controle de aquisição de dados, a qual pode estar acoplada a uma unidade de processamento e arquivo³⁶.

A unidade propulsora na maior parte dos sistemas é constituída de uma bomba peristáltica. Outras formas de propulsão incluem as bombas tipo seringa de pistão, através de pressão por gases e mesmo por gravidade. Sua função é movimentar constante e uniformemente os reagentes, amostras e fluidos carregadores. Caso se utilize como unidade de propulsão uma bomba peristáltica, a escolha dos tubos de bombeamento é muito importante. Diferentes materiais para os tubos são oferecidos, dependendo do tipo de solvente e concentração das soluções. Tubos de Tygon são adequados para soluções aquosas ácidas ou alcalinas diluídas. Em bombas com velocidade de rotação fixa, os diâmetros internos dos tubos determinam a magnitude da vazão³⁷.

A bomba peristáltica deve possuir torque suficiente para manter a vazão constante, mesmo que ocorram variações na impedância hidrodinâmica do sistema³⁵. A impedância hidrodinâmica aumenta com o comprimento do percurso analítico, com a viscosidade das soluções e com a diminuição do diâmetro interno da tubulação.

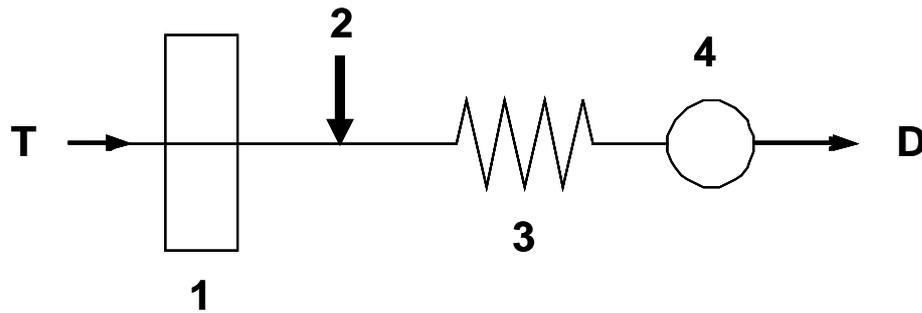


Figura 2.1. Representação esquemática de um sistema FIA simples de linha única. Onde: **T** é a solução transportadora; **1**, unidade de propulsão; **2**, unidade de comutação; **3**, unidade de reação; **4**, unidade de detecção e **D**, descarte.

O injetor é um dispositivo fundamental do sistema de análise por injeção em fluxo, serve para introduzir um volume discreto e reproduzível de uma amostra no percurso analítico. A seleção e a inserção de alíquotas pode ser feita empregando-se diversos dispositivos³⁸, entre os quais destaca-se o injetor proporcional devido à simplicidade e versatilidade³⁶. Esse injetor é constituído por três peças de acrílico, sendo duas fixas e uma central móvel, que por meio de movimentos para frente e para trás, ou vice-versa, o injetor coleta a amostra e a insere no percurso analítico.

O percurso analítico é a unidade do sistema FIA onde ocorrem as etapas de reação e/ou mistura. O dimensionamento do percurso deve se levar em conta, o tempo de residência da amostra e, portanto, as vazões do transportador e dos reagentes, que estão intimamente ligados à frequência de amostragem. O aumento do percurso analítico implica na diminuição do sinal analítico, o que ocorre devido ao processo de dispersão da zona da amostra. O processo de dispersão da amostra, intrínseco aos sistemas de análise por injeção em fluxo, é dependente das características físico-químicas das soluções (e.g. viscosidade), bem como das dimensões dos componentes do sistema (volume da alça de amostragem; material, diâmetro e comprimento dos tubos que constituem o percurso analítico)⁴⁰.

Usualmente, as medidas são efetuadas com esses parâmetros mantidos constantes, permitindo a obtenção de resultados caracterizados por alta repetibilidade. As vazões, volumes do percurso analítico e da amostra devem ser definidos considerando-se a dispersão e o tempo de residência necessário para a ocorrência das reações químicas⁴⁰.

A unidade de detecção deve possuir baixa histerese, alta repetibilidade e reprodutibilidade dos sinais. De acordo com a espécie a ser quantificada, tem sido

empregadas, praticamente, todas as técnicas usuais em química analítica: espectrofotometria de ultravioleta-vísivel, absorção e emissão atômica, potenciometria, amperometria, entre outros⁴¹.

2.1.4 Configurações Elementares

As configurações de sistemas FIA mais elementares são os sistemas de linha única, sistemas em confluência e sistemas com zonas coalescentes (FIGURA 2.2). Os sistemas FIA também podem ser ainda projetados a partir de implementações de outras variáveis nos sistemas elementares. Exemplos dessas implementações são os sistemas com fluxos alternativos, fluxos intermitentes, aprisionamento de zona de amostra, amostragem na zona de amostra, etc⁴².

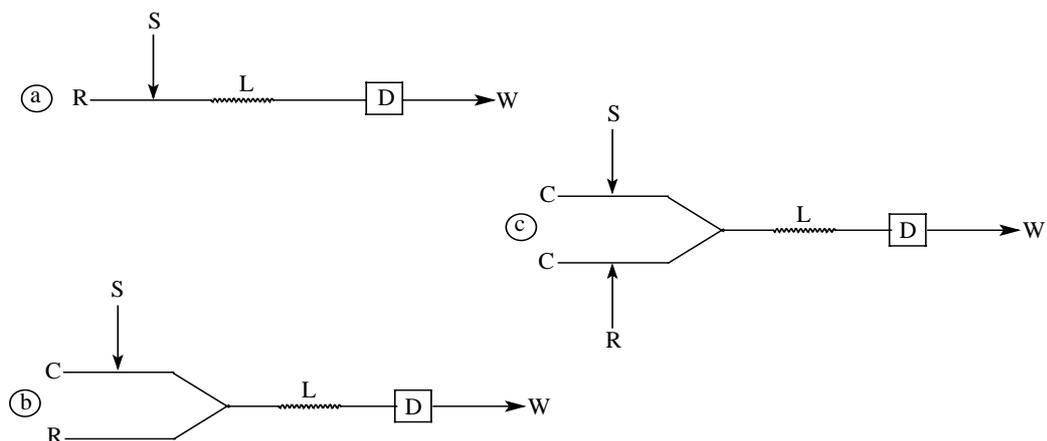


FIGURA 2.2 Configurações elementares de sistemas FIA. (a) sistema linha única, (b) sistema em confluência e (c) sistema com zonas coalescentes. R, reagente; S, amostra; L, bobina reacional; C, carregador; D, detector e W, descarte⁴².

2.1.4.1. Sistema em Linha Única

É o sistema mais simples (FIGURA 2.2a), o qual não apresenta pontos de confluência no percurso analítico, conforme a proposta original de 1975. O fluido carregador, é em geral, uma solução quimicamente inerte, cuja função principal é transportar a amostra injetada até a unidade de detecção, promovendo dispersão controlada da amostra e posteriormente lavando o percurso analítico. Eventualmente, o fluido carregador pode ser uma solução reagente, o qual reage

com a amostra devido ao fenômeno de dispersão. Entretanto, nessa situação o reagente não é idealmente utilizado.

Sistemas de linha única são freqüentemente empregados em conexão com espectrometria de absorção atômica, potenciometria, métodos que não requerem adição de reagentes ou naqueles envolvendo alta diluição da amostra⁴².

2.1.4.2. Sistema em Confluência

Nos sistemas por confluência a amostra é injetada em um fluido carregador quimicamente inerte, o qual apresenta características matriciais semelhantes à amostra. A adição de reagentes ocorre via pontos de confluência (FIGURA 2.2b)⁴².

As limitações dos sistemas em linha única foram resolvidas, adotando-se a adição do reagente por confluência. O reagente adicionado por confluência, logo após o injetor, permite que cada fração da amostra receba a mesma quantidade de reagente.

A partir da confluência somam-se as vazões do carregador e do reagente, então a amostra é distribuída em um espaço maior que o ocupado anteriormente, o que corresponde a uma diluição. Neste caso, a amostra ocupa uma maior fração do percurso analítico, o que é equivalente ao emprego de uma alça de amostragem mais longa, e isso aumenta a dispersão. É conveniente que se conheça em que extensão a vazão confluyente afeta a magnitude da medida.

2.1.4.3. Sistema com Zonas Coalescentes

Nestes sistemas, tanto a amostra como o reagente são introduzidos simultaneamente, com sua interação ocorrendo por um ponto de confluência dos respectivos fluidos carregadores (FIGURA 2.2c)⁴².

O emprego de zonas coalescentes leva a uma economia significativa de reagentes, em comparação com os sistemas em linha única e por confluência, uma vez que o reagente somente é consumido em presença da amostra, sendo recuperado durante a lavagem do percurso analítico pelos fluidos carregadores. Zonas coalescentes têm sido utilizadas ainda, visando: maior estabilidade da linha

base com conseqüente melhoria na precisão da medida, determinações simultâneas, utilizando um único módulo de análise, preparação em linha de reagentes instáveis, mecanização do método das adições de padrão, facilidade em estudos de interferência sem a necessidade de se preparar um número excessivo de soluções padrão mistas, determinação de altas concentrações de espécies químicas sem pré-diluição de amostras³⁵.

2.2. Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM)

2.2.1. Abordagem Histórica

Até a metade da década de 70, os eletrodos utilizados na química analítica, bem como em outras áreas, eram os eletrodos convencionais como ouro, platina, mercúrio e carbono, porém esses eletrodos apresentavam alguns problemas que reduziam sua aplicação tanto em Química Analítica quanto em outras áreas. As principais desvantagens desses eletrodos eram o fenômeno da adsorção ou precipitação do analito na superfície do eletrodo; a baixa velocidade de algumas reações eletroquímicas exibidas por algumas espécies, que exigiam uma sobretensão para que a reação ocorresse; e o alto custo desses materiais nobres para aplicação prática em longa escala. Verificou-se, posteriormente, que essas desvantagens poderiam ser controladas, manipulando-se a natureza físico-química da interfase eletrodo-solução como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base^{43,44}, favorecendo assim, o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados para vários fins e aplicações, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas⁴⁵ até a transferência de elétrons em moléculas de interesse⁴⁶.

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi inicialmente utilizado na eletroquímica por MURRAY *et al.*⁴⁷ em 1975. A partir de então, o EQM tem recebido especial atenção, devido às suas características, como: seletividade e a possibilidade de monitorar em tempo real o analito de interesse sem o prévio tratamento da amostra. Desta forma, os EQM encontram aplicações nas mais variadas áreas de atuação, como por exemplo, na saúde pública⁴⁸, onde sensores *in vivo* podem ser usados na detecção de drogas em situação de emergência. Além disso, esses sensores possuem baixo tempo de resposta e alta sensibilidade e seletividade, requisitos importantes em hospitais⁴⁹. Os sensores, assim como os

biossensores, também encontram vasta aplicação nas indústrias de alimentos⁵⁰ e bioprocessos, onde o monitoramento em tempo real é muito valioso, ou ainda em aplicações ambientais onde, tanto a indústria quanto os órgãos de vigilância ambiental, necessitam de sensores para análise quantitativa de inúmeras substâncias tóxicas e/ou poluentes que são despejados pelas indústrias. Além da eletroanálise, que tem se destacado como uma das áreas mais ativas neste campo, os EQMs tem sido utilizados para outros fins não analíticos, incluindo estudos básicos de eletrocatalise, cinética de transferência de elétrons, síntese eletroorgânica e fotoeletroquímica.

2.2.2 Eletrodo de Pasta de Carbono (EPC)

2.2.2.1 Abordagem Histórica

O primeiro eletrodo de pasta de carbono (EPC) foi desenvolvido por ADAMS⁵¹ em 1958, na tentativa de preparar um eletrodo gotejante de pasta de carbono (1g carbono/7mL tribromometano) renovável para ser usado em uma ampla faixa de potenciais positivos onde o eletrodo de mercúrio metálico não é aplicável devido à sua oxidação. Contudo, não foi possível desenvolver esse eletrodo, devido à alta resistência elétrica causada pelo componente líquido orgânico (aglutinante) utilizado na preparação.

Entre 1960 e o início de 1970, os EPC eram extensivamente aplicados para estudos eletroquímicos sobre as propriedades redoxes de inúmeros compostos orgânicos. Alguns estudos teóricos e experimentais realizados nesse período contribuíram para melhor entender a estrutura complexa da pasta de carbono com respeito a seus constituintes, isto é, o pó de grafite e o aglutinante^{52,53}.

Durante esse período, em 1964, KUWANA & FRENCH⁵⁴ investigaram os comportamentos eletroquímicos de alguns compostos orgânicos e em algumas preparações da pasta de carbono, eles utilizaram como solvente o próprio composto orgânico como aglutinante, demonstrando que a pasta de carbono poderia, também, conter outros constituintes. Ademais, verificaram que essa modificação proporcionava ao eletrodo características eletroquímicas do material usado na composição da pasta. Esse trabalho desenvolvido pode ser considerado o pioneiro na contribuição no desenvolvimento dos eletrodos de pasta de carbono

quimicamente modificados (EPCMs). Além disso, estes pesquisadores observaram que as correntes de pico dos voltamogramas obtidas com os eletrodos modificados variavam proporcionalmente com a concentração do modificador adicionado na pasta.

Conseqüentemente, diversos trabalhos foram propostos de modificação da pasta de carbono para estudos eletroquímicos^{55,56}.

O eletrodo de pasta de carbono é uma mistura de grafite em pó e um líquido orgânico que é imiscível em contato com soluções aquosas. O pó de grafite deve ter alta pureza química, baixa capacidade de adsorção de oxigênio e impurezas eletroativas contidas na solução, além de apresentar uma distribuição granulométrica uniforme. A superfície dos eletrodos de pasta de carbono é muito complexa, com muitas possibilidades de interações. O líquido orgânico denominado aglutinante, serve para fixar a pasta ao eletrodo, preencher as cavidades entre as partículas de grafite e “isolar” o mesmo do contato com soluções aquosas. Deve ser ainda eletroinativo, possuir baixa volatilidade e não conter impurezas^{57,58}.

Uma das mais importantes vantagens do eletrodo de pasta de carbono sobre todos os outros eletrodos sólidos está no preparo de forma simples e rápida e na possibilidade de renovação da superfície do eletrodo a cada medida, se necessário. Isso é extremamente importante na análise de compostos onde os produtos da reação são adsorvidos na superfície do eletrodo, diminuindo o seu tempo de vida. Outra importante propriedade é a baixa corrente residual, que é menor que nos eletrodos de grafite pirolítico e de carbono vítreo.

Em comparação com outros eletrodos a base de grafite, o eletrodo de pasta de carbono possui uma maior superfície ativa para as mesmas dimensões geométricas e, deste modo, exibe uma maior absorvidade das substâncias em sua superfície, tornando-o mais sensível⁵⁹.

2.3. Métodos de Análise

2.3.1. Espectrofotometria no UV-vísivel⁶⁰

A luz tem radiações eletromagnéticas para as quais a vista é sensível, a luz branca é composta por todos os comprimentos de onda do espectro visível que abrange um intervalo de 400 a 760 nm. Comprimentos de onda diferentes provocam

cores diferentes. A percepção visual das cores é provocada pela absorção seletiva, por um objeto que absorve certos comprimentos de onda da luz incidente. Outros comprimentos de onda ou são refletidos ou transmitidos, de acordo com a natureza do objeto, e são percebidos pela vista humana como a cor do objeto. A TABELA 2.1 apresenta os comprimentos de onda aproximados para as cores no espectro na região do visível.

TABELA 2.1 Comprimento de onda aproximado das cores.

Violeta	400 – 450 nm
Azul	450 – 500 nm
Verde	500 – 570 nm
Amarelo	570 – 590 nm
Alaranjado	590 – 620 nm
Vermelho	620 – 760 nm
Infravermelho	> 760

A variação da intensidade da cor de um sistema com a modificação da concentração de um certo componente constitui a base da análise espectrofotométrica. A cor é provocada pela formação de um cromóforo, resultante da adição de um reagente apropriado ou pode ser propriedade intrínseca do analito. A intensidade da cor pode ser comparada com a que se obtém pelo tratamento idêntico de uma quantidade conhecida da substância.

A equação fundamental (EQUAÇÃO 2.1) que rege a espectrofotometria é a Lei de Lambert-Beer. Lambert-Beer estudaram o efeito da concentração do cromóforo numa solução, sobre a transmissão ou absorção da luz e descobriram que a intensidade de um feixe de luz monocromática diminui exponencialmente com a concentração da substância que absorve a luz. Ou seja:

$$A = \log I_0 / I_t = \epsilon b c \quad (2.1)$$

Onde **A** é a absorbância, I_0 é a luz incidente, I_t é a luz transmitida, ϵ é o coeficiente da absorvidade molar ($L \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), **b**, o caminho óptico (cm) e **c** a concentração

do cromóforo (mol L^{-1}). Como o coeficiente de absorvidade molar é um valor intrínseco da substância e, portanto constante, o mesmo ocorrendo para o caminho óptico, a absorbância medida deve ser proporcional à concentração de uma espécie de interesse, obtendo-se assim uma dependência linear entre as duas variáveis, onde o coeficiente angular da reta é o produto ϵb .

2.4. Voltametria Linear⁶¹

A voltametria linear é uma das técnicas eletroquímicas em que se estuda a relação potencial-corrente em uma célula eletrolítica apropriada, submetida a uma varredura de potencial linear. A célula voltamétrica é constituída por três eletrodos: um eletrodo de trabalho (eletrodo polarizável), um eletrodo de referência (Ag/AgCl ou eletrodo de calomelano) e um eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo (fio ou placa de platina). Esses eletrodos se encontram imersos em uma solução da espécie eletroativa de interesse (analito) contendo um excesso de um eletrólito inerte (eletrólito suporte) responsável por diminuir a resistência da solução e garantir o controle difusional das espécies. Esses três eletrodos são conectados a um potenciostato que aplica potenciais num intervalo pré-definido e fornece o sinal de corrente.

O sinal de corrente registrado dá origem ao voltamograma que se trata de uma curva potencial vs. corrente. Um estudo do voltamograma pode fornecer informações do comportamento eletroquímico da espécie em estudo. Para um sistema reversível, tem-se algumas informações tais como:

- A corrente de pico é proporcional à concentração da espécie oxidada ou reduzida: $I_p \propto C^*$.
- A corrente de pico é proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura: $I_p \propto v^{1/2}$.
- O potencial de pico independe da velocidade de varredura.

A variação da velocidade de varredura no perfil do voltamograma é comumente estudada para se obter parâmetros cinéticos e de reversibilidade do

sistema eletroquímico, como também determinar o processo pelo qual as espécies chegam à superfície do eletrodo (adsorção e difusão) e na identificação de reações químicas homogêneas acopladas.

2.5 Potenciometria^{62,63}

A potenciometria é uma técnica eletroanalítica que estuda a relação da força eletromotriz (f.e.m) vs. logaritmo da atividade do analito em uma célula eletroquímica na ausência de corrente apreciável. A célula eletroquímica é composta por um eletrodo indicador e um eletrodo de referência (e.g. eletrodo de Ag/AgCl ou eletrodo de calomelano). O eletrodo indicador pode ser um material inerte (e.g. platina), como também pode ser um eletrodo modificado (e.g. eletrodo de pasta de carbono, eletrodo de membrana de vidro, eletrodo de membrana líquida, entre outros). Estes eletrodos que compõem a célula se encontram imersos em uma solução da espécie de interesse em meio de tampão ou de um eletrólito inerte. Os eletrodos estão ligados a um potenciômetro de alta impedância, que fornece uma diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o eletrodo de referência para cada variação da concentração do analito na solução da célula. O potencial da célula (E_C) é dado como a soma de vários potenciais (Equação 2.2):

$$E_C = E_I + E_P - E_R + E_J \quad (2.2)$$

onde E_I é o potencial do eletrodo indicador; E_P , potencial padrão do eletrodo indicador; E_R , potencial do eletrodo de referência e E_J potencial de junção líquida do eletrodo de referência. Os potenciais E_P , E_R , e E_J são praticamente constantes quando não há variação na temperatura, apenas o potencial do eletrodo indicador depende da solução em estudo. Sendo assim, o potencial da célula a 25°C é uma função da atividade da espécie do analito de acordo com a equação de Nernst (Equação 2.3):

$$E_C = const \pm \frac{59,2}{Z_A} \log a_A \text{ (mV)} \quad (2.3)$$

Onde *const* é o somatório dos potenciais E_P , E_R , e E_J , a_A atividade da espécie em estudo e z_A carga ou valência da espécie em estudo (analito).

Na titulação potenciométrica, a concentração da espécie de interesse é determinada por meio de sucessivas medições do potencial da célula potenciométrica, cada uma delas feita após a adição de um dado volume de uma solução titulante adequada, relacionando-se a seguir esses potenciais com os volumes gastos de solução titulante a fim de se determinar o ponto final da titulação.

As titulações potenciométricas apresentam vantagens sobre as titulações comuns (que utilizam indicadores), como:

- o ponto final da titulação, pode ser determinado com exatidão, mesmo em condições que impeçam o emprego de indicadores coloridos;
- elimina o erro do indicador com relação ao ponto de viragem;
- pode-se utilizar numerosas reações que não poderiam ser utilizadas na titulação convencional, por falta de um indicador adequado;
- pode-se determinar três ou mais espécies em mistura em uma única titulação.

2.6 Turbidimetria⁶⁴

Turbidimetria é um método que se baseia na determinação de um analito de interesse na forma de um composto insolúvel em suspensão. O método depende do espalhamento elástico da luz quando um feixe de luz passa através de uma solução contendo o material particulado em suspensão.

Assim, nos métodos turbidimétricos o decréscimo da intensidade de luz em função da concentração do material particulado em solução é determinado medindo-se a radiação transmitida em uma cela contendo a amostra com o detector posicionado na mesma direção da luz incidente (ângulo de 0°).

A turbidimetria é o método mais indicado quando se trabalha com concentrações elevadas das partículas em suspensão. Nesse caso, um simples espectrofotômetro poderá ser empregado nessas determinações. Na turbidimetria

para que se tenha uma boa reprodutibilidade dos resultados há necessidade de se controlar rigorosamente a granulometria das partículas selecionando-se as concentrações de analito e reagente, velocidade de misturas dessas soluções, concentração de outras espécies ou compostos químicos presentes (especialmente protetores de colóides como gelatina, goma-arábica, dextrinas, glicóis, PVC, álcool polivinílico, etc) e temperatura.

CAPÍTULO III - PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III - PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação

3.1.1. Balança Analítica

Todas as medidas de massa foram realizadas utilizando-se uma balança analítica Mettler, modelo H10 com precisão de $\pm 0,1$ mg.

3.1.2. pHmetro

As medidas de pH das soluções foram realizadas utilizando-se um pHmetro Orion modelo EA 940. As medidas potenciométricas foram realizadas em um pHmetro Micronal B 347.

3.1.3. Eletrodo de Vidro Combinado

As medidas de pH foram realizadas utilizando-se um eletrodo de vidro combinado Analion, modelo V 620, com um eletrodo de referência interno de Ag/AgCl, contendo uma solução de KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.4. Eletrodo de Referência de Ag/AgCl

Todas as medidas potenciométricas neste trabalho foram feitas utilizando um eletrodo de referência de Ag/AgCl Analion, modelo R684, com dupla junção.

3.1.5. Eletrodo Auxiliar

O eletrodo auxiliar (contra-eletrodo) empregado nas medidas voltamétricas foi uma placa de platina de 0,5 cm de largura e 1,0 cm de comprimento fixado em um tubo de vidro contendo um fio de cobre soldado na platina.

3.1.6. Bureta Automática

Nas titulações potenciométricas foi empregada uma bureta automática Schöttt Geräte, modelo T80/20.

3.1.7. Bomba Peristáltica

Para a propulsão das soluções de amostras e reagentes, utilizou-se uma bomba peristáltica ISMATEC (Zurich, Suíça) com 12 canais, modelo IPC-12.

3.1.8. Tubos e Conexões

Foram empregados tubos e conexões de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm para confecção das bobinas reacionais, alças de amostragem e linhas de condução de soluções de referência, amostras e reagentes. Os tubos de propulsão utilizados foram de Tygon com diferentes diâmetros internos.

3.1.9. Injetor Comutador

As amostras e soluções de referência foram introduzidas no sistema em fluxo utilizando-se um injetor comutador manual 2-3-2 construído em acrílico.

3.1.9.1 Registrador

Para registros dos dados obtidos utilizou-se um registrador x-t, de dois canais Cole Parmer (Niles, IL, USA), modelo 1202.0000.

3.2. Medidas Potenciométricas

Todas as medidas potenciométricas foram feitas em uma célula de vidro de 50 mL termostalizada a $25 \pm 1,0$ °C contendo o eletrodo indicador e o eletrodo de referência.

3.3. Medidas Espectrofotométricas

Nos sistemas FIA com detecção espectrofotométrica desenvolvido neste trabalho, utilizou-se um espectrofotômetro de feixe simples Femto, modelo 482 (São Paulo, Brasil) com cela de fluxo construída em vidro (caminho óptico de 1,00 cm).

As medidas dos espectros de absorção molecular foram feitas em um espectrofotômetro com arranjo linear de diodos Hewlett Packard, modelo 8452A, empregando-se uma cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico, acoplado a um microcomputador.

3.4. Medidas Voltamétricas

As medidas voltamétricas foram realizadas em uma célula eletroquímica de 30 mL (FIGURA 3.1) contendo o eletrodo de pasta de carbono modificado (EPCM), o eletrodo de referência (Ag/AgCl) e o eletrodo auxiliar de platina conectados a um Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT-30 (Ecochemie) gerenciado por um programa computacional GPES 4.9.

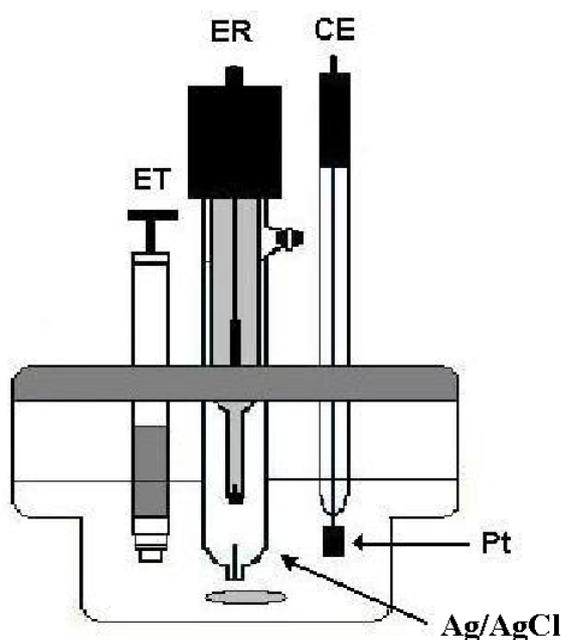


FIGURA 3.1. Representação esquemática de uma célula eletroquímica usada nas medidas voltamétricas. **ET** – eletrodo de trabalho (EPCM); **ER** – eletrodo de referência (Ag/AgCl); **CE** – contra-eletrodo (Pt).

3.5. Determinação Turbidimétrica de N-acetilcisteína com Nitrato de Prata, Empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com Zonas Coalescentes.

3.5.1. Reagentes e Soluções

3.5.1.1 Soluções Estoque

A solução estoque de N-acetilcisteína ($MM = 163,2 \text{ g mol}^{-1}$) 5 mmol L^{-1} foi preparada dissolvendo-se 0,0408g de N-acetilcisteína (Sigma) em 50 mL de água desionizada. Soluções contendo entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ de N-acetilcisteína foram preparadas por diluição da solução estoque em água desionizada em balões volumétricos de 25 mL. Uma alíquota de ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada para obtenção de uma concentração final de HNO_3 de $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de nitrato de prata (Aldrich) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 0,1698g de nitrato de prata em água desionizada em um balão volumétrico de 100 mL. Uma alíquota de ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada para obtenção de uma concentração final de HNO_3 de $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de ácido nítrico (HNO_3) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diluindo-se 35 mL de uma solução 65% v/v desse ácido em 1000 mL de água desionizada.

3.5.1.2. Preparo e Análise das Amostras

Dois amostras comerciais contendo N-acetilcisteína adquiridas no comércio local (40 mg/g por envelope) na forma granulada foram analisadas neste procedimento: (Genérico[®] Granulado – Eurofarma / S.P.) e (Fluimucil[®] Granulado - Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda / S.P.).

Para a análise do Fluimucil, foi pesada uma massa de 5,0g (massa total contida em um envelope). Uma massa desse envelope correspondente a 32,4 mg de N-acetilcisteína foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e adicionou-se água desionizada até completar esse volume. Em seguida, 3 mL dessa solução foram transferidas para um balão volumétrico de 25 mL, 2,5 mL de ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionado e o volume completado com água desionizada. As concentrações obtidas desta maneira estavam dentro da linearidade da curva

analítica do método em fluxo desenvolvido. Alíquotas de 500 μL dessa solução da amostra foram injetadas utilizando um injetor manual.

Para a análise do Genérico foi pesada uma massa de 5,0g (massa total contida em um envelope). Uma massa desse envelope correspondente a 44,6 mg de N-acetilcisteína foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL. Dessa solução transferiu-se uma alíquota de 1 mL para quatro balões de 25 mL. Em seguida, adicionaram-se diferentes alíquotas de solução padrão, 2,5 mL de ácido nítrico 0,5 mol L^{-1} foi adicionado, completou-se o volume com água desionizada. As concentrações obtidas desta maneira estavam dentro da linearidade da curva analítica do método em fluxo desenvolvido. Alíquotas de 500 μL dessa solução da amostra foram injetadas utilizando um injetor manual.

3.5.2. Procedimento Experimental

A FIGURA 3.2. mostra o diagrama esquemático do sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes empregado para determinação de N-acetilcisteína, baseada em sua reação de precipitação com Ag^+ em meio ácido.

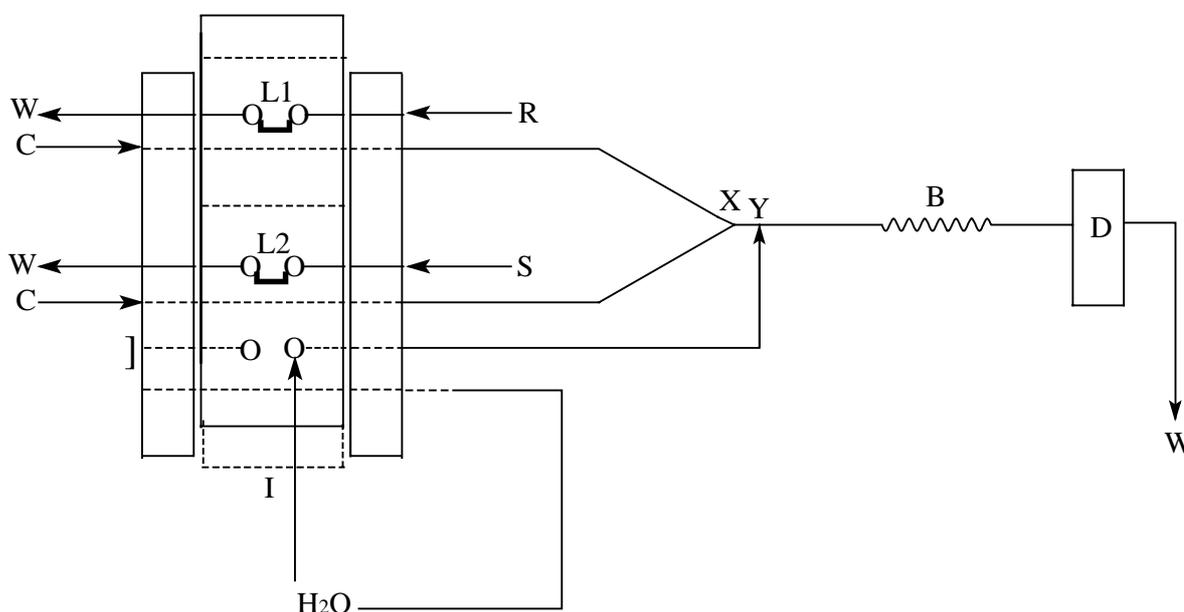


FIGURA 3.2. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação turbidimétrica de N-acetilcisteína. As representações são I, injetor comutador; A, amostra ou solução de referência; R, reagente AgNO_3 ($1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}); L1, alça do reagente (250 μL); L2, alça de amostragem (500 μL); C, solução carregadora HNO_3 ($5,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} ; 1,7 mL min^{-1}); B, bobina reacional (100 cm); X, ponto de coalescência; Y, entrada do fluxo intermitente de água desionizada a vazão de 6,3 mL min^{-1} ; D, espectrofotômetro em 400 nm e W, descarte.

Nesse sistema, quando o injetor está na posição de injeção, a amostra na alça L2 (500 μ L) e o reagente R (AgNO₃ 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹) na alça L1 (250 μ L) são injetados na solução carregadora C (HNO₃ 5,0 x 10⁻² mol L⁻¹; 1,7 mL min⁻¹). As zonas de amostra e reagente dispersas percorrem distâncias iguais até se encontrarem no ponto de coalescência X, ocorrendo à reação química no bobina reacional B (100 cm), formando o precipitado, o qual foi monitorado turbidimetricamente em 400 nm. O aumento no sinal de absorvância devido à dispersão da luz promovida pelo precipitado formado na bobina reacional foi proporcional à concentração do analito na solução injetada.

Quando o injetor comutador está na posição de amostragem, o fluxo intermitente de água desionizada a vazão de 6,3 mL min⁻¹, entra no ponto de confluência Y, efetuando a limpeza do sistema.

3.5.3. Método Comparativo

Os resultados obtidos empregando-se o método proposto foram comparados com os resultados obtidos empregando o procedimento espectrofotométrico no UV-visível proposto por Raggi *et al*²². Nesse procedimento, a quantificação de N-acetilcisteína foi realizada em 515 nm. Para construção da curva analítica, alíquotas da solução de referência de N-acetilcisteína (2,0 x 10⁻³ mol L⁻¹), foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, completando-se o volume com 6 mL de nitrato férrico (4,0 x 10⁻³ mol L⁻¹), 2,5 mL de 1,10-ortofenantrolina (0,25% m/v), 3,5 mL de acetato de sódio (0,2 mol L⁻¹), 4,5 mL de tampão acetato (pH 4,0; 0,1 mol L⁻¹) e água desionizada. A absorvância foi medida após 20 minutos. Para análise das amostras, transferiu-se 100 mg da amostra para um balão volumétrico de 200 mL, transferiu-se dessa solução 10 mL para um balão volumétrico de 50 mL e desse último balão volumétrico 5 mL foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com os mesmos reagentes que foram usados para a construção da curva analítica.

3.6. Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína com Nitrato de Ferro (III), Empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com Zonas Coalescentes.

3.6.1. Reagentes e Soluções

3.6.1.1 Soluções Estoque

A solução estoque de N-acetilcisteína de concentração $2,94 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada diariamente, dissolvendo-se $0,0240\text{g}$ de N-acetilcisteína (Sigma) em 50 mL de água desionizada. Soluções contendo entre $3,5 \times 10^{-6}$ e $4,3 \times 10^{-4}$ de N-acetilcisteína foram preparadas por diluição da solução estoque em água desionizada em balões volumétricos de 25 mL .

A solução de Nitrato de Ferro (III) (Aldrich) de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se $0,0414\text{g}$ do sal em um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água desionizada. Uma alíquota de ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada para obtenção de uma concentração final de HNO_3 de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de 1,10-ortofenantrolina de concentração $1,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se $0,0360\text{g}$ em 50 mL água desionizada pré-aquecida em um béquer, após a dissolução do composto, este era transferido para um balão volumétrico de 100 mL , completando-se o volume do balão volumétrico com água desionizada.

3.6.1.2. Preparo e Análise das Amostras

Duas amostras comerciais contendo N-acetilcisteína adquiridas no comércio local contendo 20 mg/g por envelope na forma granulada foram analisadas neste procedimento: (Genérico[®] Granulado – Eurofarma / S.P.) e (Fluimucil[®] Granulado - Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda / S.P).

Para a análise das amostras, foram pesados dois envelopes das respectivas amostras, sendo $5,0 \text{ g}$ massa total contida em cada envelope. Uma massa correspondente a $19,94 \text{ mg}$ de cada envelope contendo N-acetilcisteína foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e adicionou-se água desionizada

até completar esse volume. Em seguida, 20 μL dessa solução foram transferidos para quatro balões volumétricos de 10 mL. Em cada balão volumétrico adicionou-se diferentes alíquotas de solução padrão e completou-se o volume com água desionizada. As concentrações obtidas desta maneira estavam dentro da linearidade da curva analítica do método em fluxo desenvolvido. Alíquotas de 200 μL dessas soluções das amostras foram injetadas utilizando um injetor manual.

3.6.2. Procedimento Experimental

A FIGURA 3.3. mostra o diagrama esquemático do sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes empregado para determinação de N-acetilcisteína. Esse método, mecanização do método comparativo, é baseado na redução de íons ferro (III) por ação da N-acetilcisteína e subsequente complexação do ferro (II) formado com 1,10-ortofenantrolina. Esse complexo apresenta um máximo de absorção em 515 nm.

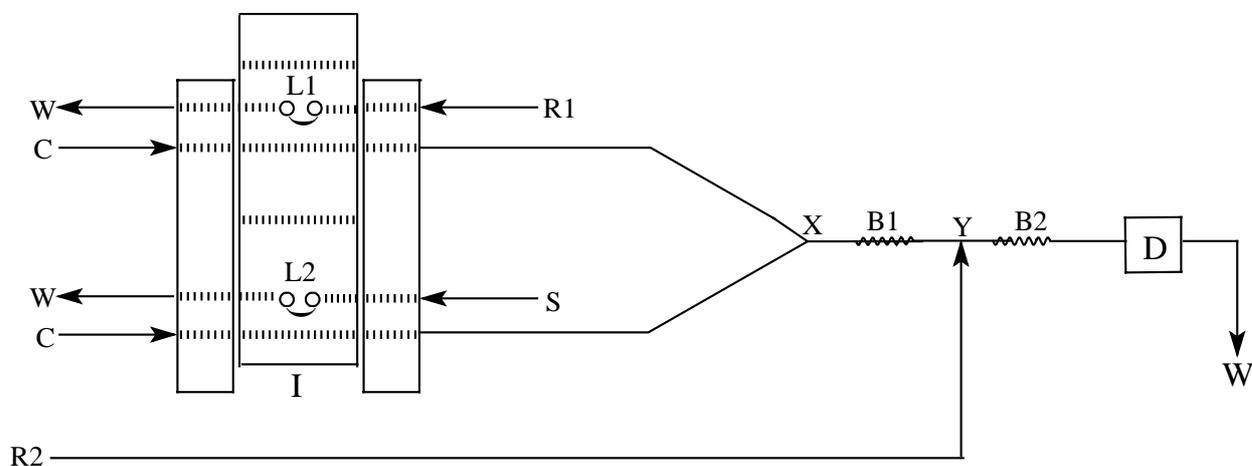


FIGURA 3.3. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação espectrofotométrica de N-acetilcisteína. As representações são I, injetor comutador; S, amostra ou solução de referência; R1, reagente $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$); R2, reagente 1,10-ortofenantrolina ($1,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $1,6 \text{ mL min}^{-1}$); L1, alça do reagente (200 μL); L2, alça de amostragem (350 μL); C, solução transportadora (água desionizada; $1,6 \text{ mL min}^{-1}$); B1, bobina reacional (15 cm); B2, bobina reacional (70 cm); X, ponto de coalescência; Y, ponto de confluência; D, espectrofotômetro em 515 nm e W, descarte.

Nesse sistema, quando o injetor está na posição de injeção, a amostra (350 μ L) e o e o reagente R1 ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$; $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na alça L1 (250 μ L) são injetados na solução transportadora C (água desionizada; $1,6 \text{ mL min}^{-1}$). As zonas de amostra e reagente dispersa percorrem distâncias iguais até se encontrarem no ponto de coalescência X, ocorrendo a redução do ferro(III) para ferro(II) pela ação da N-acetilcisteína no bobina reacional B1 (15 cm). No ponto Y há a entrada da solução contendo reagente 1,10-ortofenantrolina ($1,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $1,6 \text{ mL min}^{-1}$), ocorrendo a formação de um complexo vermelho estável (ferroína) entre o Fe(II) gerado e a 1,10-ortofenantrolina na bobina reacional de 70 cm. Este complexo foi monitorado espectrofotometricamente em 515 nm.

3.6.3. Método Comparativo

Empregou-se o mesmo procedimento descrito em 3.5.3.

3.7. Determinação Voltamétrica de N-acetilcisteína Utilizando um Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado (EPCM) com Hexacianoferrato (III) de Cobre (II).

3.7.1. Reagentes e Soluções

3.7.1.1. Soluções Estoque

Para as medidas em voltametria linear, utilizaram-se soluções de tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ preparadas em diferentes valores de pH. As soluções de tampão acetato foram preparadas com soluções de ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Para cada valor de pH, as soluções foram ajustadas com adição de HCl ou NaOH concentrado. Soluções estoque de N-acetilcisteína 6 mmol L^{-1} foram preparadas diariamente dissolvendo-se $0,0245 \text{ g}$ de N-acetilcisteína (Sigma) em 25 mL de solução tampão acetato $\text{pH} = 6,0$.

3.7.1.2. Preparação do Hexacianoferrato (III) de Cobre (II)

Este composto foi preparado por precipitação, como proposto por AYRAULT *et al.*⁶⁵. A reação ocorre a partir da mistura de uma solução de hexacianoferrato (III) de potássio $0,125 \text{ mol L}^{-1}$ e uma solução de nitrato de cobre (II) $0,375 \text{ mol L}^{-1}$, com uma razão atômica $\text{Cu/Fe} = 3$. As partículas foram filtradas, lavadas com água desionizada e secas à temperatura ambiente por aproximadamente 24 h.

3.7.1.3. Preparação do Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado

O eletrodo de pasta de carbono modificado (EPCM) foi preparado pela mistura em diferentes proporções de pó de grafite (35 – 65% m/m, 1-2 μm de tamanho de partícula - Aldrich), de óleo mineral (25 %m/m, Aldrich) e o modificador $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ (10 – 30% m/m). Os componentes foram homogeneizados por agitação magnética em um béquer (50 mL) contendo 20 mL de hexano (utilizado para homogeneização dos componentes da pasta). A pasta final foi obtida com a evaporação do solvente e inserida em um tubo cilíndrico de plástico (seringa para insulina de 1 mL) contendo uma haste de cobre adaptado ao êmbolo para o contato elétrico externo, como mostra a FIGURA 3.4.

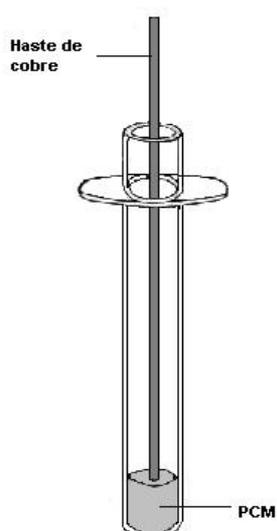


FIGURA 3.4 Esquema do eletrodo de pasta de carbono modificado

3.7.1.4. Preparo e Análise das Amostras

Duas amostras comerciais contendo N-acetilcisteína adquiridas no comércio local foram analisadas neste procedimento: (Genérico[®] Granulado – Eurofarma / S.P.) contendo 20 mg/g de N-acetilcisteína na forma granulada e (Fluimucil[®] Xarope - Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda / S.P) contendo 15 mg mL⁻¹ de N-acetilcisteína disponível na forma de xarope.

Para a análise do Genérico foi pesada uma massa de 5,0 g (massa total contida em um envelope), uma massa desse envelope correspondente a 208 mg de N-acetilcisteína foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o balão volumétrico com tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ pH 6.

A análise da amostra foi feita pelo método de adição múltipla de padrões. Inicialmente foram adicionados 20 µL da solução da amostra na célula voltamétrica, contendo 5,0 mL de tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ pH 6, para obtenção de um voltamograma linear. Com auxílio de uma micropipeta foram adicionados volumes sucessivos da solução padrão de N-acetilcisteína e registraram-se as variações de corrente para cada volume adicionado por meio dos voltamogramas lineares.

Para a análise do xarope, 1,0 mL da amostra foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume do balão volumétrico com tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0.

A análise da amostra foi feita pelo método de adição múltipla de padrões. Inicialmente foram adicionados 50 µL da solução da amostra na célula voltamétrica, contendo 5,0 mL de tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ pH 6, para obtenção de um voltamograma linear. Com auxílio de uma micropipeta foram adicionados volumes sucessivos da solução padrão de N-acetilcisteína e registraram-se as variações de corrente para cada volume adicionado por meio dos voltamogramas lineares.

3.8. Determinação Potenciométrica de N-acetilcisteína Empregando Nitrato de Prata como Titulante.

3.8.1. Reagentes e Soluções

3.8.1.1 Soluções Estoque

A solução estoque de N-acetilcisteína (Sigma) $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,408g de N-acetilcisteína em água desionizada em um balão volumétrico de 50 mL.

A solução de nitrato de prata (Aldrich) $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 0,849g de nitrato de prata em água desionizada em um balão volumétrico de 100 mL.

3.8.1.2. Preparo e Análise das Amostras

Três amostras comerciais contendo N-acetilcisteína adquiridas no comércio local contendo 40 mg/g por envelope na forma granulada foram analisadas neste procedimento: (Genérico[®] Granulado – Eurofarma / S.P.), (Fluimucil[®] Granulado - Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda / S.P) e (Fluicis[®] - Granulado Laboratórios Klinger do Brasil Ltda / S.P.). Para a análise dos fármacos foi pesada uma massa de 5,0g (massa total contida em um envelope). Uma massa desse envelope correspondente a 200 mg de N-acetilcisteína foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o balão volumétrico com água desionizada. Dessa solução transferiu-se uma alíquota de 5 mL da amostra para uma cela potenciométrica de vidro de 50 mL sendo a amostra titulada com uma solução de nitrato de prata $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

3.8.1.3 Método Comparativo

Empregou-se o mesmo procedimento descrito em 3.5.3.

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Determinação Turbidimétrica de N-acetilcisteína com Nitrato de Prata, empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com Zonas Coalescentes

Nesta etapa do trabalho, foi empregado um sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes com detecção turbidimétrica, para a determinação de N-acetilcisteína em produtos farmacêuticos. Nesse sistema, há a formação de um precipitado em linha entre a N-acetilcisteína e os íons prata em meio ácido, formando o N-acetilcisteínato de prata (EQUAÇÃO 4.1) que é monitorado turbidimetricamente em 400 nm. O precipitado formado na bobina reacional gera instabilidade da linha base e nos sinais analíticos. Para evitar isso foi inserido um fluxo intermitente de água desionizada para a limpeza do precipitado acumulado.



4.1.1. Estudos dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA

Inicialmente, foram estudados os parâmetros químicos do sistema FIA de modo a investigar as condições adequadas para a reação entre a N-acetilcisteína e os íons Ag^+ . Os parâmetros do sistema em fluxo foram otimizados para obtenção dos melhores resultados em termos de repetibilidade e magnitude do sinal analítico.

Foram testadas inicialmente as soluções transportadoras mais adequadas. Não foram testados os tampões acetato e fosfato, os ácidos sulfúrico, clorídrico e fosfórico e as bases hidróxido de sódio e potássio, uma vez que esses formam sais insolúveis com os íons prata, interferindo assim na metodologia proposta.

O experimento foi realizado em um sistema FIA com volume das alças de amostragem e do reagente de 250 μL , vazão da solução transportadora de 1,7

mL min⁻¹, bobina reacional de 75 cm e manteve-se uma concentração de N-acetilcisteína fixa em $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

A FIGURA 4.1 mostra o estudo visando otimizar a melhor solução transportadora. As soluções transportadoras estudadas foram: nitrato de sódio e ácido nítrico, ambas em concentração de 0,2 mol L⁻¹ e água desionizada. Como pode ser observado nessa figura, a maior magnitude do sinal analítico foi obtida empregando o ácido nítrico como solução transportadora. Ademais, obteve-se com esse transportador uma maior estabilidade da linha base e melhor magnitude dos sinais analíticos.

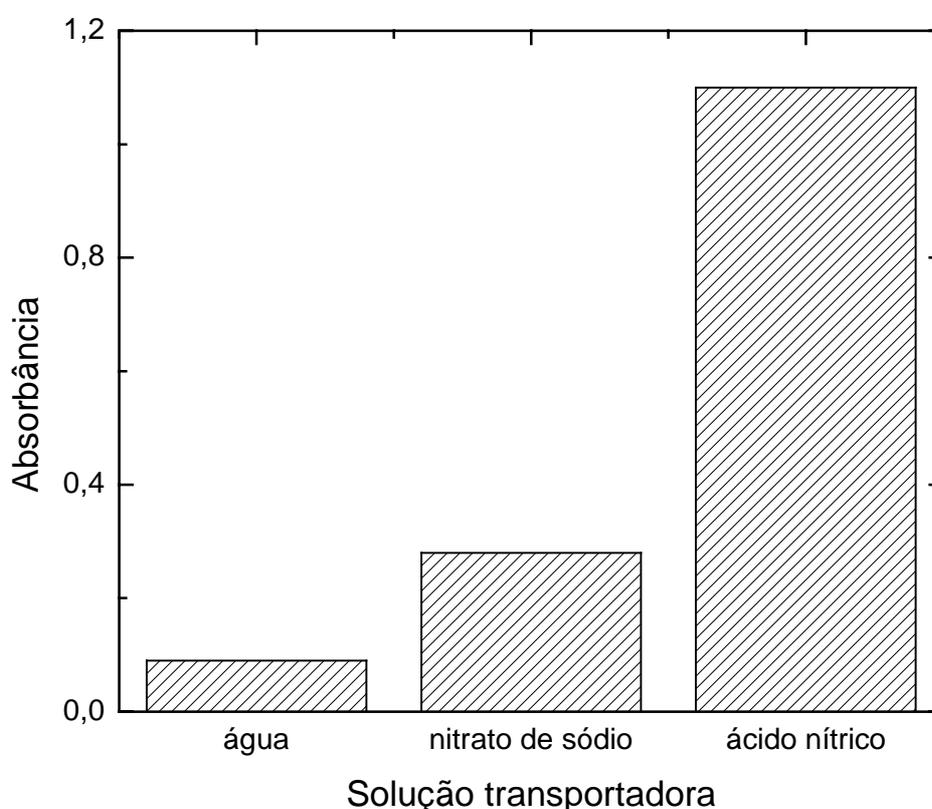


FIGURA 4.1. Estudo da concentração da solução transportadora sobre o sinal analítico (n=3) para uma concentração de N-acetilcisteína $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, concentração de AgNO₃ $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, volume da alça de amostragem e do reagente de 250 μL, bobina reacional 75 cm e vazão do carregador 1,7 mL min⁻¹.

O efeito da concentração da solução transportadora HNO₃ sobre o sinal analítico foi avaliado na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹, mantendo-se a concentração de N-acetilcisteína fixa em $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A FIGURA 4.2 mostra que a absorbância aumentou com o aumento da concentração de HNO₃ até $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e manteve-se praticamente constante em

concentrações superiores. Portanto, a concentração de $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada para estudos posteriores para economia de reagentes.

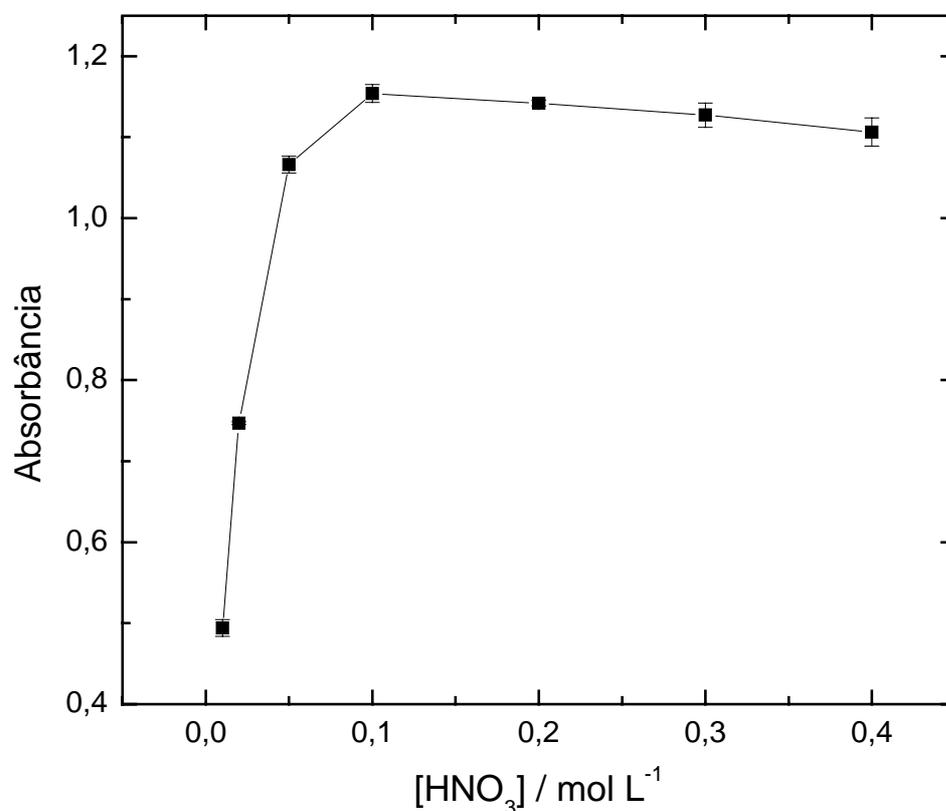


FIGURA 4.2. Estudo da concentração da solução transportadora HNO_3 sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AgNO_3 $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem e do reagente de $250 \mu\text{L}$, bobina reacional 75 cm e vazão do carregador $1,7 \text{ mL min}^{-1}$.

O efeito da concentração do reagente (nitrato de prata) sobre o sinal analítico foi avaliado na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se fixa a concentração de N-acetilcisteína em $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser observado na FIGURA 4.3., a magnitude do sinal analítico aumentou até uma concentração de nitrato de prata de concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, permanecendo praticamente constante em concentrações superiores, indicando assim que a relação molar entre a prata (I) e o ânion da N-acetilcisteína 1:1 havia sido atingida. Esse aumento da magnitude do sinal analítico pode ser atribuído à maior disponibilidade de reagente em solução para a formação do sal insolúvel com a N-acetilcisteína. Dessa maneira a concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada por apresentar uma boa sensibilidade e também economia de reagente.

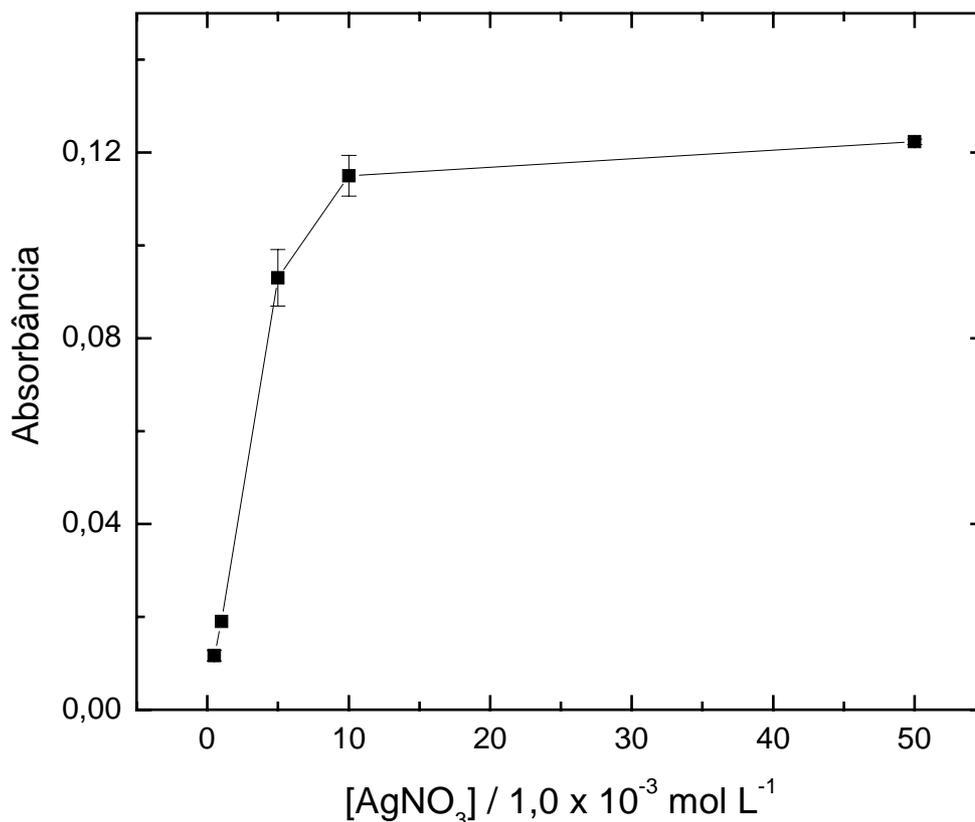


FIGURA 4.3. Estudo da concentração do reagente AgNO_3 sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do carregador HNO_3 $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem e do reagente de $250 \mu\text{L}$, bobina reacional 75 cm e vazão do carregador $1,7 \text{ mL min}^{-1}$.

4.1.2. Estudos dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA

Foram estudados os parâmetros físicos do sistema FIA de modo a investigar as condições adequadas para a reação entre a N-acetilcisteína e os íons Ag^+ . Os parâmetros do sistema em fluxo foram otimizados para obtenção dos melhores resultados em termos de repetibilidade e magnitude do sinal analítico.

O volume da alça de amostragem de 100 , 250 , 375 e $500 \mu\text{L}$ (comprimentos de 20 , 50 , 75 e 100 cm) foi avaliado, sendo mantida a concentração de N-acetilcisteína em $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, como mostrado na FIGURA 4.4. A magnitude do sinal analítico aumentou até um volume de amostra injetado de $500 \mu\text{L}$. Houve um aumento progressivo do sinal analítico devido a um maior volume de

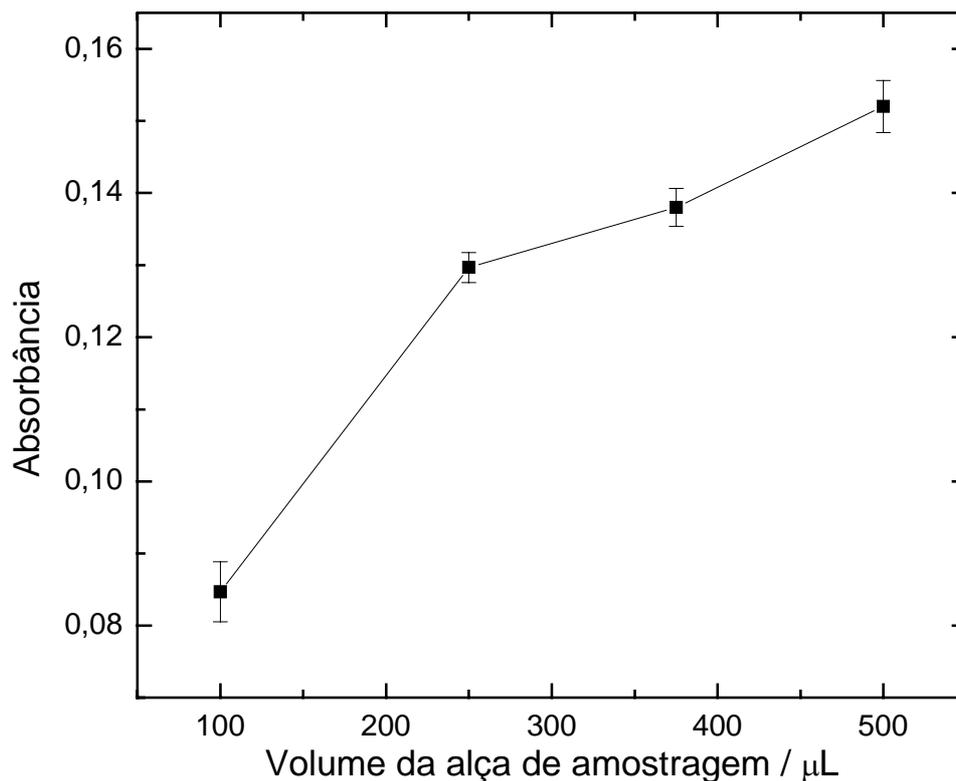


FIGURA 4.4. Estudo do volume da alça de amostragem sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do carregador HNO_3 $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AgNO_3 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, volume da alça do reagente de $250 \mu\text{L}$, bobina reacional 75 cm e vazão do carregador $1,7 \text{ mL min}^{-1}$.

N-acetilcisteína ter sido introduzida no percurso analítico o que aumentou a formação do composto insolúvel com o reagente. Desta maneira, o volume de $500 \mu\text{L}$ foi selecionado, considerando-se que para volumes maiores a frequência analítica ficaria comprometida.

O volume da alça do reagente de 125 , 250 e $375 \mu\text{L}$ (comprimentos de 25 , 50 e 75 cm) foi avaliado, como indicado na FIGURA 4.5. Mantendo-se fixa a concentração de N-acetilcisteína em $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a magnitude do sinal analítico aumentou até um volume de amostra injetado de $250 \mu\text{L}$. Desta maneira, o volume de $250 \mu\text{L}$ foi selecionado, considerando-se a maior magnitude do sinal analítico e a frequência analítica.

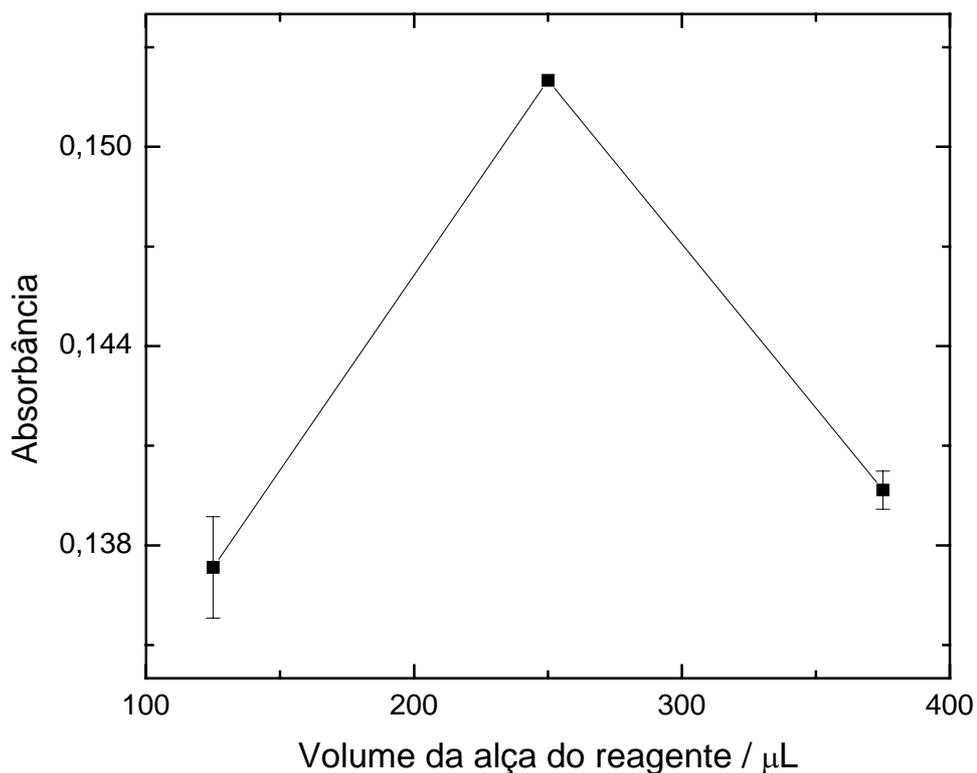


FIGURA 4.5. Efeito do volume da alça do reagente sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do carregador HNO_3 $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AgNO_3 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem de $500 \mu\text{L}$, bobina reacional 75 cm e vazão do carregador $1,7 \text{ mL min}^{-1}$.

A influência do comprimento da bobina reacional (colocada após o ponto de coalescência) sobre o sinal analítico foi também avaliada em um intervalo de 25 a 150 cm, como indicada na FIGURA 4.6. A magnitude do sinal analítico decresceu acentuadamente com o aumento do comprimento da bobina de 100 para 150 cm, devido provavelmente ao efeito de dispersão ser mais significativo que uma eventual homogeneização da zona de amostra com o reagente, o que acarretaria em uma reação mais eficiente e conseqüente aumento do sinal analítico. Como a cinética da reação de formação do precipitado é rápida, a dispersão prevalece e a absorbância diminui. Considerando a sensibilidade do método, a bobina reacional de 100 cm foi selecionada para estudos posteriores.

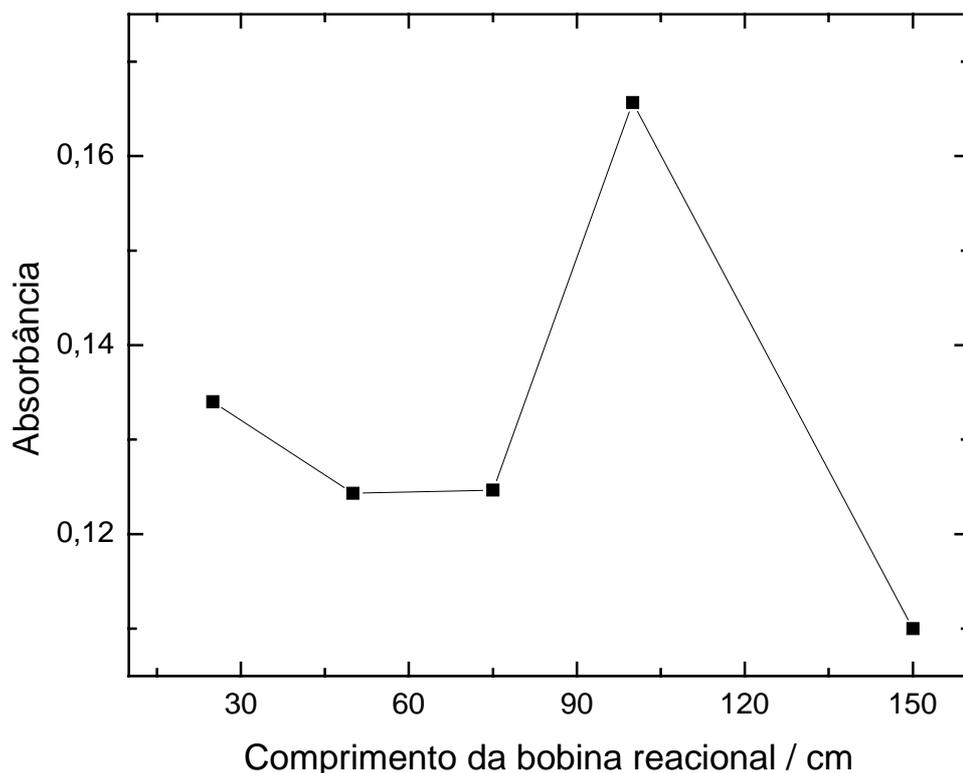


FIGURA 4.6. Efeito do comprimento da bobina reacional sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do carregador HNO_3 $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AgNO_3 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem de $500 \mu\text{L}$, volume da alça do reagente de $250 \mu\text{L}$ e vazão do carregador $1,7 \text{ mL min}^{-1}$.

A FIGURA 4.7. mostra o efeito da vazão da solução transportadora (solução de HNO_3 , $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) no intervalo entre $0,5$ e $6,3 \text{ mL min}^{-1}$ sobre o sinal analítico. Utilizando-se uma solução de N-acetilcisteína na concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, o sinal analítico diminuiu com o aumento da vazão, provavelmente devido à menor dispersão da solução de amostra para vazões menores. Observou-se um maior sinal analítico empregando-se uma vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, mas o tempo de limpeza do sistema ficou comprometido devido à demora da queda do sinal analítico, então a vazão de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionada para estudos posteriores por apresentar uma melhor repetibilidade, maior frequência de amostragem e também maior estabilidade da linha base.

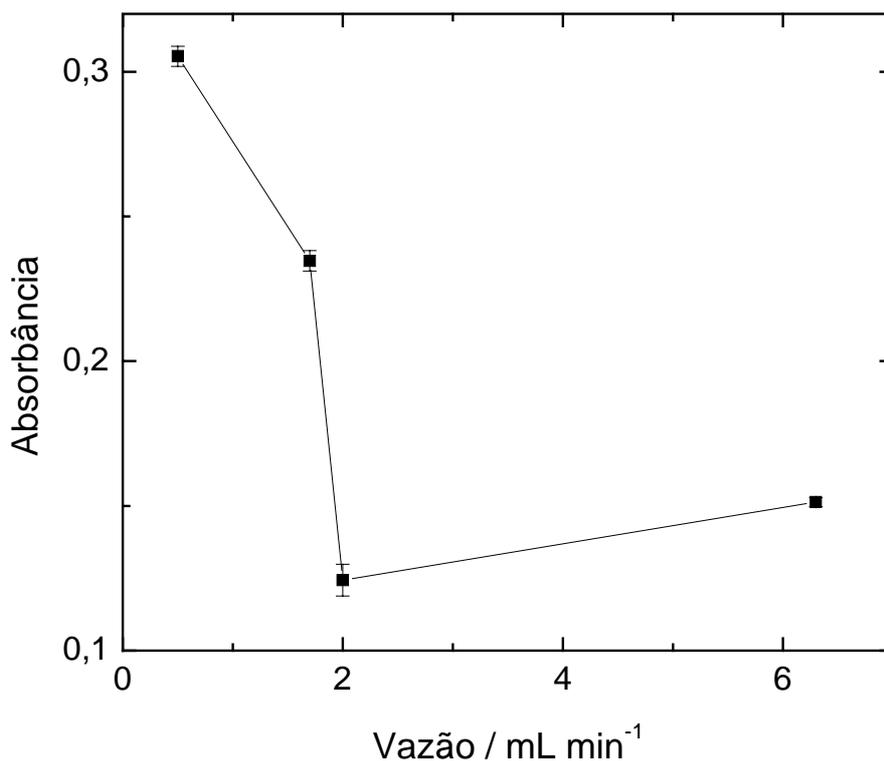


FIGURA 4.7. Estudo da vazão da solução transportadora HNO_3 sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração AgNO_3 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem $500 \mu\text{L}$, volume da alça do reagente $250 \mu\text{L}$, bobina reacional 100 cm .

A adição de colóides protetores ou surfactantes é muitas vezes, requerida, pois a presença destes agentes é uma garantia adicional de nucleação uniforme do precipitado, melhorando a reprodutibilidade das medidas. Sendo assim, estudou-se o efeito de polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), Triton X-100 e Agar-Agar nas concentrações de 0,010, 0,025 e 0,050% (m/v) sobre o sinal analítico, estabilidade da linha base e reprodutibilidade dos sinais transientes obtidos. Como os resultados obtidos empregando-se esses surfactantes não levaram a uma melhora da magnitude do sinal analítico, trabalhou-se com uma solução transportadora de HNO_3 $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

A formação do precipitado em linha geralmente apresenta tendência de adsorção nas paredes da bobina reacional e na cela de fluxo, gerando elevação da linha base, o que deve ser evitado. Para eliminar esse acúmulo de precipitado na bobina reacional, foi empregado um fluxo intermitente com água desionizada (vazão de $6,3 \text{ mL min}^{-1}$) como solução de limpeza, o que levou a um aumento da frequência analítica e estabilização da linha base.

4.1.3. Estudo de Interferentes em Potencial

Foram avaliados alguns excipientes normalmente presentes em formulações farmacêuticas que podem interferir na determinação de N-acetilcisteína (TABELA 4.1). As substâncias avaliadas foram: sacarina sódica, sacarose, EDTA e cloreto de benzalcônio em concentrações dez vezes maior que a da N-acetilcisteína ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Nenhuma das substâncias investigadas causou interferência significativa na determinação de N-acetilcisteína, com exceção do cloreto de benzalcônio, que apresentou uma interferência positiva da ordem de 200%, mesmo em concentrações dez vezes menor do que a concentração do analito. O ânion cloreto precipita com o íon Ag^+ do reagente, gerando um volume maior de precipitado, acarretando no aumento da absorvância e interferindo na metodologia proposta. Desta forma, amostras comerciais de N-acetilcisteína contendo cloreto de benzalcônio não puderam ser analisadas por esse procedimento.

TABELA 4.1. Efeito dos excipientes como possíveis interferentes em potencial na determinação de N-acetilcisteína (Nac).

Excipiente	Razão de concentração* (Excipiente:Nac)	Interferência%
Sacarina	10:1	5,0
Sacarose	10:1	5,0
EDTA	10:1	4,0
Cloreto de benzalcônio	1:10	200

*[N-acetilcisteína] = $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

4.1.4. Teste de Adição e Recuperação

No teste de adição e recuperação, três concentrações diferentes de N-acetilcisteína, a saber: $2,12 \times 10^{-4}$, $4,24 \times 10^{-4}$ e $6,36 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (34,6, 69,2, 103,8 mg L^{-1}) foram adicionadas a duas amostras de formulações farmacêuticas e os resultados comparados com aqueles obtidos com as amostras não adicionadas do padrão. Os resultados estão apresentados na TABELA 4.2. Como pode ser observado, os índices de recuperação variaram de 104 e 105% para a amostra Flumucil, evidenciando uma interferência não significativa da matriz nessa amostra.

Para o medicamento Genérico, os índices de recuperação variaram entre 102 e 122%, sendo então necessário o emprego do método de adição múltipla de padrão para a determinação de N-acetilcisteína nesse produto farmacêutico.

TABELA 4.2. Estudo de adição e recuperação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas.

Amostras	Adicionado (mg L^{-1})	Recuperado (mg L^{-1})	% Recuperação
Fluimucil	34,6	$36,2 \pm 0,2$	104
	69,2	$72,6 \pm 0,3$	105
	103,8	$107,9 \pm 0,1$	104
Genérico	34,6	$42,2 \pm 0,3$	122
	69,2	$72,6 \pm 0,4$	105
	103,8	$106,2 \pm 0,2$	102

n=3

4.1.5. Estudo da Repetibilidade e Frequência de Amostragem

Estudou-se a repetibilidade do procedimento analítico para concentrações de solução padrão de N-acetilcisteína $2,12 \times 10^{-4}$ e $8,48 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ obtendo-se desvios padrões relativos de 0,9 e 0,07%, respectivamente. A frequência de amostragem foi de 60 determinações por hora.

4.1.6. Curva Analítica

A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de N-acetilcisteína entre $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ ($A = -0,02573 + 480,104C$; $r = 0,9993$ onde A é a absorvância e C a concentração de N-acetilcisteína em mol L⁻¹) e apresentou um limite de detecção de $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica), conforme a FIGURA 4.8.

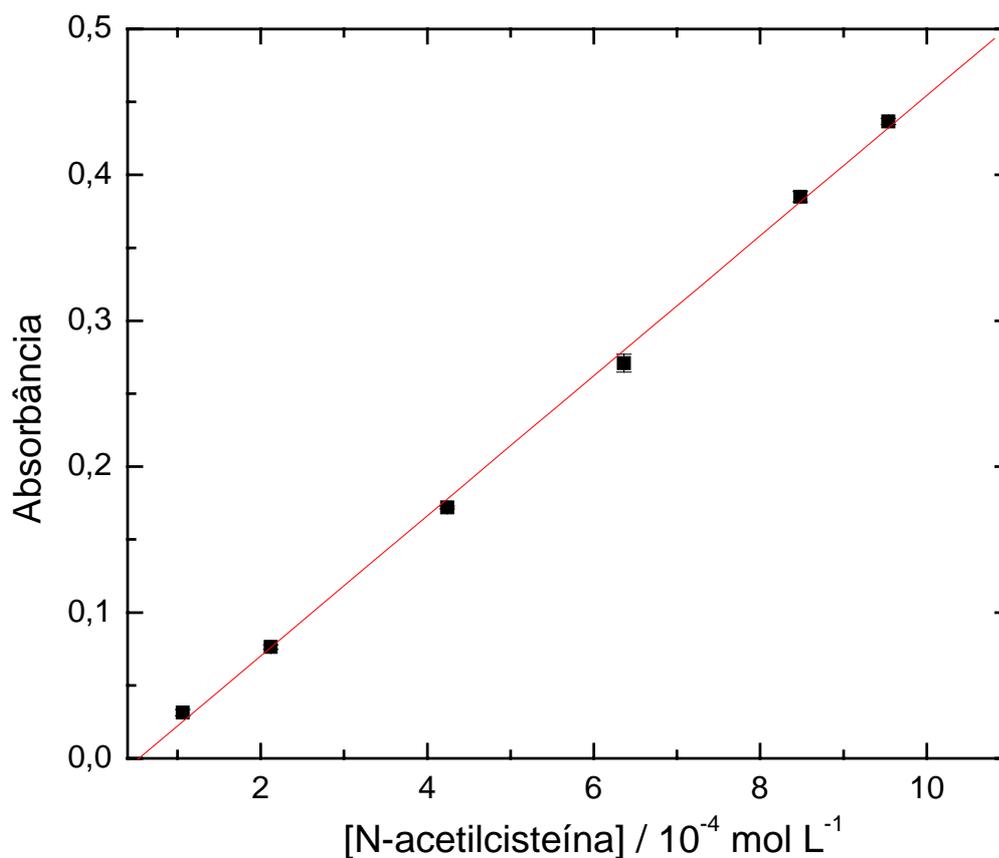


FIGURA 4.8. Curva Analítica para determinação de N-acetilcisteína utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto.

Os sinais transientes obtidos em triplicatas ($1,06 \times 10^{-4}$, $2,12 \times 10^{-4}$, $4,24 \times 10^{-4}$, $6,36 \times 10^{-4}$, $8,48 \times 10^{-4}$ e $9,54 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) das soluções de referência de N-acetilcisteína e da solução de amostra Fluimucil, são mostrados na FIGURA 4.9.

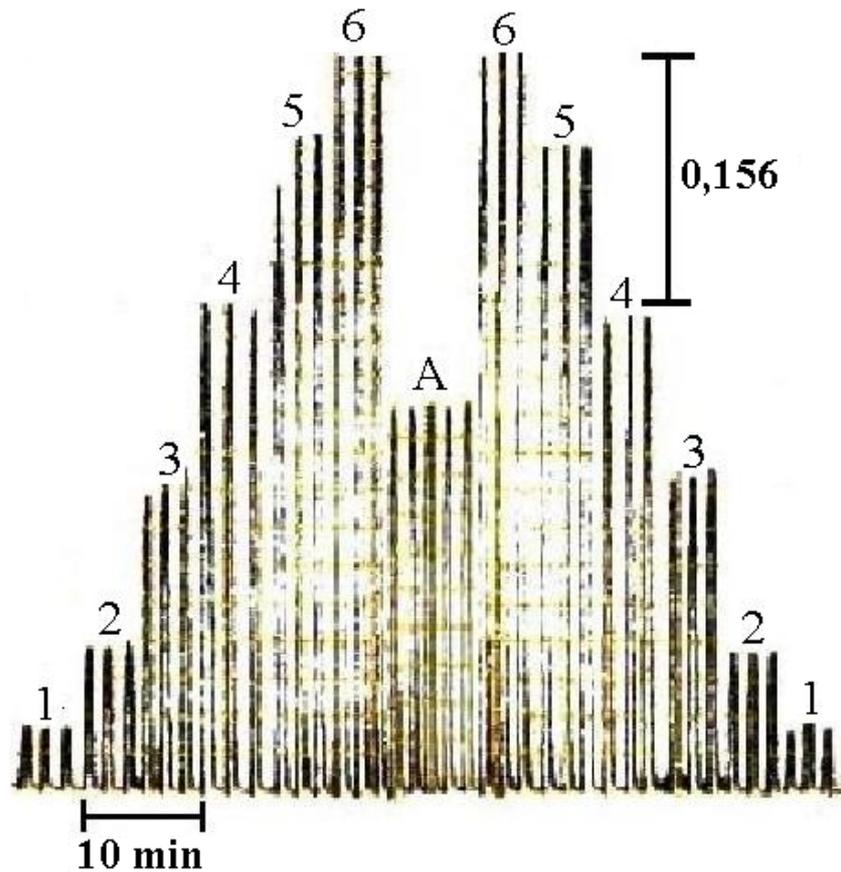


FIGURA 4.9. Sinais transientes em triplicatas das soluções de referência de N-acetilcisteína nas concentrações de (1) $1,06 \times 10^{-4}$, (2) $2,12 \times 10^{-4}$, (3) $4,24 \times 10^{-4}$, (4) $6,36 \times 10^{-4}$, (5) $8,48 \times 10^{-4}$ e (6) $9,54 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e da amostra (A) Fluimucil obtida em quintuplicata. As condições do sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.5.2.

4.1.7. Aplicações

O método proposto foi aplicado na determinação de N-acetilcisteína em duas formulações farmacêuticas. Os resultados encontrados empregando-se o método proposto e o método comparativo²² são apresentados na TABELA 4.3. Há um nível de confiança de 95%, os resultados encontrados foram concordantes dentro de um intervalo de erro aceitável, mostrando-se assim a confiabilidade do procedimento em fluxo desenvolvido e a importância do mesmo.

TABELA 4.3. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o método comparativo.

Amostras	N-acetilcisteína/ mg/g			Erro	
	Rotulado	Comparativo	Proposto	Er ₁ / %	Er ₂ / %
Fluimucil	40	39,0 ± 1	39,2 ± 0,3	0,5	-2,0
Genérico ^a	40	39,2 ± 1	38,2 ± 0,1	-2,6	-4,7

^aadição de padrão;

Er₁, erro relativo entre o método FIA e o método comparativo;

Er₂, erro relativo entre o método FIA e o valor rotulado.

A FIGURA 4.10, apresenta os sinais transientes e a curva obtida na determinação de N-acetilcisteína empregando-se o método de adição múltipla de padrões da amostra do medicamento Genérico.

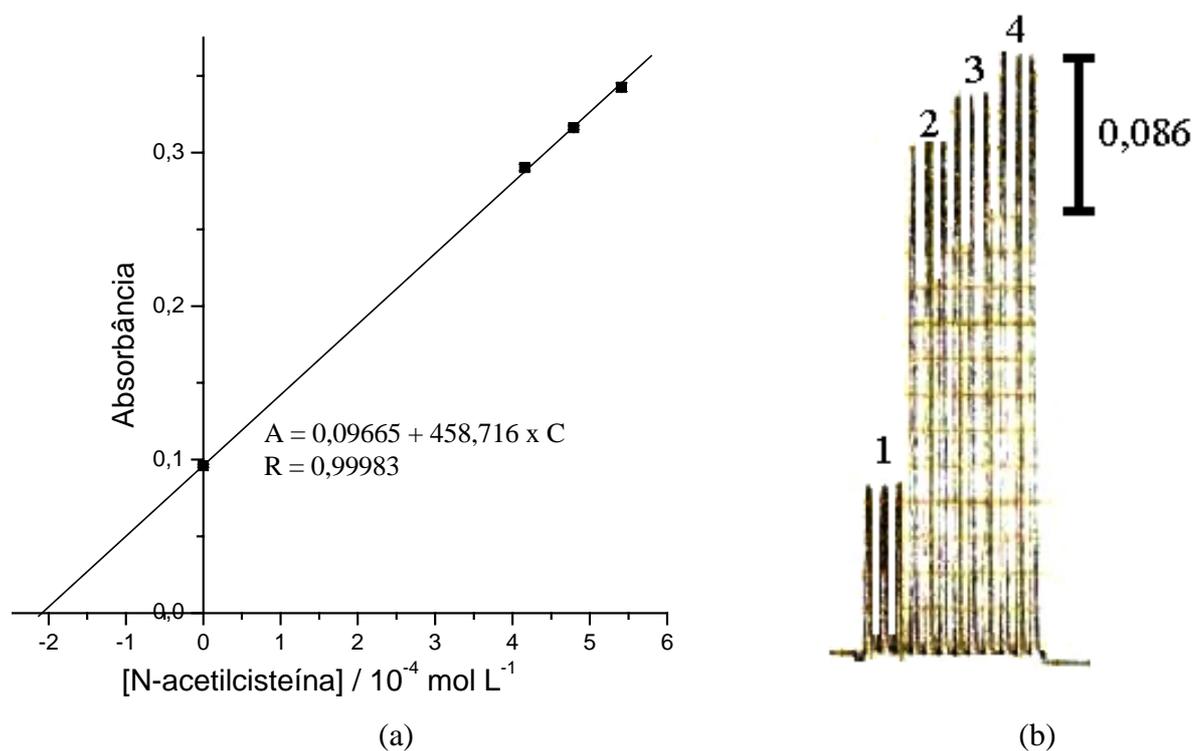
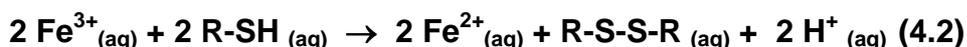


FIGURA 4.10. (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de N-acetilcisteína em uma formulação farmacêutica. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de N-acetilcisteína a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $4,16 \times 10^{-4}$, $4,79 \times 10^{-4}$ e $5,41 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína com Nitrato de Ferro (III), Empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com Zonas Coalescentes

Nesta etapa do trabalho foi empregado um sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes. Nesse sistema, a amostra e o reagente ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) são injetados na solução transportadora (água desionizada; $1,6 \text{ mL min}^{-1}$), onde ocorre a redução de Fe(III) para Fe (II) pela ação da N-acetilcisteína e a oxidação desta para diacetilcistina na bobina reacional de 15 cm. O reagente 1,10-ortofenantrolina ($1,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $1,6 \text{ mL min}^{-1}$) entra por confluência, formando um complexo vermelho estável entre o Fe(II) gerado e a 1,10-ortofenantrolina, conhecido como ferroína, que foi monitorada espectrofotometricamente em 515 nm. As reações são mostradas nas EQUAÇÕES 4.2 e 4.3.



O espectro de absorção molecular (FIGURA 4.11) na região do UV e visível do cromóforo formado na reação de complexação entre o ferro (II) e a 1,10-ortofenantrolina apresenta um máximo de absorbância em 515 nm. Este valor foi fixado para o desenvolvimento desse trabalho.

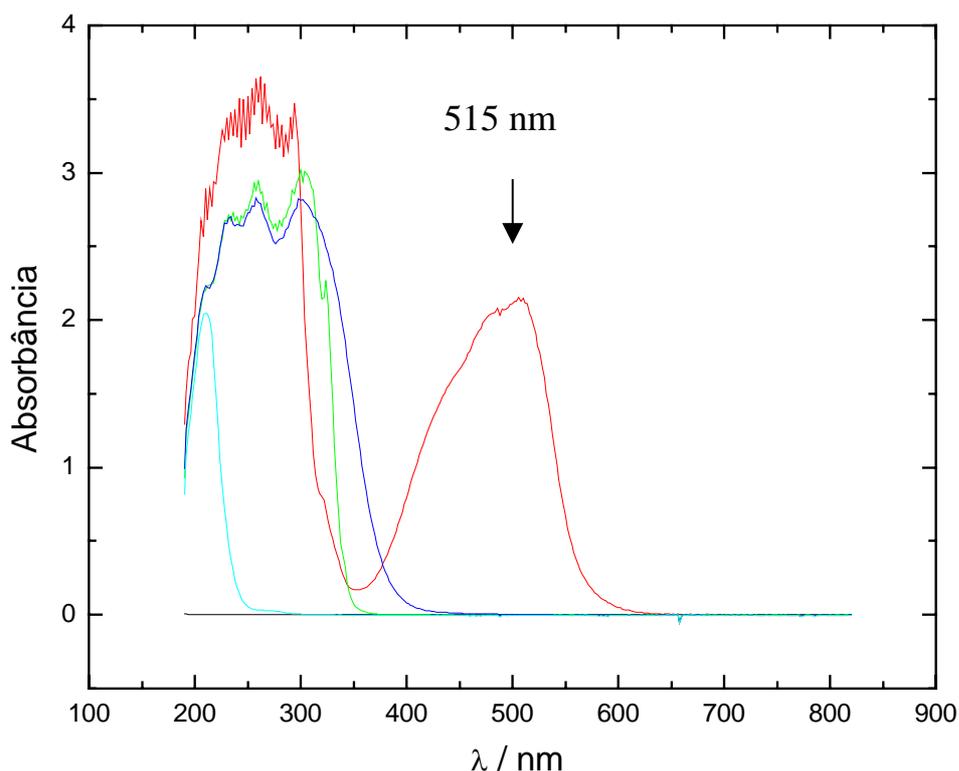


FIGURA 4.11. Espectro de absorção molecular. (—) branco, (—) solução de nitrato de ferro (III), (—) solução de N-acetilcisteína, (—) solução de 1,10-ortofenantrolina e (—) complexo $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$

4.2.1. Estudo dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA

Inicialmente, foram estudados os parâmetros químicos do sistema FIA de modo a investigar as condições adequadas para a reação entre a N-acetilcisteína e o ferro (III), e o produto da reação ($[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$) formado na reação de complexação de Fe (II) gerado e a 1,10-ortofenantrolina. Os parâmetros do sistema em fluxo foram otimizados para obtenção dos melhores resultados em termos de repetibilidade e magnitude do sinal analítico.

Estudou-se inicialmente, o efeito da solução transportadora (tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH (3 a 6) e água desionizada) sobre o sinal analítico. Não se trabalhou com soluções transportadoras básicas a fim de prevenir a hidrólise dos íons ferro(III). A FIGURA 4.12 mostra que o maior sinal analítico foi obtido em pH 3,0 empregando-se tampão acetato. Empregando-se água desionizada como solução transportadora obteve-se magnitudes de sinais analíticos iguais ou superiores àqueles obtidos com as soluções tampão acetato no intervalo

de pH estudado. Sendo assim, optou-se por utilizar água desionizada como solução transportadora para economia de reagente.

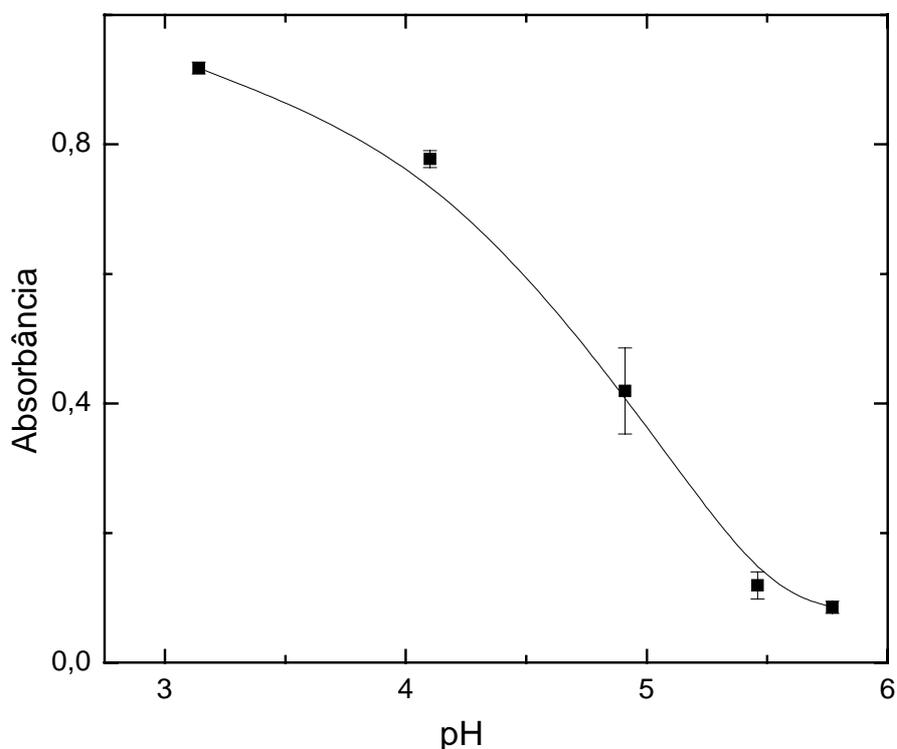


FIGURA 4.12 Estudo da concentração hidrogeniônica no intervalo de pH entre 3 e 6 (tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) da solução transportadora sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de 1,10-ortofenantrolina $4,97 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de nitrato de ferro (III) $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, vazão do carregador $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume da alça de amostragem e do reagente de $200 \mu\text{L}$, bobina reacional 1 (50cm) e bobina reacional 2 (150 cm).

O efeito da concentração do reagente (nitrato de ferro (III)) sobre o sinal analítico foi avaliado na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se fixa a concentração de N-acetilcisteína em $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser observada na FIGURA 4.13, a magnitude do sinal aumentou até uma concentração de nitrato de ferro (III) de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, permanecendo praticamente constante em concentrações superiores. Houve um aumento da magnitude do sinal analítico devido à maior disponibilidade de ferro (II), gerado a partir da reação redox entre a N-acetilcisteína e o ferro(III), em solução para a formação do complexo com a 1,10-ortofenantrolina. Dessa maneira a concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada por apresentar uma boa sensibilidade e para economia de reagente.

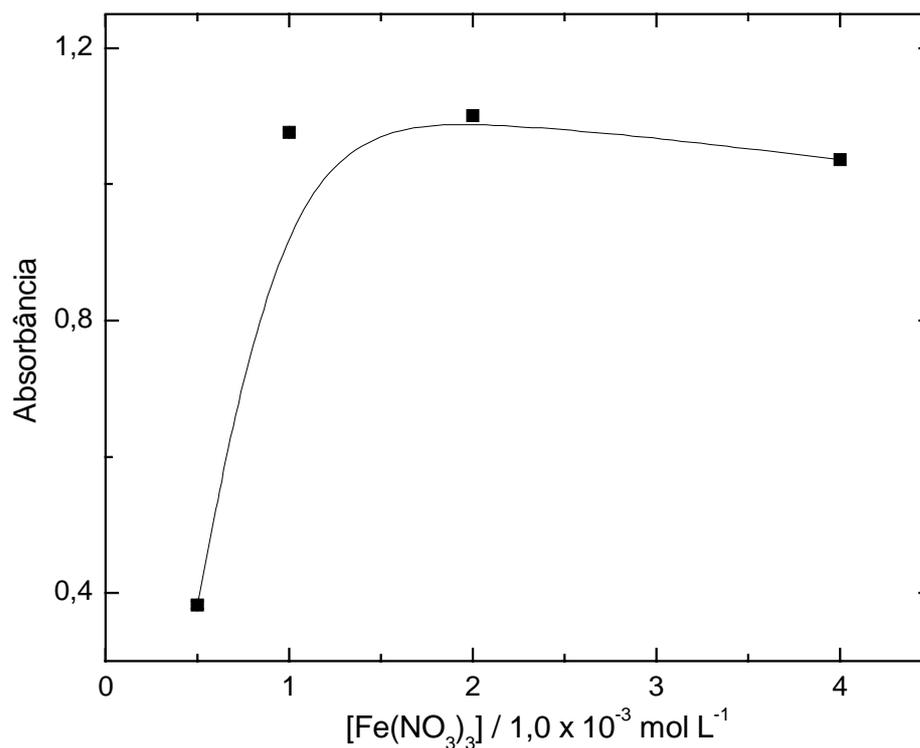


FIGURA 4.13. Estudo da concentração do reagente $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de 1,10-ortofenantrolina $4,46 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, vazão do carregador $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume da alça de amostragem e do reagente de $200 \mu\text{L}$, bobina reacional 1 (50cm) e bobina reacional 2 (150 cm).

Após a otimização do $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, foi estudada a melhor concentração de 1,10-ortofenantrolina sobre o sinal analítico. A solução de 1,10-ortofenantrolina foi estudada no intervalo de concentração de $6,0 \times 10^{-4}$ a $4,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser observado na FIGURA 4.14, as concentrações $3,0 \times 10^{-3}$ e $4,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ desse reagente cromogênico foram as que apresentaram o melhor sinal analítico, porém, a concentração de $1,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi escolhida para estudos futuros para economia de reagente.

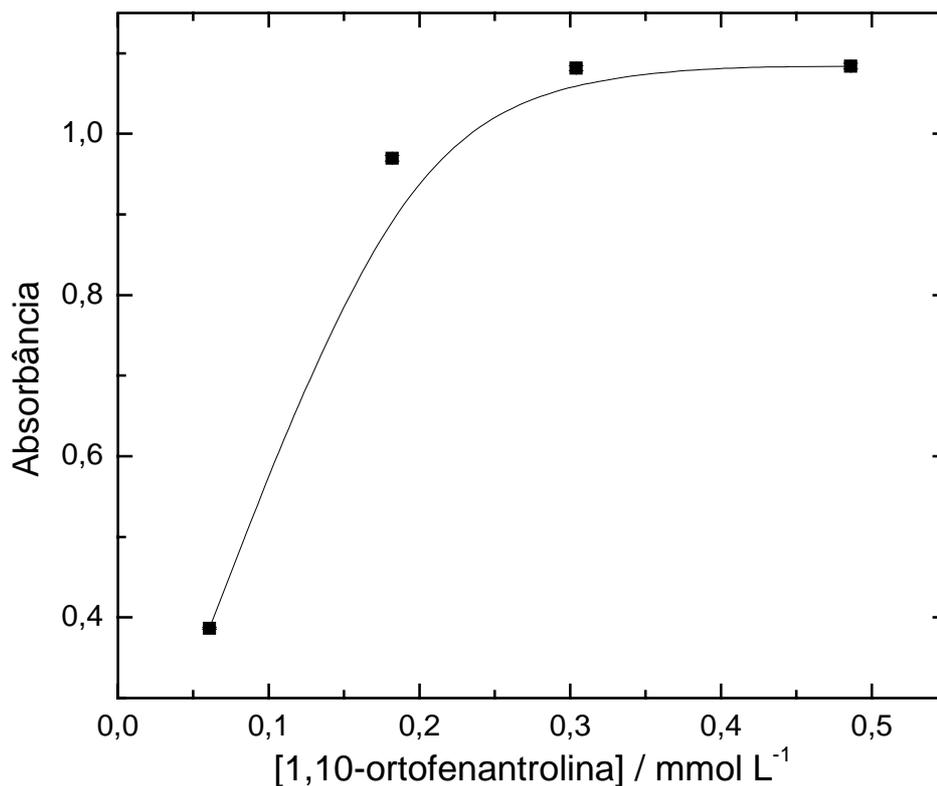


FIGURA 4.14. Estudo da concentração do reagente 1,10-ortofenantrolina sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $4,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, vazão do carregador $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume da alça de amostragem e do reagente de $200 \mu\text{L}$, bobina reacional 1 (50cm) e bobina reacional 2 (150 cm).

4.2.2. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA

O efeito da vazão da solução transportadora em cada canal (água desionizada) foi avaliado entre $1,0$ e $2,6 \text{ mL min}^{-1}$, empregando-se uma solução de N-acetilcisteína $8,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (FIGURA 4.15). Verificou-se uma queda acentuada do sinal analítico de $1,5$ para $2,6 \text{ mL min}^{-1}$, devido provavelmente à dispersão e/ou diluição da zona de amostra em vazões maiores. Em consequência disso, a vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ foi escolhida por apresentar maior absorbância e não comprometer a frequência de amostragem

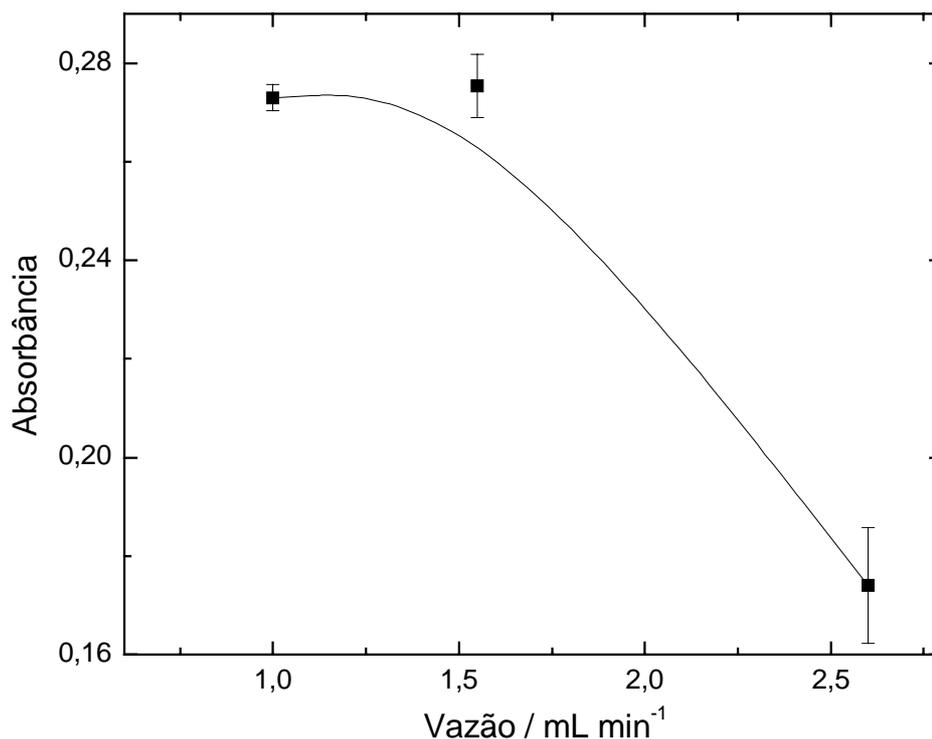


FIGURA 4.15. Efeito da vazão da solução transportadora (água desionizada) sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $8,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de 1,10-ortofenantrolina $1,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, vazão do carregador $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume da alça de amostragem e do reagente de $200 \mu\text{L}$, bobina reacional 1 (50cm) e bobina reacional 2 (150 cm).

O volume da alça do reagente de 75, 200, 250 e $370 \mu\text{L}$ (comprimentos de 25, 40, 50 e 75 cm) foi avaliado, como apresentado na FIGURA 4.16. A magnitude do sinal analítico aumentou acentuadamente entre 75 e $200 \mu\text{L}$, provavelmente devido a um maior volume nitrato de ferro (III) ter sido introduzido no percurso analítico o que aumentou a formação de ferro (II) devido à redução do ferro (III) por ação da N-acetilcisteína, gerando uma quantidade maior do complexo, permanecendo praticamente constante em volumes superiores, indicando que se trata da quantidade máxima de nitrato de ferro (III) necessária para a formação do complexo. Sendo assim, selecionou-se um volume de $200 \mu\text{L}$ de amostra para o restante do trabalho por apresentar uma melhor magnitude nos sinais obtidos.

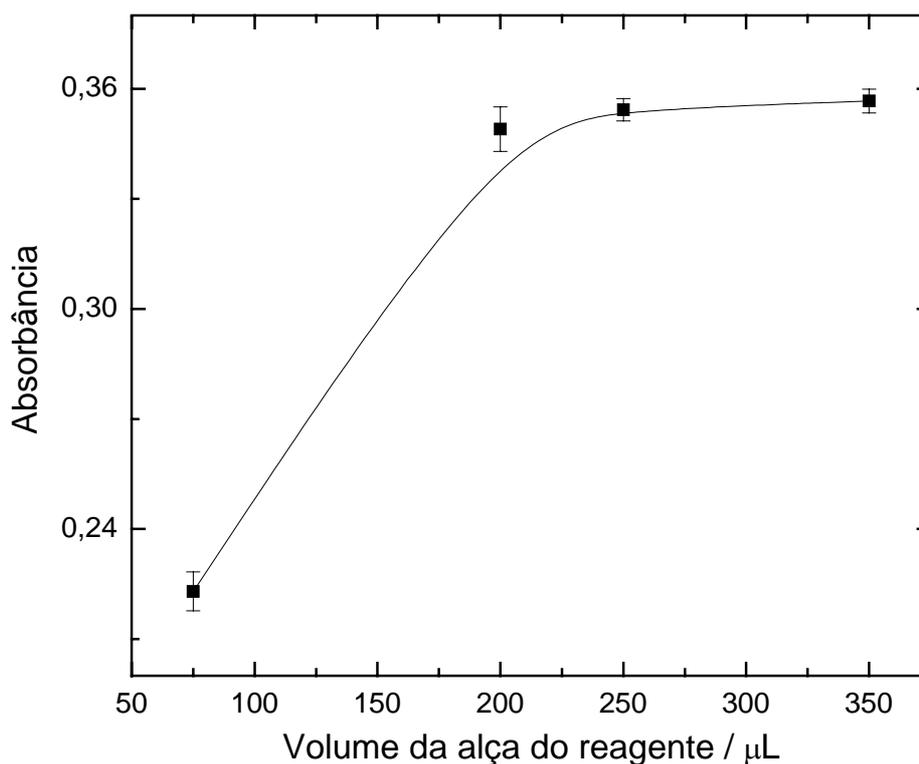


FIGURA 4.16. Efeito do volume da alça do reagente sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $8,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de 1,10-ortofenantrolina $1,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, vazão do carregador $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume da alça de amostragem $200 \mu\text{L}$, bobina reacional 1 (50cm) e bobina reacional 2 (150 cm).

O volume da alça de amostragem de 75, 200, 250, 350 e 500 μL (comprimentos de 15, 40, 50, 70 e 100 cm), foi avaliado, como mostrado na FIGURA 4.17. Para uma solução de N-acetilcisteína de concentração $4,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a magnitude do sinal analítico aumentou até um volume de amostra injetado de 350 μL , havendo um pequeno aumento da magnitude do sinal para o volume de 500 μL . Dessa maneira, o volume de 350 μL foi selecionado considerando-se a sensibilidade e a freqüência de amostragem, além da estabilidade da linha base.

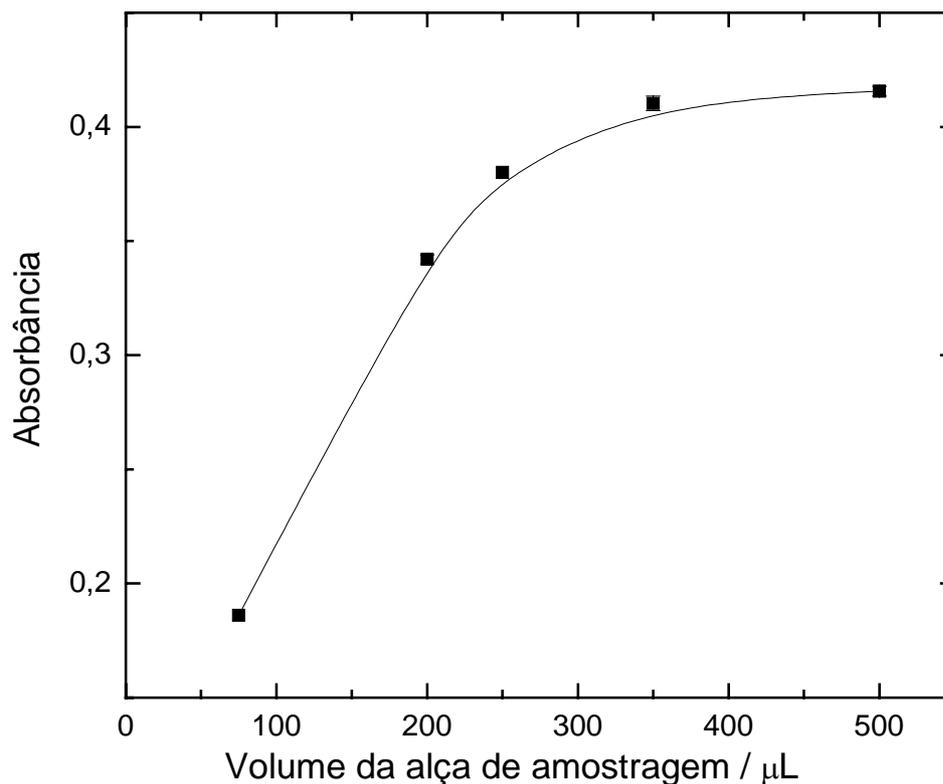


FIGURA 4.17. Efeito do volume da alça de amostragem de 75, 200, 250, 350 e 500 μL , sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $4,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de 1,10-ortofenantrolina $1,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, vazão da solução transportadora de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento da bobina reacional 1 (50 cm), comprimento da bobina reacional 2 (150 cm) e alça do reagente 200 μL .

A influência do comprimento da bobina reacional (B1) sobre o sinal analítico na determinação de N-acetilcisteína, mostrado na FIGURA 4.18, foi avaliada no intervalo de 15 a 70 cm. Não houve uma variação acentuada do sinal analítico com o aumento do comprimento da bobina reacional de 15 para 70 cm. Considerando a melhor frequência analítica e a melhor reprodutibilidade dos sinais a bobina reacional de 15 cm foi selecionado para estudos posteriores.

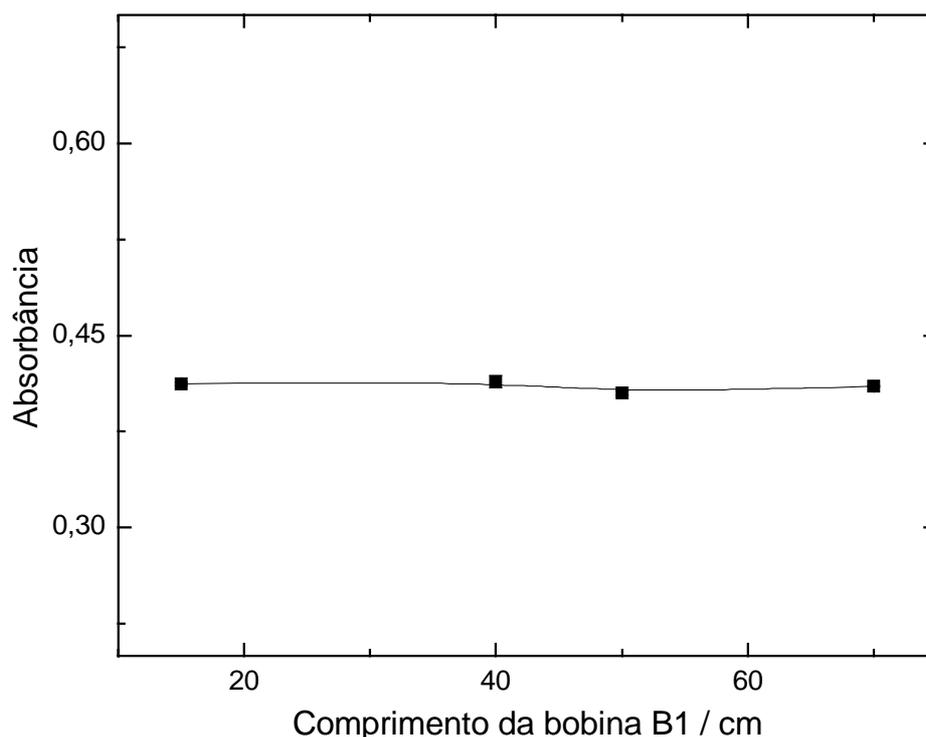


FIGURA 4.18. Efeito do comprimento da bobina reacional B1 de 15, 40, 50 e 70 cm, sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína $4,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de 1,10-ortofenantrolina $1,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, vazão da solução transportadora de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento da bobina reacional 2 (150 cm), volume da alça de amostragem de $350 \mu\text{L}$ e volume da alça do reagente $200 \mu\text{L}$.

A influência do comprimento da bobina reacional (B2), de 40 a 150 cm, sobre o sinal analítico é mostrado na FIGURA 4.19. Para uma solução de N-acetilcisteína de concentração $2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, não houve um acréscimo acentuado do sinal analítico com o aumento do comprimento da bobina reacional de 40 para 70 cm, uma vez que a absorbância não variou apreciavelmente. Considerando a melhor repetibilidade dos sinais analíticos obtidos, a bobina de 70 cm foi selecionada para estudos posteriores.

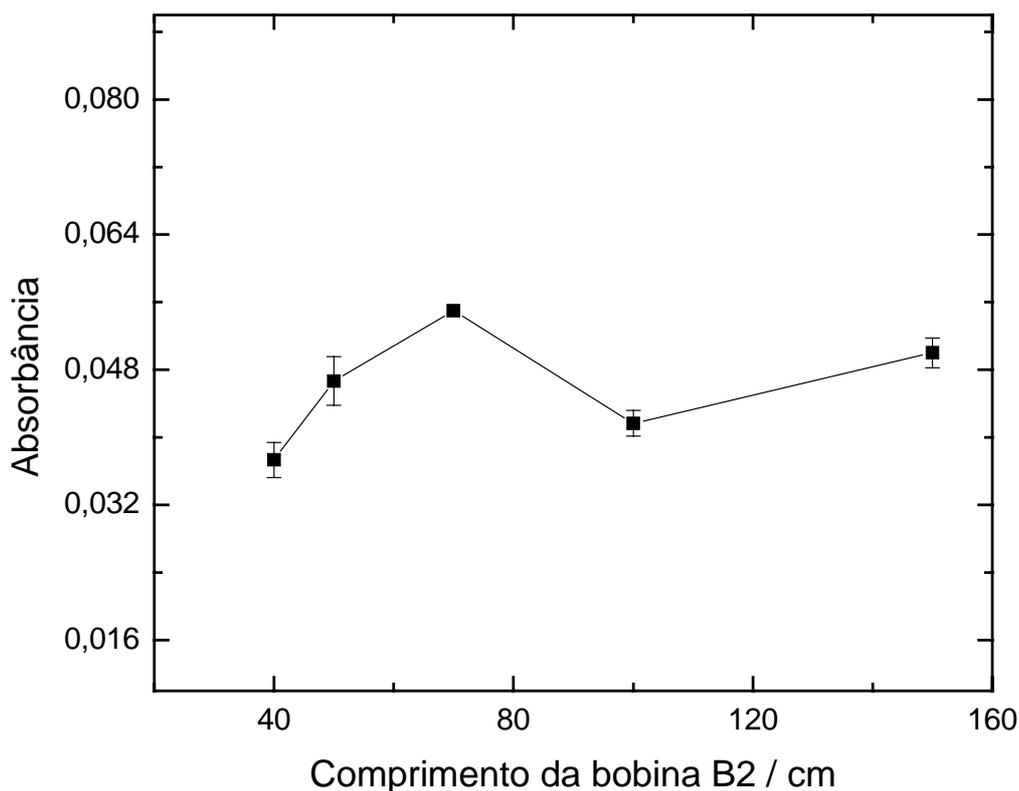


FIGURA 4.19. Efeito do comprimento da bobina B2 de 40, 50, 70, 100 e 150 cm, sobre o sinal analítico (n=3) para uma concentração de N-acetilcisteína $2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de 1,10-ortofenantrolina $1,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, vazão da solução transportadora de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento da bobina reacional 1 (70 cm), volume da alça de amostragem $350 \mu\text{L}$ e volume da alça do reagente $200 \mu\text{L}$.

4.2.3. Estudo de Interferentes em Potencial

Foram avaliados alguns excipientes normalmente presentes em formulações farmacêuticas que podem interferir na determinação de N-acetilcisteína (TABELA 4.4). As substâncias avaliadas foram: sacarina sódica, sacarose, cloreto de benzalcônio, EDTA e benzoato de sódio em concentrações dez vezes maior que a da N-acetilcisteína ($3,53 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Nenhuma interferência significativa dos excipientes no procedimento de injeção em fluxo foi observada.

TABELA 4.4. Efeito dos excipientes como possíveis interferentes em potencial na determinação de N-acetilcisteína (Nac).

Excipiente	Razão de concentração* (Excipiente:Nac)	Interferência %
Cloreto de benzalcônio	10:1	-4,0
EDTA	10:1	-3,5
Benzoato de sódio	10:1	-3,5
Sacarose	10:1	-4,0
Sacarina	10:1	-1,5

*[N-acetilcisteína] = $3,53 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

4.2.4. Teste de adição e recuperação

No teste de adição e recuperação, três concentrações diferentes de N-acetilcisteína, a saber: $3,67 \times 10^{-5}$, $5,50 \times 10^{-5}$ e $7,34 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (6,0, 9,0 e 12,0 mg L^{-1}) foram adicionadas a duas amostras de formulações farmacêuticas e os resultados comparados com aqueles obtidos com as amostras não adicionadas do padrão. Os resultados estão apresentados na TABELA 4.5. Como pode ser observada, a recuperação variou de 102 a 113% indicando interferência da matriz da amostra no sinal analítico do procedimento proposto. Desta maneira optou-se por analisar as amostras pelo método de adição múltipla de padrão.

TABELA 4.5. Estudo de adição e recuperação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas.

Amostras	Adicionado (mg L^{-1})	Recuperado (mg L^{-1})	% Recuperação
Fluimucil	6,0	$6,6 \pm 0,1$	110
	9,0	$10,0 \pm 0,1$	111
	12,0	$13,6 \pm 0,2$	113
Genérico	6,0	$6,8 \pm 0,1$	113
	9,0	$9,2 \pm 0,1$	102
	12,0	$13,3 \pm 0,1$	111

4.2.6. Estudo da Repetibilidade e Freqüência de Amostragem

Estudou-se a repetibilidade do procedimento analítico para concentrações de solução padrão de N-acetilcisteína $3,77 \times 10^{-5}$ e $1,13 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ obtendo-se desvios padrões relativos de 0,1 e 0,4%, respectivamente (FIGURA 4.20). A freqüência de amostragem foi de 60 determinações por hora.

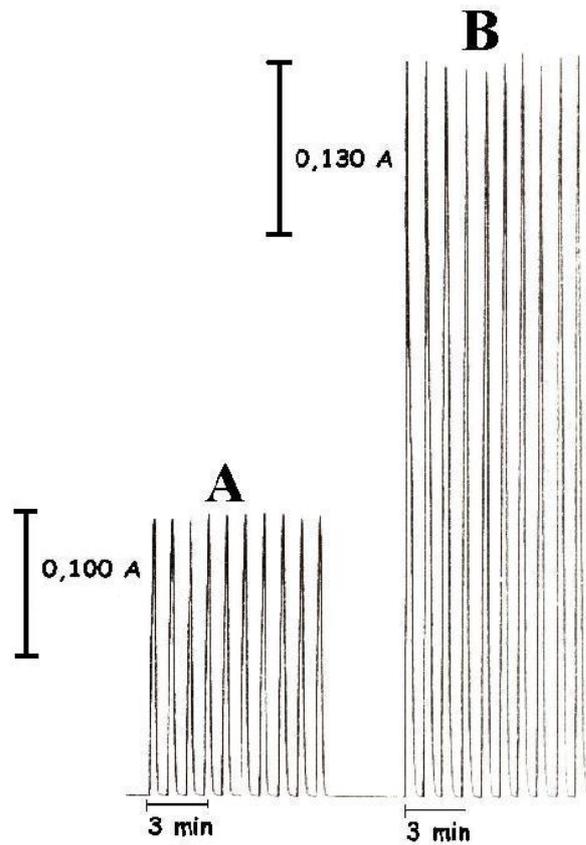


FIGURA 4.20. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de N-acetilcisteína nas concentrações de (A) $3,77 \times 10^{-5}$ e (B) $1,13 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. As condições experimentais do sistema em fluxo são aquelas apresentadas no item 3.6.2.

4.2.7. Curva Analítica

A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de N-acetilcisteína entre $1,8 \times 10^{-5}$ e $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($A = 0,015 + 4760C$; $r = 0,9990$ onde A é a absorvância e C a concentração de N-acetilcisteína em mol L⁻¹) e um limite de detecção de $6,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica), conforme apresentado na FIGURA 4.21.

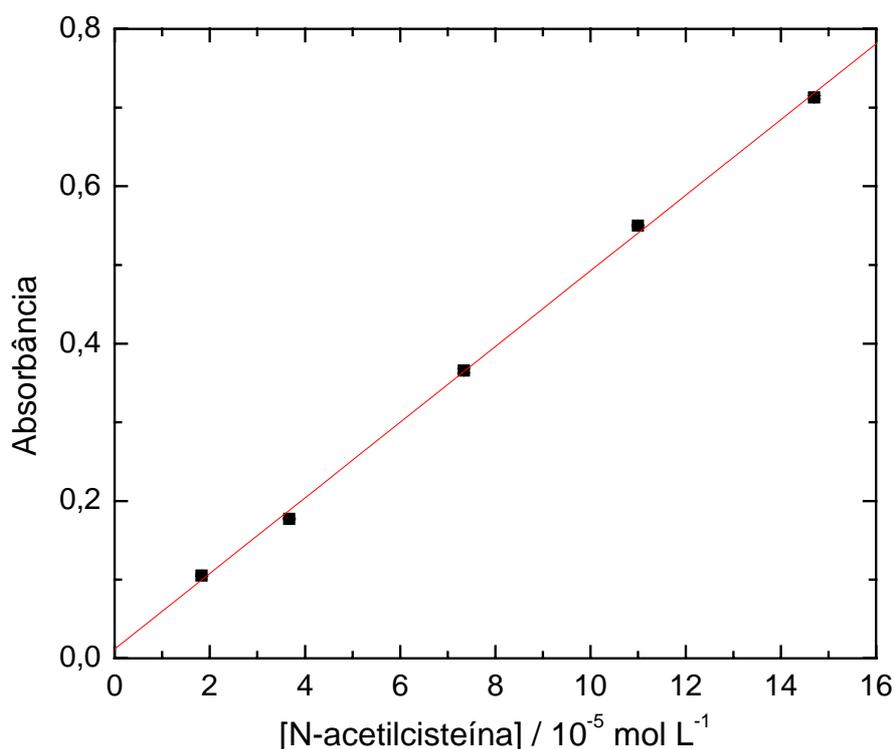


FIGURA 4.21. Curva analítica para determinação de N-acetilcisteína utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto.

Os sinais transientes obtidos em triplicatas (branco, $1,83 \times 10^{-5}$, $3,67 \times 10^{-5}$, $7,34 \times 10^{-5}$, $1,10 \times 10^{-4}$ e $1,47 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) das soluções de referência de N-acetilcisteína injetadas no sistema em fluxo, são mostradas na FIGURA 4.22.

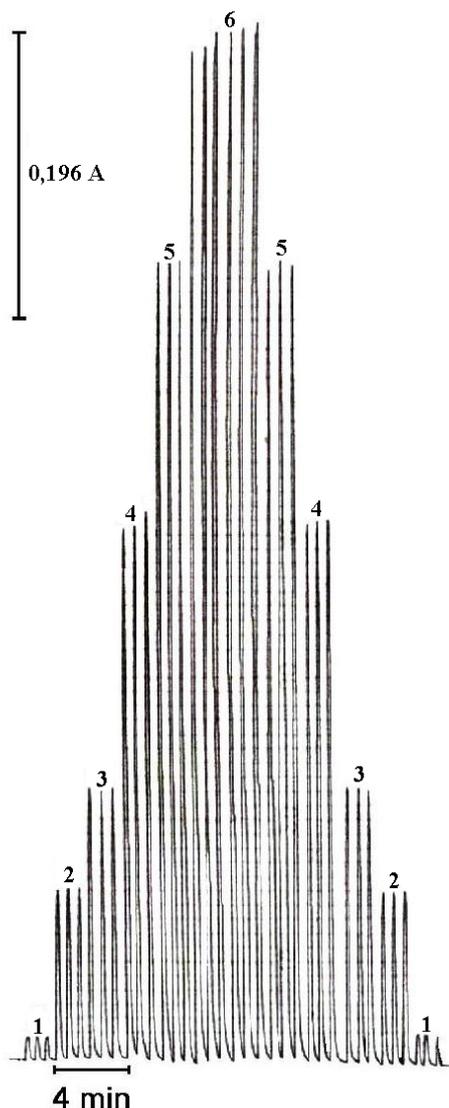


FIGURA 4.22. Sinais transientes em triplicatas (1) do branco e das soluções de referência de N-acetilcisteína nas concentrações de (2) $1,83 \times 10^{-5}$, (3) $3,67 \times 10^{-5}$, (4) $7,34 \times 10^{-5}$ (5) $1,10 \times 10^{-4}$ e (6) $1,47 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. As condições do sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.6.2.

4.2.8. Aplicação

O método proposto foi aplicado na determinação de N-acetilcisteína em duas formulações farmacêuticas e os resultados comparados com aqueles obtidos empregando-se o método comparativo²².

Os resultados obtidos empregando-se o procedimento em fluxo desenvolvido e o método comparativo são apresentados na TABELA 4.6. Há um nível de confiança de 95%, os resultados encontrados foram concordantes dentro de

um intervalo de erro aceitável, mostrando-se assim a confiabilidade do procedimento em fluxo desenvolvido e a importância do mesmo.

TABELA 4.6. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o método comparativo.

Amostras	N-acetilcisteína ^a / mg/g			Erro	
	Rotulado	Comparativo	Proposto	Er ₁ / %	Er ₂ / %
Fluimucil	20	20,2 ± 1	19,8 ± 0,3	-1,9	-1,0
Genérico	20	19,5 ± 1	20,4 ± 0,1	4,6	2,0

^aadição de padrão

Er₁, erro relativo entre o método FIA e o método comparativo

Er₂, erro relativo entre o método FIA e o valor rotulado

A FIGURA 4.23, apresenta os sinais transientes e a curva analítica obtida na determinações empregando-se o método de adição múltipla de padrões da amostra do medicamento Genérico.

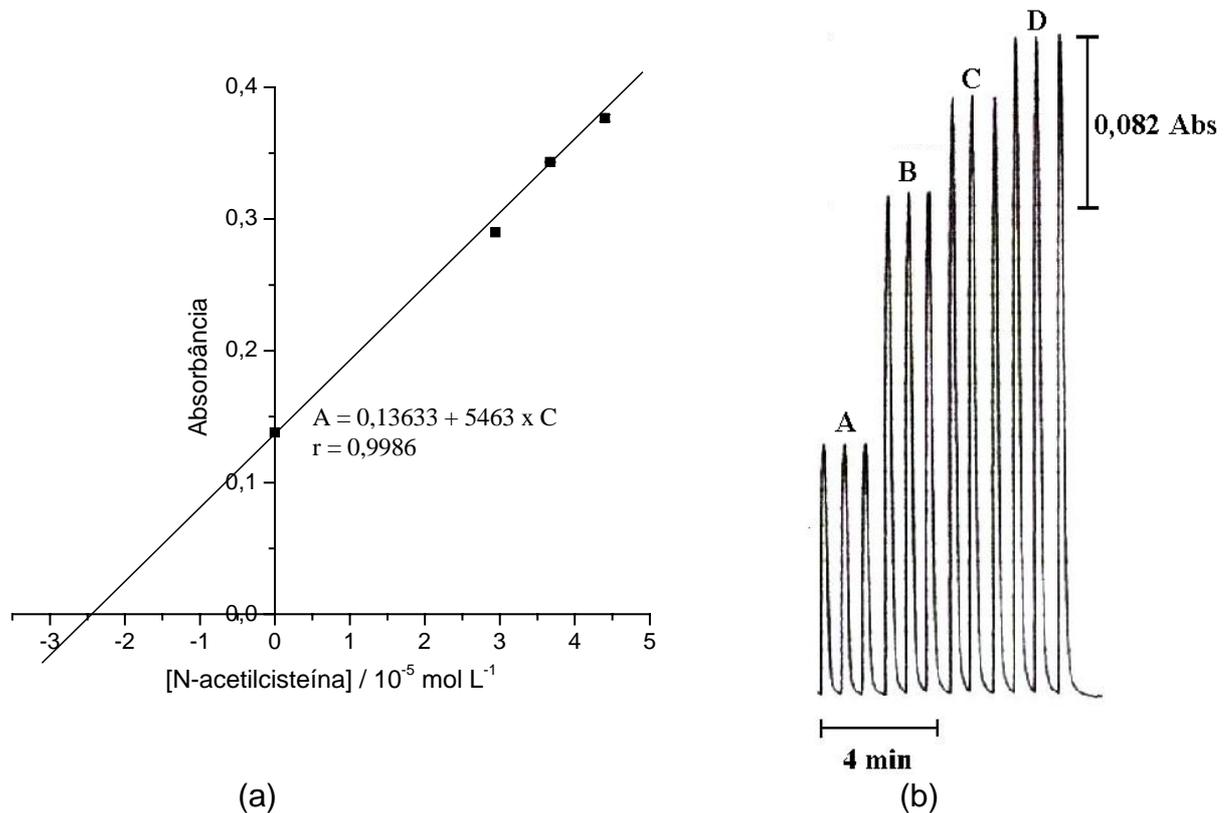


FIGURA 4.23. (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de N-acetilcisteína em uma formulação farmacêutica (Genérico). (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de N-acetilcisteína a cada balão volumétrico: (A) sem adição, (B) $2,93 \times 10^{-5}$, (C) $3,67 \times 10^{-5}$ e (D) $4,40 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

4.3. Determinação Voltamétrica de N-acetilcisteína Utilizando um Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado (EPCM) com Hexacianoferrato (III) de Cobre (II)

Os hexacianoferratos metálicos apresentam interessantes propriedades de óxido-redução, que são acompanhadas pela mudança das propriedades de troca iônica e eletrocatalítica, sendo as suas reações eletroquímicas baseadas em duas características:

- a presença de um par redox ativo de íons metálicos como $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. A FIGURA 4.24 mostra o $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ acoplado a unidade do hexacianoferrato, e o Cu^{2+} estabilizado pela coordenação com o nitrogênio;
- a presença de canais ou cavidades que podem alojar íons metálicos como Na^+ , K^+ , Ag^+ e Fe^{3+} . Esses íons podem difundir através da estrutura cristalina

do hexacianoferrato (transferidos de uma solução aquosa), devido a capacidade de redução no centro redox, para manter o equilíbrio de cargas na estrutura. Quando o centro redox é oxidado esses íons são expelidos⁶⁶.

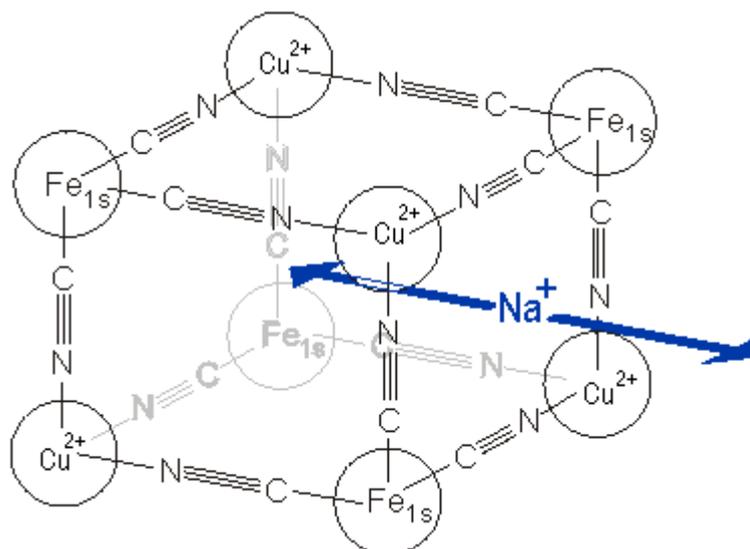
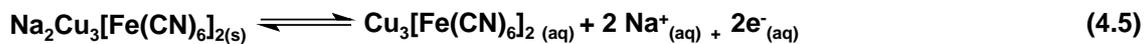


FIGURA 4.24. Estrutura cristalina do hexacianoferrato (III) de cobre (II) em solução contendo íons sódio.

Neste trabalho foi desenvolvido um eletrodo de pasta de carbono modificado com hexacianoferrato (III) de cobre (II) para a determinação voltamétrica de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas.

O mecanismo de funcionamento do EPCM com hexacianoferrato (III) de cobre (II) foi baseado em duas reações redox. A primeira envolve a redução de Fe(III) pela N-acetilcisteína (R-SH) na pasta de carbono formando Fe(II) na superfície do eletrodo e a diacetilcisteína em solução (EQUAÇÃO 4.4). O íon Fe(II) formado é então oxidado eletroquimicamente a Fe (III) como mostrado na EQUAÇÃO 4.5. A corrente de pico anódico obtida em potencial +0,85 V (vs Ag/AgCl) é proporcional à concentração de N-acetilcisteína em solução. O uso do modificador hexacianoferrato(III) de cobre(II) para a determinação de N-acetilcisteína, é justificado pois a eletrooxidação da N-acetilcisteína utilizando um eletrodo de pasta de carbono não modificado demonstrou ocorrer em potenciais mais positivos que 1,2 V, não sendo possível se observar em sistemas aquosos devido à eletrooxidação da água. Apesar do potencial mais positivo atribuído ao par redox Fe(II)/Fe(III), (+0,85 V) em relação ao potencial desse mesmo sistema quando em solução aquosa, observou-se um incremento de corrente de pico anódico, em presença de N-acetilcisteína.



A FIGURA 4.25 mostra o esquema do eletrodo modificado para a determinação de N-acetilcisteína.

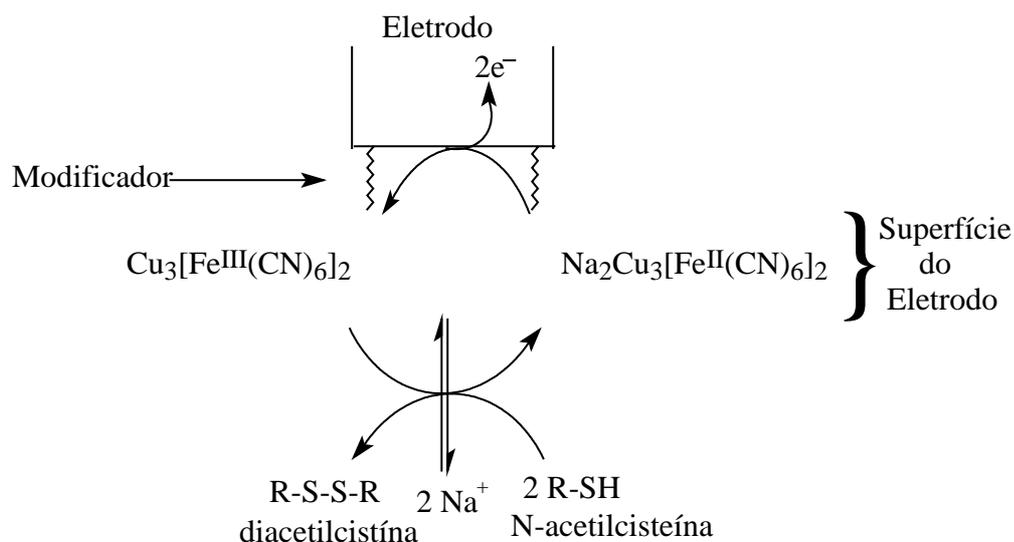


FIGURA 4.25. Mecanismo proposto para a resposta voltamétrica do eletrodo modificado (EPCM).

4.3.1. Estudo do Comportamento Voltamétrico do EPCM com Hexacianoferrato (III) de Cobre (II)

O comportamento eletroquímico do EPCM com hexacianoferrato (III) de cobre (II) foi investigado por voltametria cíclica em solução tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0). O voltamograma cíclico é apresentado na Figura 4.26. Nessa figura pode ser observado um par redox, com um pico anódico em $0,85 \text{ V}$ vs Ag/AgCl, atribuído ao processo Fe(II)/Fe(III) e um pico catódico em $0,56 \text{ V}$ vs Ag/AgCl, atribuído ao processo Fe(III)/Fe(II) .

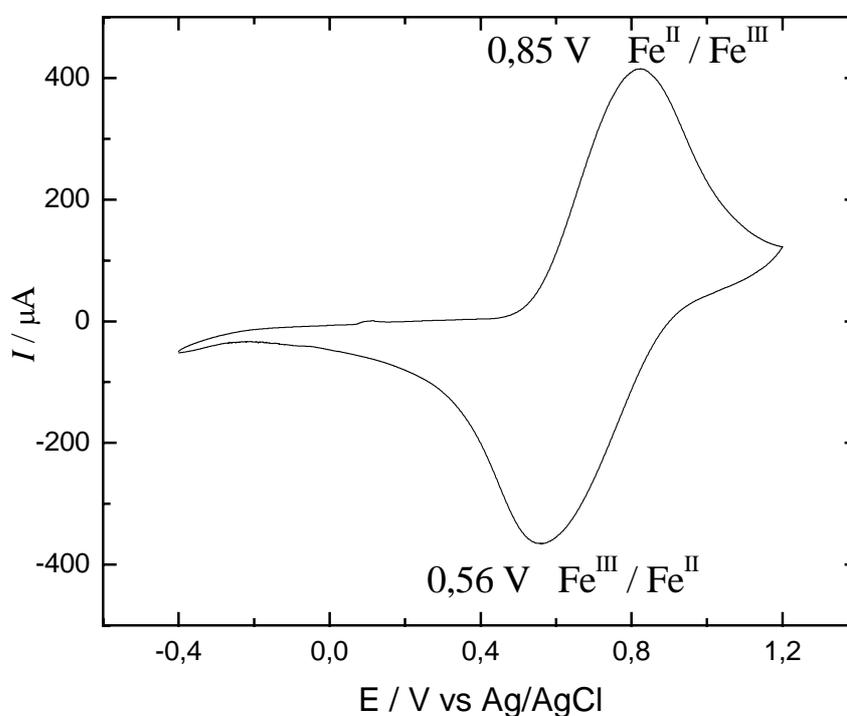


Figura 4.26. Voltamograma cíclico do hexacianoferrato (III) de cobre (II) em solução tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0), empregando o EPCM.

A FIGURA 4.27 mostra voltamogramas lineares típicos obtidos para EPC e EPCM com hexacianoferrato (III) de cobre (II) em solução de tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) na ausência e na presença de N-acetilcisteína $4,94 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

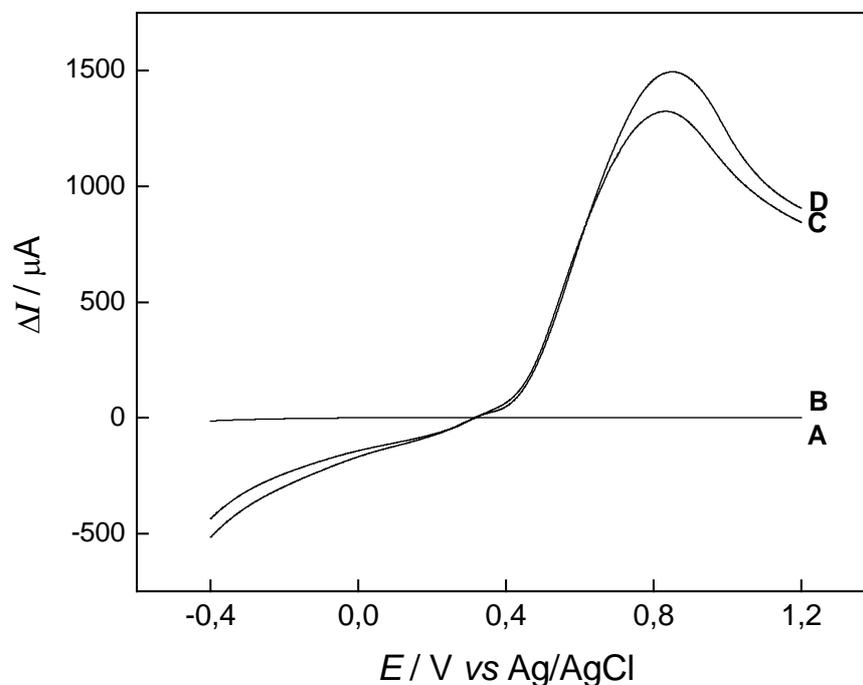


FIGURA 4.27. Determinação voltamétrica de N-acetilcisteína em solução tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, com uma velocidade de varredura de potencial de 10 mV s^{-1} a 25° C . (A) EPC na ausência de N-acetilcisteína; (B) EPC na presença de N-acetilcisteína $4,94 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (C) EPCM na ausência de N-acetilcisteína e (D) EPCM na presença de N-acetilcisteína $4,94 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.2. Efeito do Eletrólito de Suporte

O comportamento voltamétrico do eletrodo de pasta de carbono modificado com hexacianoferrato (III) de cobre (II) (FIGURA 4.28) foi investigado em tampão acetato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0, contendo $4,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de metais alcalinos (Na^+ e K^+) e alcalino-terrosos (Ca^{2+} e Mg^{2+}). Para o eletrodo modificado, observou-se uma diminuição do potencial de oxidação da espécie $\text{Cu}_3\text{Na}_2[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_2$ sobre a superfície do eletrodo de pasta de carbono quando empregou-se como solução eletrolítica cátions dos metais alcalinos de menor raio iônico, como é o caso do Na^+ ,

evidenciando assim influência do contra-íon no comportamento voltamétrico do eletrodo de pasta de carbono empregado nesse trabalho.

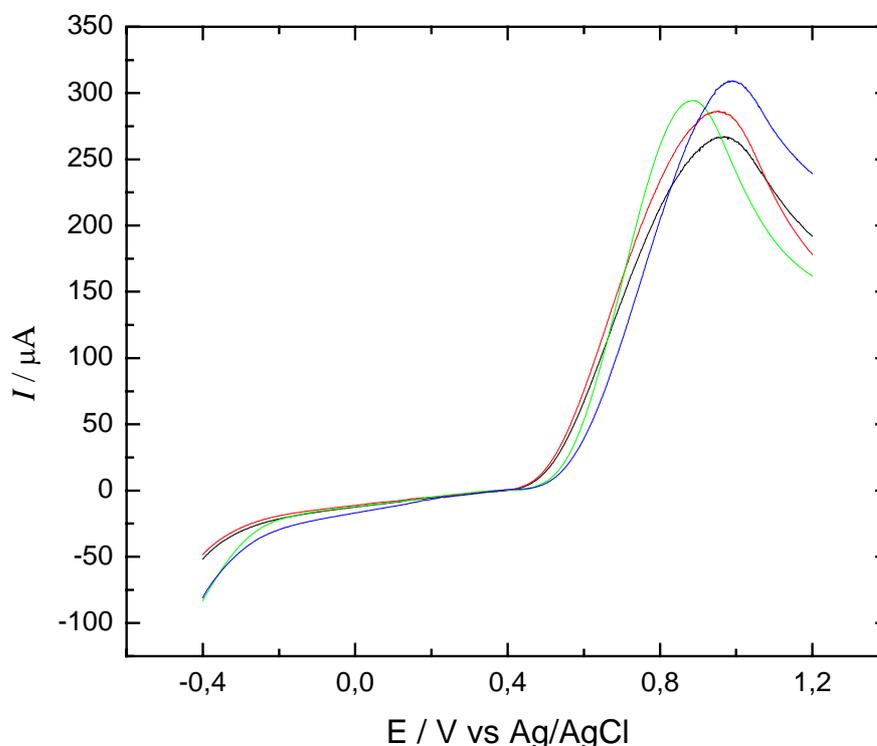


FIGURA 4.28. Voltamogramas lineares para um EPCM com $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ em diferentes eletrólitos suporte na concentração de $4,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. (—) Ca^{2+} ; (—) Mg^{2+} ; (—) Na^+ e (—) K^+ a 25°C .

A mudança de potencial induzido pela substituição dos cátions dos metais alcalinos no eletrólito suporte foi também observado em outros hexacianoferratos metálicos⁶⁷⁻⁶⁹. Embora diversos artigos sugerem o uso do íon potássio com eletrólito suporte⁷⁰⁻⁷², o íon Na^+ foi escolhido por apresentar melhor perfil voltamétrico e deslocar o potencial de pico anódico para potencial menor que aquele verificado no estudo empregando o K^+ como contra-íon. Este fato poderia ser relacionado com o método escolhido para a preparação do $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$, que conduz a uma má formação do material cristalino. A resposta voltamétrica do eletrodo de pasta de carbono modificado com $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ foi afetada também pela concentração dos íons sódio no eletrólito suporte (FIGURA 4.29). A corrente de pico anódica aumentou com o aumento da concentração de sódio no eletrólito suporte. Assim, solução tampão acetato contendo $0,35 \text{ mol L}^{-1}$ de íons sódio foi usada para os demais experimentos.

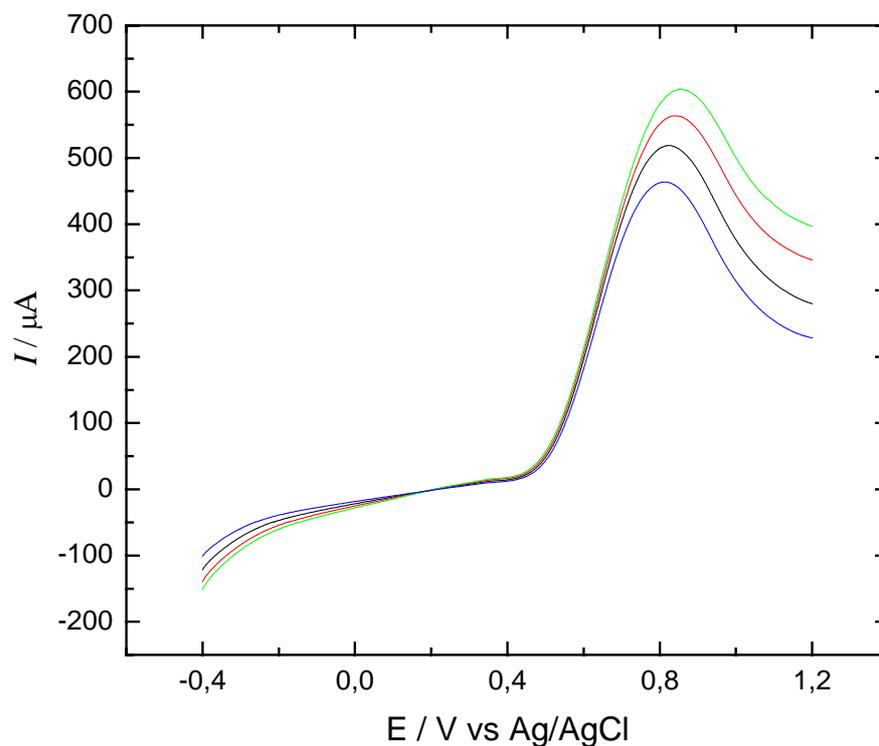


FIGURA 4.29. Voltamogramas lineares para um EPCM com $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ em diferentes concentrações de Na^+ . (—) 0,10 ; (—) 0,20 ; (—) 0,30 e (—) 0,35 mol L^{-1} em solução tampão acetato 0,2 mol L^{-1} .

4.3.3. Efeito da Composição da Pasta de Carbono Modificada

O efeito da composição da pasta sobre a resposta voltamétrica do eletrodo modificado foi inicialmente avaliado no intervalo de 10 a 35% (m/m), em uma solução tampão acetato 0,05 mol L^{-1} (pH 4,8). A FIGURA 4.30 mostra o efeito da porcentagem em massa de $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ presente na pasta de carbono sobre a resposta do eletrodo.

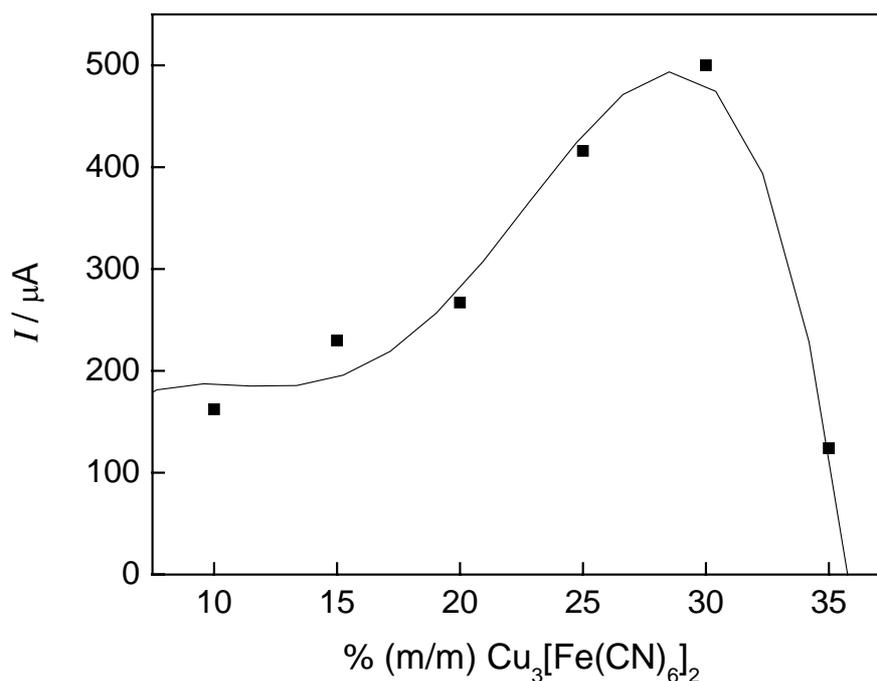


FIGURA 4.30. Estudo da composição da pasta de carbono sobre a resposta voltamétrica em uma solução tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0); $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, a 25° C .

Como pode ser observado nessa figura, o aumento da concentração de $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ na pasta levou a um aumento na corrente de pico anódica obtida até uma composição de 30% (m/m). Para concentrações de $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ superiores a 30% (m/m) obteve-se correntes de pico menores, devido provavelmente ao aumento da resistência da pasta de carbono causada pela diminuição da concentração de grafite na mesma⁷³. Por apresentar um melhor perfil voltamétrico, uma composição de 20% (m/m) de $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$, 60% (m/m) de pó de grafite e 25% (m/m) de óleo mineral foi escolhida.

..

4.3.4. Efeito do pH

O comportamento eletroquímico de eletrodo de pasta de carbono modificado com $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ (20% m/m) foi estudado em um intervalo de pH de 3,0 a 8,0 na ausência e na presença de uma solução de N-acetilcisteína $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A FIGURA 4.31 mostra o efeito do pH sobre a corrente de pico anódica do eletrodo modificado. Em ambas condições, observou-se que a influência do pH sobre a resposta do eletrodo modificado apresenta o mesmo comportamento. Foi

observado que a corrente de pico anódica tem uma pequena variação no intervalo de pH entre 3,0 e 5,0 seguido de um aumento significativo quando em pH 6,0. Esse comportamento pode ser explicado devido a influência dos íons H^+ na cinética de reação entre o N-acetilcisteína e o $Cu_3[Fe(CN)_6]_2$ na superfície do eletrodo. Em regiões de pH maiores que 6,0, a corrente de pico anódica decresce devido provavelmente a passivação do eletrodo ($Cu_3[Fe(CN)_6]_2$ reage com OH^- formando óxidos e/ou hidróxidos de cobre na superfície do eletrodo). Sendo assim, uma solução tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) foi escolhida para estudos posteriores.

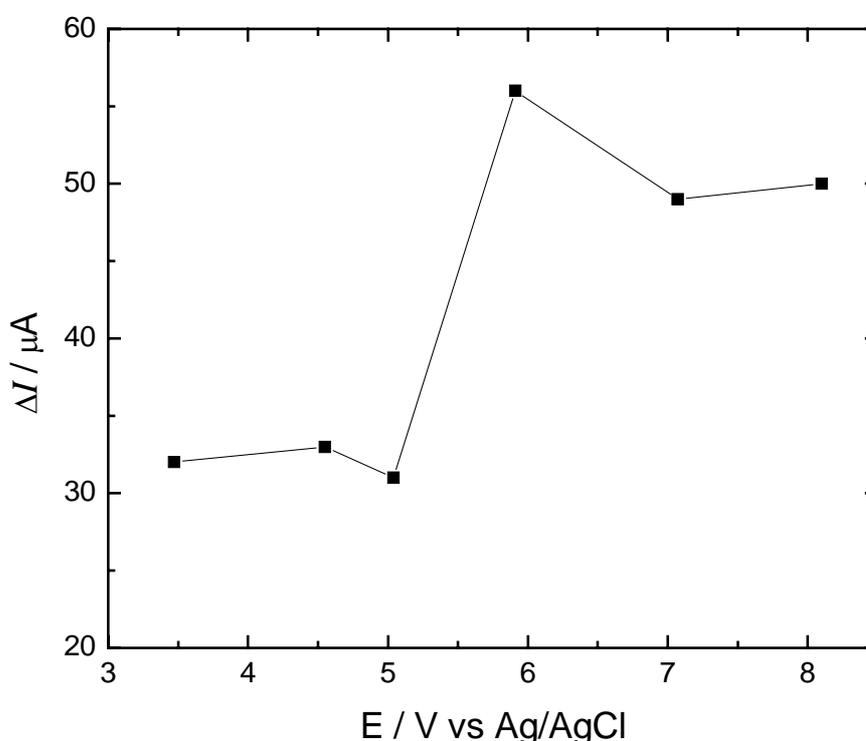


FIGURA 4.31. Influência do pH na resposta voltamétrica do eletrodo de pasta de carbono modificado com 20% (m/m) de $Cu_3[Fe(CN)_6]_2$ em solução tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.5. Efeito da Velocidade de Varredura de Potenciais

O efeito da velocidade de varredura de potenciais na resposta voltamétrica do eletrodo de pasta de carbono modificado com $Cu_3[Fe(CN)_6]_2$ 20% (m/m) em solução tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) foi investigado na ausência e na presença de $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de N-acetilcisteína em um intervalo de 10 a 100 mV s^{-1} . A FIGURA 4.32 mostra que a dependência das correntes de pico anódica, referente ao processo de oxidação na superfície do eletrodo, com a raiz quadrada da

velocidade de varredura de potenciais apresenta uma linearidade indicando que o processo é difusional. Esta difusão é decorrente do movimento dos íons sódio à superfície do eletrodo.

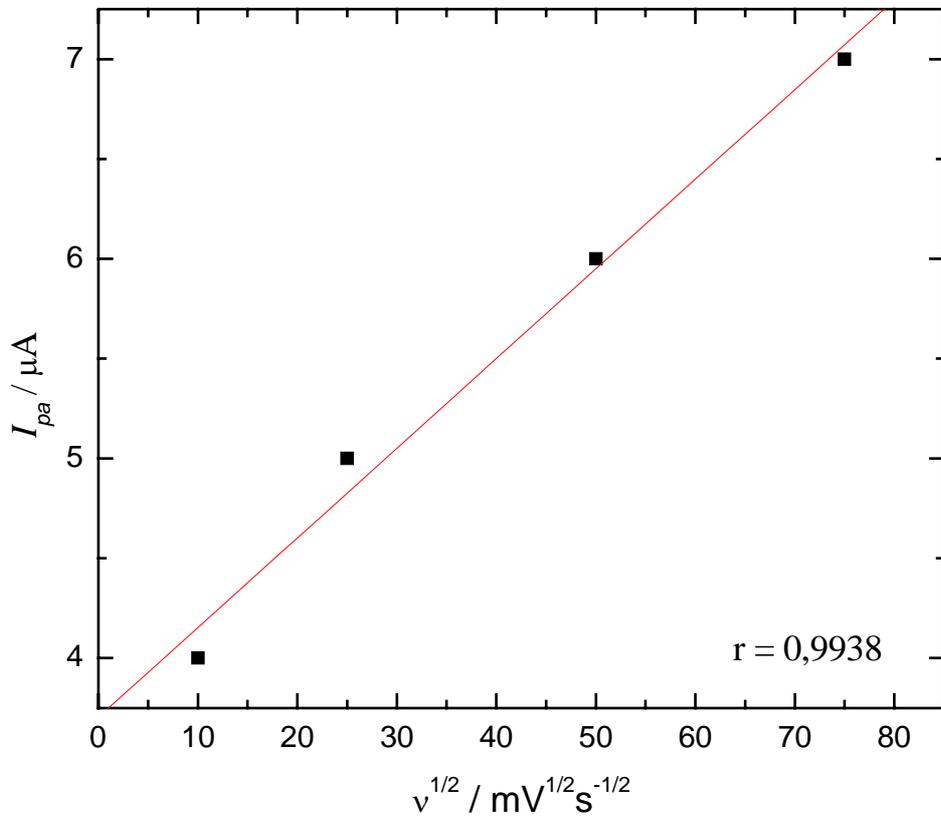


FIGURA 4.32. Efeito da raiz quadrada da velocidade de varredura no processo difusional das espécies referentes ao processo de oxidação do N-acetilcisteína $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na superfície do eletrodo em solução tampão acetato pH 6,0, a 25° C .

A FIGURA 4.33 mostra o efeito da velocidade de varredura de potenciais no perfil voltamétrico.

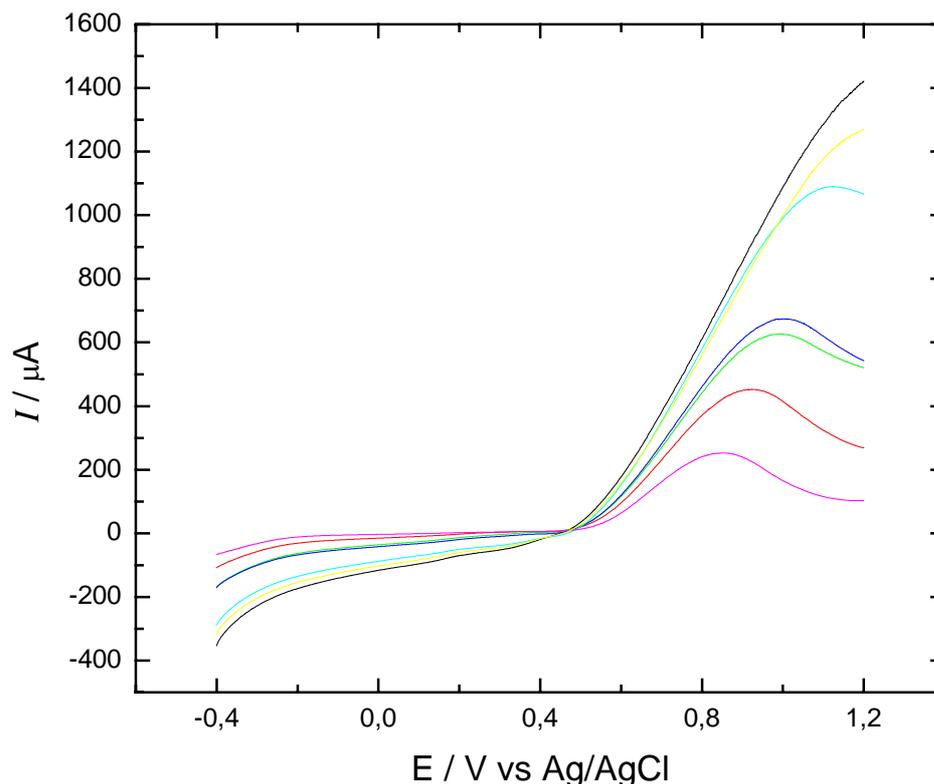


FIGURA 4.33. Voltamogramas lineares para um EPCM com $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ em diferentes velocidades de varredura de potenciais (mV s^{-1}). N-acetilcisteína $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0, a 25° C . (—) 5; (—) 10; (—) 15; (—) 20; (—) 50; (—) 75 e (—) 100.

Em velocidades acima de 10 mV s^{-1} , os voltamogramas não apresentaram uma boa definição dos picos anódicos, e apresentaram um deslocamento de potencial de pico anódico para valores mais positivos, indicando que a cinética entre o hexacianoferrato e a N-acetilcisteína é lenta. Em virtude destes resultados, foi escolhida uma velocidade de varredura de potenciais de 10 mV s^{-1} , pois esta apresentou um melhor perfil voltamétrico.

4.3.6. Estudo de Interferentes em Potencial

Foram avaliados alguns excipientes presentes em amostras comerciais que podem interferir na determinação de N-acetilcisteína. As substâncias avaliadas foram: cloreto de benzalcônio, sacarose, sacarina e EDTA em tampão acetato pH 6,0 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) em uma razão de concentração de 10:1 (interferente:analito), sendo a concentração de N-acetilcisteína ($5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Todas as substâncias investigadas causaram interferência positiva significativa na determinação de N-

acetilcisteína. Entretanto, nenhuma dessas substâncias são encontradas nessa razão de concentração em formulações farmacêuticas comerciais. Para uma razão de concentração de 1:1 (interferente:analito) nenhuma dessas substâncias causou interferência significativa (< 5,0%).

4.3.7. Curva Analítica

Após otimizar as melhores condições de trabalho para o eletrodo de pasta de carbono, realizaram-se medidas voltamétricas no intervalo de potencial de -0,4 a +1,2 V (vs. Ag/AgCl) em diferentes concentrações de N-acetilcisteína, a fim de se obter uma curva analítica.

A FIGURA 4.34 mostra a curva analítica obtida para a N-acetilcisteína. A equação da curva analítica obtida foi $\Delta I_{pa} (\mu A) = 56 + 166228 [N\text{-acetilcisteína}]$ (mol L^{-1}), para o intervalo de concentrações de $1,2 \times 10^{-4}$ a $8,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com limite de detecção de $6,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (3 vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica) e desvio padrão relativo de 1,0% ($n = 3$).

Uma série de oito medidas sucessivas de N-acetilcisteína na concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram realizadas para avaliar a repetibilidade da resposta do eletrodo. A superfície do eletrodo não foi renovada entre cada medida voltamétrica. Obteve-se assim, um desvio padrão de 2% para a corrente de pico anódica.

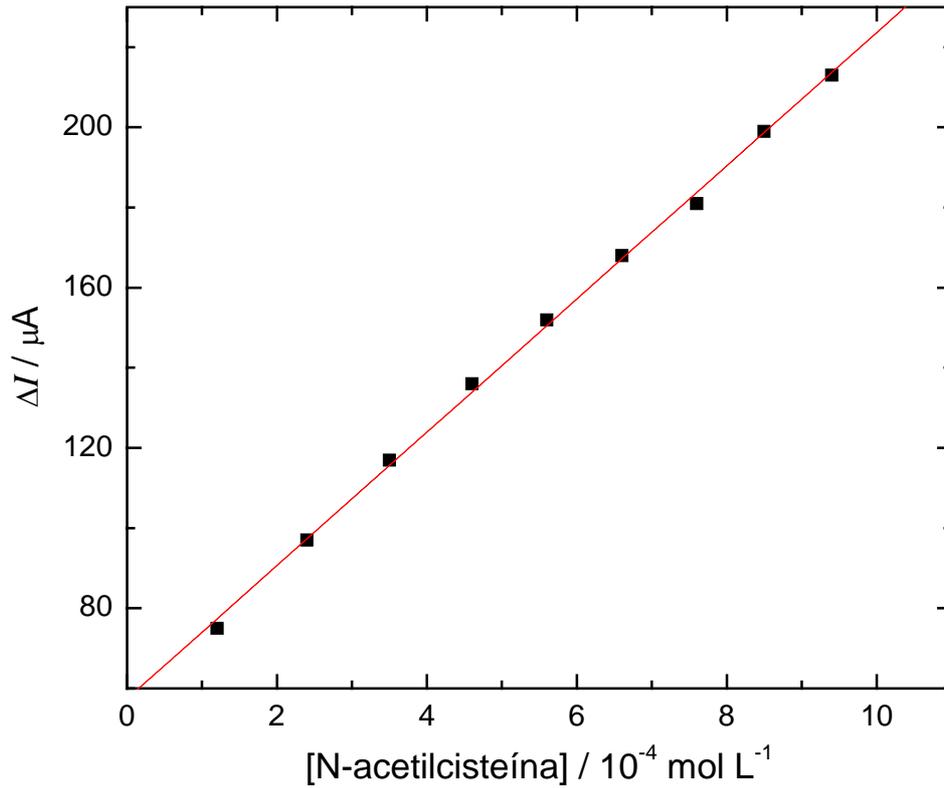


FIGURA 4.34. Curva analítica obtida para N-acetilcisteína empregando-se um EPCM com hexacianoferrato (III) de cobre (II) em solução tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 6,0), a 25 °C.

Os voltamogramas lineares obtidos para a construção da curva analítica são mostrados FIGURA 4.35

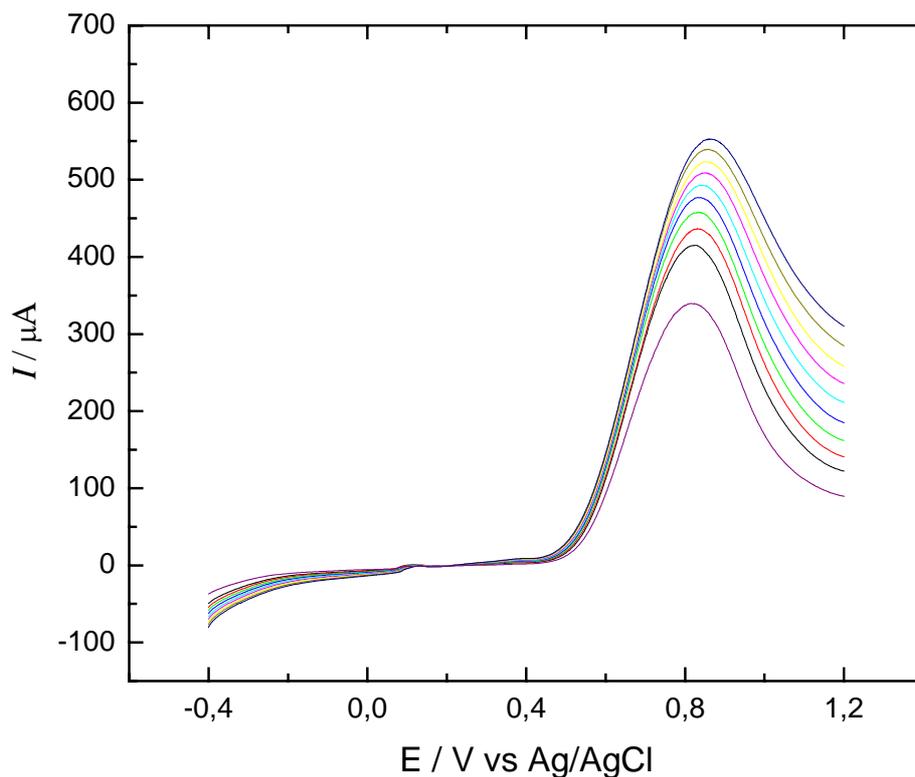


FIGURA 4.35. Voltamogramas lineares para um EPCM com $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ em diferentes concentrações de N-acetilcisteína em solução tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0, a 25° C . (—) branco; (—) 1,2; (—) 2,4; (—) 3,5; (—) 4,6; (—) 5,6; (—) 6,6; (—) 7,6; (—) 8,5 e (—) $9,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.8. Aplicação

O método proposto foi aplicado na determinação de N-acetilcisteína em duas formulações farmacêuticas e os resultados comparados com aqueles obtidos empregando-se o método comparativo²².

Os resultados obtidos empregando-se o procedimento voltamétrico desenvolvido e o método comparativo são apresentados na TABELA 4.7. Com um nível de confiança de 95%, os resultados encontrados foram concordantes dentro de um intervalo de erro aceitável, mostrando-se assim a confiabilidade do procedimento voltamétrico desenvolvido e a importância do mesmo.

TABELA 4.7. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando-se o método voltamétrico e o método comparativo.

Amostras	N-acetilcisteína			Erro	
	Rotulado	Comparativo	Proposto	Er ₁ / %	Er ₂ / %
Xarope ^a	15	14,8 ± 0,3	16 ± 2	7,5	6,2
Genérico ^b	20	21 ± 1	20 ± 3	-5	0

^a concentração em mg/mL

^b concentração em mg/g

Er₁, erro relativo entre o método voltamétrico e o método comparativo

Er₂, erro relativo entre o método voltamétrico e o valor rotulado

A FIGURA 4.36. apresenta os voltamogramas obtidos na determinação de N-acetilcisteína utilizando o eletrodo de pasta de carbono modificado com hexacianoferrato (III) de cobre (II). Foram adicionadas à solução da amostra comercial (Genérico), três alíquotas de concentrações conhecidas de uma solução padrão de N-acetilcisteína $6,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

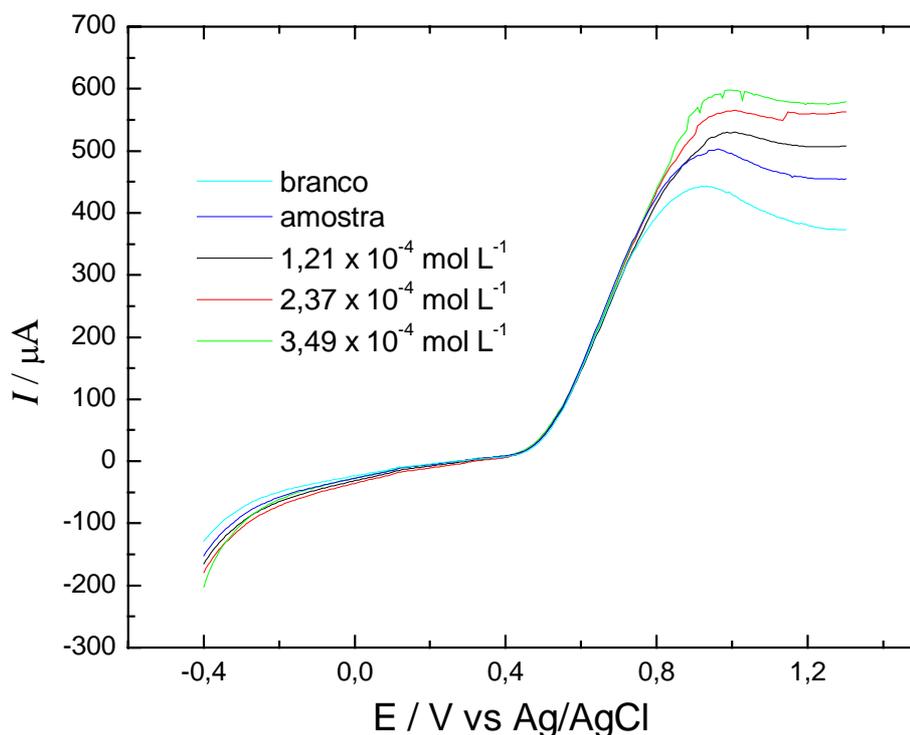


FIGURA 4.36 Voltamogramas obtidos na determinação de N-acetilcisteína utilizando o eletrodo de pasta de carbono modificado com hexacianoferrato (III) de cobre (II) onde: (—) representa o sinal na ausência N-acetilcisteína; (—) Amostra comercial de N-acetilcisteína; (—) adição de solução padrão de N-acetilcisteína na concentração final de $1,21 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (—) adição de solução padrão de N-acetilcisteína na concentração final de $2,37 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, e (—) adição de solução padrão de N-acetilcisteína na concentração final de $3,49 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

A FIGURA 4.37 mostra a curva obtida pelo método de adição múltipla de padrões, para a determinação de N-acetilcisteína utilizando o procedimento proposto.

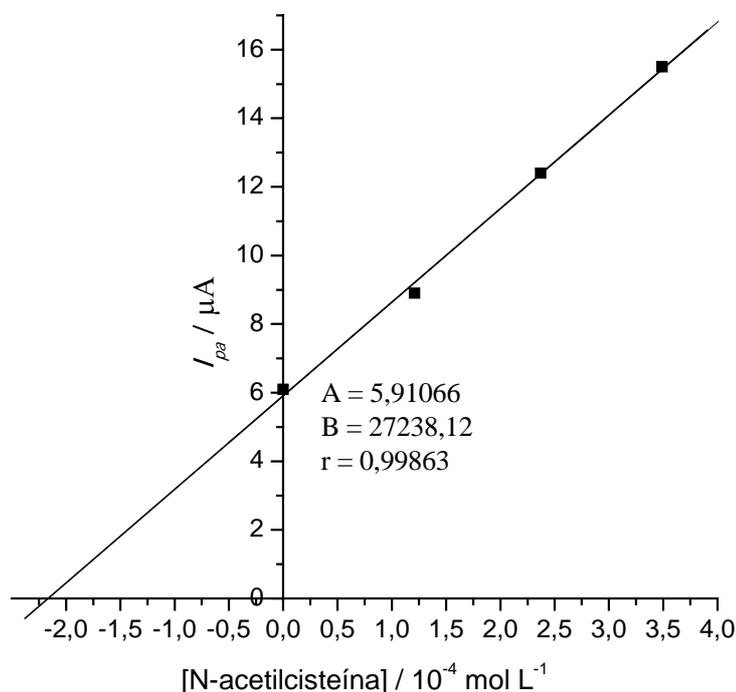


FIGURA 4.37. Curva obtida pelo método de adição múltipla de padrões para a determinação de N-acetilcisteína em uma amostra comercial, empregando-se um EPCM com hexacianoferrato(III) de cobre(II) em solução tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 6,0), a 25 °C.

4.4. Determinação Potenciométrica de N-acetilcisteína empregando Nitrato de Prata como Reagente Titulante.

Foi desenvolvido um método potenciométrico para determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas. O método consiste na precipitação da N-acetilcisteína com os íons prata formando N-acetilcisteínato de prata em meio aquoso (água desionizada) (EQUAÇÃO 4.6).



Para tal metodologia foi utilizado nitrato de prata 5,0 x 10⁻² mol L⁻¹ como titulante, um eletrodo de referência Ag/AgCl com junção dupla e um eletrodo indicador de prata, ambos imersos em uma cela potenciométrica juntamente com 5,0

mL de uma solução $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de N-acetilcisteína. Utilizou-se um potenciômetro (Micronal-B374) e um titulador automático (Schott Gerate-T80/20). O titulante foi adicionado na cela potenciométrica termostaticada em 25°C em incrementos de 0,2 mL, sendo o potencial registrado em intervalos de 30 segundos.

4.4.1. Teste de adição e recuperação

No teste de adição e recuperação, três concentrações diferentes de N-acetilcisteína, a saber: 2,20, 4,42 e 6,63 mg foram adicionadas a três amostras de formulações farmacêuticas e os resultados comparados com aqueles obtidos com as amostras não adicionadas do padrão. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.8., como pode ser observada, a recuperação variou de 98,7 a 103% para as amostras evidenciando interferência pouco significativa da matriz nessas amostras.

TABELA 4.8. Estudo de adição e recuperação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas

Amostras	Adicionado (mg)	Recuperado (mg)	% Recuperação
Fluimucil	2,20	$2,18 \pm 0,05$	99,1
	4,42	$4,52 \pm 0,04$	102
	6,63	$6,56 \pm 0,05$	98,9
Genérico	2,20	$2,20 \pm 0,05$	100
	4,42	$4,55 \pm 0,04$	103
	6,63	$6,54 \pm 0,05$	98,7
Fluicis	2,20	$2,24 \pm 0,02$	102
	4,42	$4,55 \pm 0,03$	103
	6,63	$6,70 \pm 0,01$	101

n=3

4.4.2. Estudo de interferentes em potencial

Foram avaliados alguns excipientes normalmente presentes em formulações farmacêuticas que podem interferir na determinação de N-acetilcisteína (TABELA 4.9). As substâncias avaliadas foram: sacarina sódica, sacarose e EDTA

em concentrações dez vezes maior que a da N-acetilcisteína ($5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). Nenhuma das substâncias investigadas causou interferência significativa na determinação de N-acetilcisteína, assim foi possível a determinação direta de N-acetilcisteína nas formulações farmacêuticas.

TABELA 4.9. Efeito dos excipientes como possíveis interferentes em potencial na determinação de N-acetilcisteína (Nac).

Excipiente	Razão de concentração* (Excipiente:Nac)	Interferência %
EDTA	10:1	-3,7
Sacarose	10:1	-3,9
Sacarina	10:1	-2,7

*[N-acetilcisteína] = $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

4.4.3. Aplicação

O método proposto foi aplicado na determinação de N-acetilcisteína em três formulações farmacêuticas. Os resultados comparados com aqueles obtidos empregando-se o método comparativo.

Na FIGURA 4.38 são apresentadas as curvas de titulação potenciométrica, E (mV) vs volume de titulante (AgNO_3 $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) (a), assim como a curva da primeira derivada de uma titulação potenciométrica obtida para uma solução padrão de N-acetilcisteína (b).

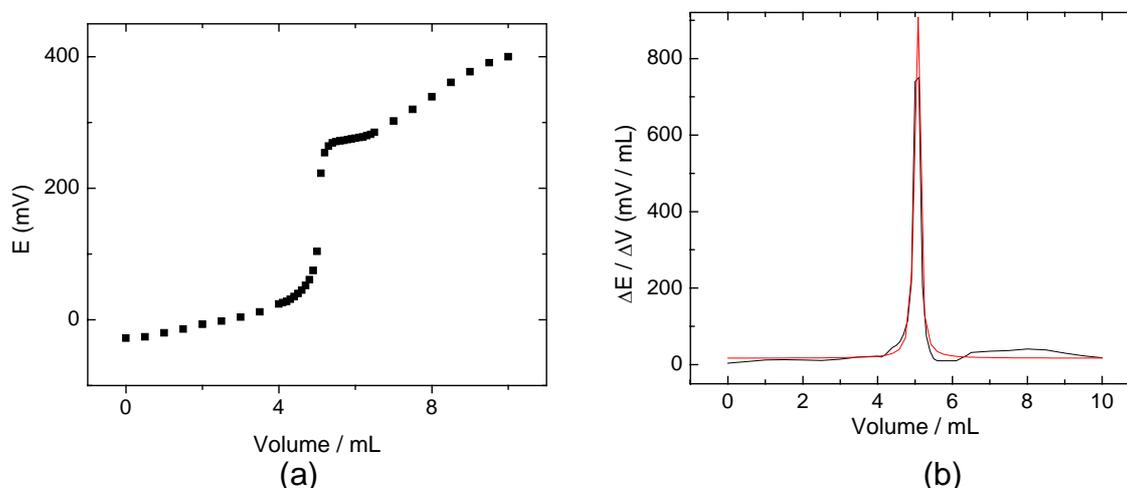


FIGURA 4.38. Curvas potenciométricas da titulação de 5,0 mL de uma solução padrão de N-acetilcisteína empregando solução de nitrato de prata $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ como titulante. (a) Curva da titulação potenciométrica E vs Volume (b) Curva da primeira derivada.

Na FIGURA 4.39 são apresentadas as curvas potenciométricas obtidas na titulação de 5,0 mL de solução de amostra (Fluimucil[®] Granulado - Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda / S.P.), (a) assim como a curva da primeira derivada, (b). Nesta titulação foi obtido uma concentração $4,90 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ da solução dessa amostra que foi equivalente a 39,80 mg/g de amostra.

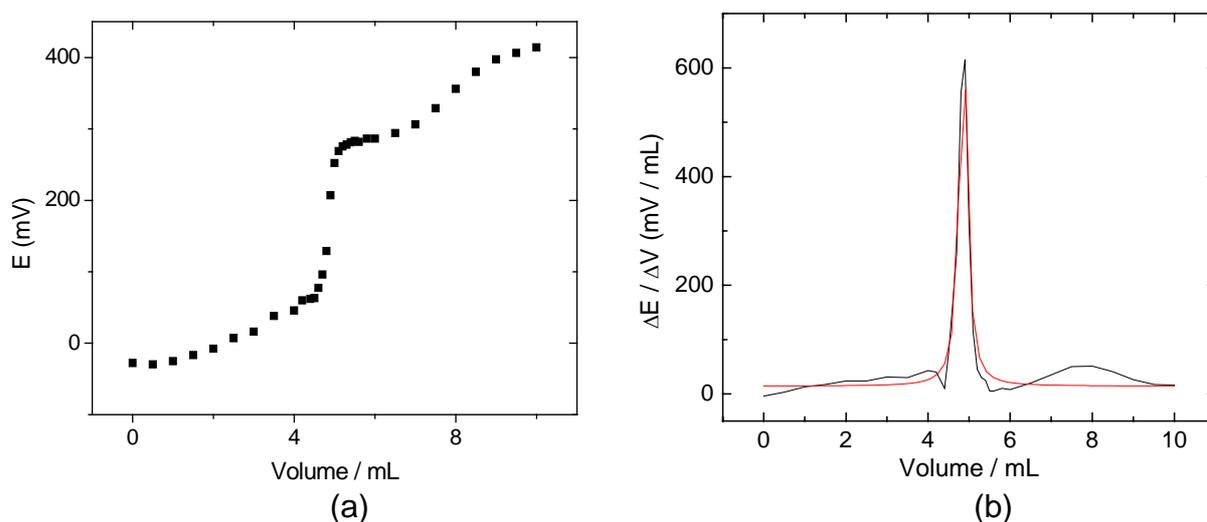


FIGURA 4.39. Curvas potenciométricas da titulação de 5,0 mL de solução de amostra Fluimucil empregando solução de nitrato de prata $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ como titulante. (a) Curva da titulação potenciométrica E vs Volume (b) Curva da primeira derivada.

Na FIGURA 4.40 são apresentadas as curvas potenciométricas obtidas na titulação de 5,0 mL de solução de amostra (Genérico[®] Granulado – Eurofarma / S.P.) (a), assim como a curva da primeira derivada (b). Nesta titulação foi obtido uma concentração de $5,23 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ da solução dessa amostra que foi equivalente a 40,68 mg/g de amostra.

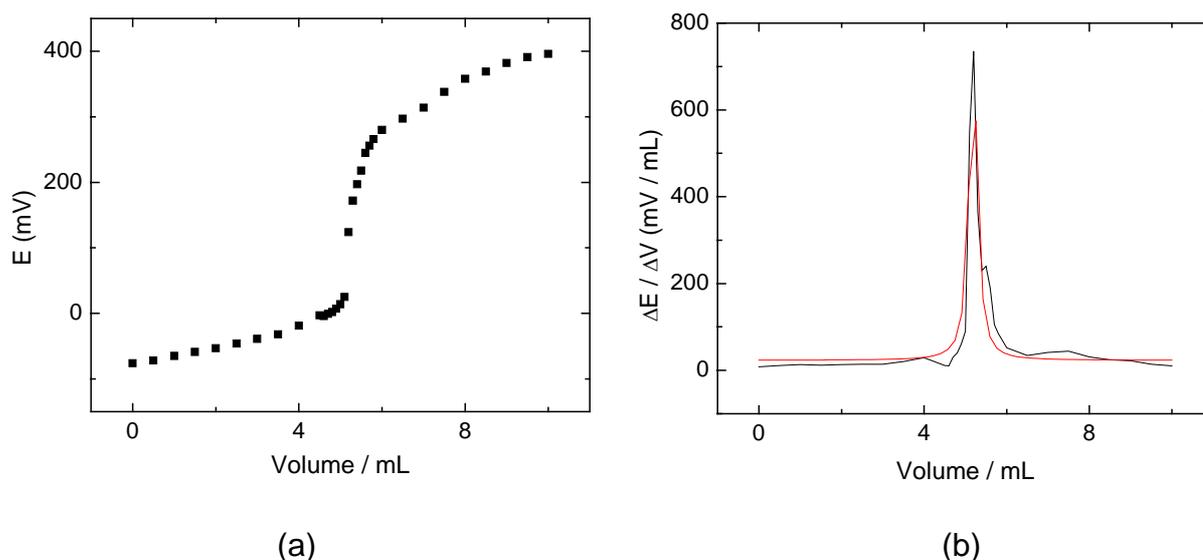


FIGURA 4.40. Curvas potenciométricas da titulação de 5,0 mL de solução de amostra Genérico empregando solução de nitrato de prata $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ como titulante. (a) Curva da titulação potenciométrica E vs Volume (b) Curva da primeira derivada.

Os resultados obtidos empregando-se o procedimento desenvolvido e o método comparativo são apresentados na TABELA 4.7. Com um nível de confiança de 95%, os resultados encontrados foram concordantes dentro de um intervalo de erro aceitável, mostrando-se assim a confiabilidade do procedimento desenvolvido e a importância do mesmo.

TABELA 4.10. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando-se o método proposto e o método comparativo.

Amostras	N-acetilcisteína/ mg/g			Erro	
	Rotulado	Comparativo	Proposto	Er ₁ / %	Er ₂ / %
Fluimucil	40	40,6 ± 0,2	39,9 ± 0,3	-1,7	-0,2
Genérico	40	39,5 ± 0,5	40,2 ± 0,1	1,8	0,5
Fluicis	40	39,4 ± 0,6	39,8 ± 0,3	1,0	-0,5

Er₁, erro relativo entre o método potenciométrico e o método comparativo

Er₂, erro relativo entre o método potenciométrico e o valor rotulado

CAPÍTULO V – TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

CAPÍTULO V – TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Todos os resíduos gerados durante os experimentos foram armazenados e catalogados e levados a Unidade de Gestão de Resíduos da UFSCar.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

Neste trabalho foram desenvolvidos procedimentos analíticos para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção turbidimétrica e espectrofométrica, eletrodo de pasta de carbono modificado (EPCM) com detecção eletroquímica e detecção potenciométrica empregando nitrato de prata como titulante. Nesses procedimentos, foram selecionadas reações de óxido-redução, complexação e precipitação do analito com reagentes apropriados, sendo os respectivos produtos das reações monitorados na forma de cromóforos, suspensões, ou pela geração de uma corrente elétrica.

Os sistemas de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes empregando nitrato de prata como reagente precipitante e 1,10-ortofenantrolina como reagente cromogênico, mostraram-se adequados para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas, sem a necessidade de uso de técnicas cromatográficas, que são morosas e de alto custo.

Em outra etapa do trabalho, um eletrodo de pasta de carbono modificado com o complexo de hexacianoferrato (III) de cobre (II) foi utilizado na determinação voltamétrica de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas. O eletrodo é de baixo custo e de fácil construção, uma vez que este foi preparado misturando-se pó de grafite, o modificador e óleo mineral. Parâmetros experimentais, como natureza do eletrólito suporte, pH e velocidade de varredura de potenciais foram estudados.

Em um procedimento mais simples, foi empregado nitrato de prata como titulante para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas. Nesse procedimento titulou-se a N-acetilcisteína com nitrato de prata gerando um precipitado entre a N-acetilcisteína e os íons Ag^+ . Foi empregado como eletrodo indicador um eletrodo de prata e como eletrodo de referência um eletrodo de Ag/AgCl . Com esse procedimento foi possível a determinação de N-acetilcisteína em três formulações farmacêuticas.

Os resultados obtidos utilizando-se os procedimentos desenvolvidos e aqueles obtidos pelo método comparativo²² foram concordantes a um nível de confiança de 95%.

As Tabelas 5.1 e 5.2 apresentam as figuras de mérito e os resultados obtidos na determinação de N-acetilcisteína em produtos farmacêuticos neste trabalho de mestrado e os descritos na literatura, respectivamente.

TABELA 5.1. Figuras de mérito e resultados obtidos neste trabalho de mestrado.

Detecção/Reagentes	Linearidade / mol L ⁻¹	Recuperação/%	Limite de Detecção / mol L ⁻¹	Frequência de amostragem	Interferente ^a
Turbidimétrica/AgNO ₃	1,0 x 10 ⁻⁴ a 1,0 x 10 ⁻³	102 a 122	8,0 x 10 ⁻⁵	60 h ⁻¹	Cloreto de Benzalcônio
Espectrofotométrica/Fe(III)- 1,10-ortofenantrolina	1,8 x 10 ⁻⁵ a 1,5 x 10 ⁻⁴	102 a 113	6,3 x 10 ⁻⁶	60 h ⁻¹	Não houve interferência
Voltamétrica/EPCM – Cu ₃ [Fe(CN) ₆] ₂	1,2 x 10 ⁻⁴ a 8,3 x 10 ⁻⁴	-	6,3 x 10 ⁻⁵	20	Não houve interferência
Potenciométrica/AgNO ₃	-	97 a 103	-	15	Cloreto de Benzalcônio

^a foram avaliadas substâncias concomitantes normalmente encontradas em produtos comerciais;
- não determinado.

Tabela 5.2. Figuras de mérito dos procedimentos analíticos descritos na literatura para a determinação de N-acetilcisteína.

Detecção/Regentes	Curva Analítica / mol L ⁻¹	Limite de Detecção / mol L ⁻¹	Frequência de amostragem	Referência
Espectrofotométrica / Pd(II)	3,5 x 10 ⁻⁶ a 4,3 x 10 ⁻⁴	1,0 x 10 ⁻⁵	45	23
Espectrofotométrica* / Fe(III)	4,5 x 10 ⁻⁶ a 8,0 x 10 ⁻⁵	2,0 x 10 ⁻⁶	3	22
Voltamétrico	9,6 x 10 ⁻⁴ a 1,4 x 10 ⁻²	1,9 x 10 ⁻⁴	20	25
Potenciométrico	4,0 x 10 ⁻⁶ a 1,0 x 10 ⁻³	1,0 x 10 ⁻⁶	25	26

* Método comparativo

Como pode ser verificado, os sistemas em fluxo desenvolvidos permitem a análise de um número maior de amostras e podem ser implementados em laboratórios de análise que necessitem de procedimentos com alta frequência de amostragem.

Em comparação com outros procedimentos relatados na literatura, os procedimentos desenvolvidos nesse trabalho para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas são precisos, exatos e de baixo custo.

O procedimento envolvendo titulação potenciométrica, além de sua simplicidade, emprega equipamentos comuns de laboratório e de fácil operação.

O procedimento de adição de padrão permitiu a eliminação de erros devido as matrizes das amostras, permitindo assim a análise de amostras de produtos farmacêuticos com boa exatidão.

CAPÍTULO VII – ATIVIDADES FUTURAS

CAPÍTULO VII – ATIVIDADES FUTURAS

Durante o desenvolvimento desse trabalho e após análise dos resultados obtidos, surgiram algumas perspectivas de trabalhos futuros seguindo a mesma linha de pesquisa.

Há possibilidade da inclusão de um reator em fase sólida contendo AgSCN em um sistema de análise por injeção, onde a N-acetilcisteína precipitaria com a prata(I) no reator, liberando SCN⁻. Uma solução contendo Fe³⁺ entraria por confluência no sistema em fluxo complexando com o SCN⁻, formando um cromóforo vermelho (FeSCN²⁺) monitorado espectrofotometricamente em 550 nm. O sinal analítico seria diretamente proporcional à concentração de SCN⁻ deslocado do reator e conseqüentemente proporcional à concentração de N-acetilcisteína na amostra.

O uso de sistemas de análise por injeção em fluxo com detecção eletroquímica utilizando eletrodo de pasta de carbono também deve ser explorado com o uso de modificadores (substâncias eletroativas) incorporada à pasta.

Outras técnicas eletroquímicas (voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada) poderiam ser aplicadas utilizando-se os eletrodos de pasta de carbono modificados. Essas técnicas por sua vez são mais sensíveis que a voltametria linear, podendo assim, serem aplicadas em amostras onde a concentração do analito, seja menor do que as empregadas no presente trabalho.

A N-acetilcisteína poderia ser determinada em amostras diversas titulando-se potenciometricamente e condutometricamente com soluções contendo Cu²⁺, uma vez que ocorre a formação de um precipitado entre o ânion desse analito e cobre(II).

Outros medicamentos como o captopril e a carboximetil-cisteína, poderiam ser determinados, uma vez que possuem um grupo sulfidril e devem se comportar semelhantemente a N-acetilcisteína frente aos reagentes contendo Ag(I) e Cu(II).

CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SILVA, P. *Farmacologia*; 4. Ed, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A. 1994, p. 715.
2. GOODMAN, G. A.; Rall, W. T. & Nies, S. A. *The pharmacological basis of therapeutic*, 8. Ed, New York, McGraw-Hill, 1992, p. 99.
3. LARA, P. F. & OLIVEIRA-FILHO, R. M. "Evolução farmacológica dos mucolíticos" *Arquivos da Fundação Otorrinolaringologia*, **3(2)**:68, 1999.
4. <http://www.brasindoor.com.br/arquivos/art> – Acessado em 20/12/2004.
5. De VRIES, N. & De FLORA, S. "N-Acetyl-L-Cysteine". *J. Cell. Biochem.*, **17**: 270, 1993.
6. De FLORA, S.; BENNICELLI, C. & CAMOIRANO, A. "In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds". *Carcinogenesis*, **6**:1735, 1985.
7. BORGSTROM, L.; KAGEDAI, B. & PAULSEN, O. "Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man". *Eur. J. Clin. Pharmacol*, **31**:217, 1986.
8. <http://www.thorne.com/altmedrev/contents5-5.html> - Acessado em 10/10/2004
9. JACKSON, I. M.; BARNES, J. & COOKSEY, P. "Efficacy and tolerability of oral acetylcysteine (Fabrol) in chronic bronchitis: a double-blind placebo controlled study". *J. Int. Med. Res*, **12**:198, 1984.
10. HIDA, W.; SHINDO, C. & SATOH, J. "N-acetylcysteine inhibits loss of diaphragm function in streptozotocin-treated rats". *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*, **153**:1875, 1996.
11. De FLORA, S.; CESARONE, C. F. & IZZOTTI, A. "N-acetylcysteine as antimutagen and anticarcinogen". *Toxicol. Lett*, **53**:Abstract, 1992.
12. De FLORA, S.; ROSSI, G. A. & De FLORA, A. "Metabolic, desmutagenic and anticarcinogenic effects of N-acetylcysteine". *Respiration*, **50**:43, 1986.
13. SMILKSTEIN, M.J.; KNAPP, G.L.; KULIG, K.W. & RURNACK, B.H. "Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose". *N. Engl. J. Med*, **319**:2557, 1988.
14. OLIVEIRA, J. A. Fisiologia do Equilíbrio. IN: Otorrinolaringologia: Princípios e Prática. Editora Artes Médicas. Porto Alegre, 1994.

15. WIKLUND, O.; FAGER, G. & ANDERSSON, A. "N-acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels". *Atherosclerosis*, **119**:99, 1996.
16. GAVISH, D. & BRESLOW, J. L. "Lipoprotein(a) reduction by N-acetylcysteine". *Lancet*, **337**:203, 1991.
17. P. R. vade-mécum, 8 ED, São Paulo, Soriak Comércio e Produções, 2002, p. 683.
18. RAGGI, M. A.; MANDRIOLI, R.; CASAMENTI, G.; MUSIANI, D. & MARINI, M. "HPLC determination of glutathione and other thiols in human mononuclear blood cells". *Biomed. Chromatogr.* **12**:262, 1998.
19. TSIKAS, D.; SANDMANN, J.; IKIC, M.; FAULER, J.; STICHTENOTH, D. O. & FROLICH, J. C. "Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of N-acetylcysteine". *J. Chromatogr. B.*, **708**:55, 1998.
20. NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; TORIBIO, L.; MARINERO, P.; MORAL, O.; MANZANAS, L. & RODRIGUEZ, E. "Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatograph and post-column derivatization with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)". *J. Chromatogr. A.*, **778**:347, 1997.
21. SUAREZ, W. T.; VIEIRA, H. J. & FATIBELLO-FILHO, O. "Generation and destruction of unstable reagent in flow injection system: determination of acetylcysteine in pharmaceutical formulations". *J. Pharm. Biom Anal.*, **37**: 771, 2005.
22. RAGGI, M. A.; CAVRINI, V. & DIPIETRA, A. M. "Colorimetric determination of N-acetylcysteine, penicillamine, and mercaptopropionylglycine in pharmaceutical dosage forms". *J. Pharm Sci.*, **71**:1384, 1982.
23. SÀNCHEZ-PEDREÑO, C.; ALBERO, M. I.; GARCIA, M. S. & RODENAS, V. "Determination of N-acetylcysteine in pharmaceutical samples by flow injection". *Analyst*, **117**:925, 1992.
24. ALVAREZ COQUE, M. C. G.; HERNANDEZ, M. J. M.; CAMANAS, R. M. V. & FERNANDEZ, C. M. "Spectrophotometric determination of N-acetylcysteine in drug formulations with o-phthalaldehyde and isoleucine". *Analyst*, **114**:975, 1989.

25. Do CARMO D. R.; SILVA, R. M. & STRADIOTTO, N. R. "Electrocatalytic and voltammetric determination of sulfhydryl compounds through iron nitroprusside modified graphite paste electrode". *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**:616, 2003.
26. KOLAR, M. & DOBCNIK, D. "Chemically prepared silver electrode for determination of N-acetyl-L-cysteine by flow injection potentiometry". *Pharmazie*, **58**:25, 2003.
27. AL-GHANNAM, S.; EL-BRASHY, A. & AL-FARHAN, B. "Fluorimetric determination of some thiol compounds in their dosage forms". *Il Farmaco*, **57**:625, 2002.
28. TSAI, F. Y.; CHEN, C. J. & CHIEN, C. S. "Determination of the cysteine derivatives N-acetylcysteine, S-carboxymethylcysteine and methylcysteine in pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A*, **697**:309, 1995.
29. DU, J.; LI, Y. & LU, J. "Investigation on the chemiluminescence reaction of luminol-H₂O₂-S₂/R-SH system". *Anal. Chim. Acta.*, **448**:79, 2001.
30. *United States Pharmacopeia National Formulary XXI*, United Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, 1985, p. 19.
31. *Farmacopéia Brasileira*, 3 Ed, Organizações Andrei S. A, São Paulo, 1997, p. 71.
32. ZAGATTO E, A, G; OLIVEIRA, C. C. & COLLINS, C. H. "Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (recomendações - IUPAC 1994)". *Quím. Nova*, **22**(1):143, 1999.
33. SKEGGS, L. T. "An automatic method for colorimetric analysis". *Amm. J. Clin. Pathol.*, **28**:311, 1957.
34. RUZICKA, J. & HANSEN, E.H. "Flow injection analysis 1. New concept of fast continuous-flow analysis". *Anal. Chim. Acta.*, **78**:145, 1975.
35. REIS, B. F.; GUINÉ, M. F. & KRONKA, E. A. M. "Análise química por injeção em fluxo contínuo". *Quím. Nova*, **12**:82, 1989.
36. MARTÍNEZ-CALATAYUD, J. & GARCÍA-MATEO, J. V. "Online solid-phase reactors for unsegmented continuous-flow drug analysis". *Trends Anal. Chem.* **12**:428, 1993.
37. <http://laqqa.iqm.unicamp.br/ANALISE%20POR%20INJECAO%20EM%20FLUXO.htm> Acessado em 15/12/2004

38. REIS, B. F. & BERGAMIN, F. H. "Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo". *Quím. Nova.*, **16**:570, 1993.
39. BERGAMIN, F.; REIS, B. F. & ZAGATTO, E. A. G. "A New device for improving sensitivity and stabilization in flow-injection analysis". *Anal. Chim. Acta.*, **97**:427, 1978.
40. ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B. & REIS, B. F. "Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo". *Quím. Nova*, **23**(1):119, (2000).
41. CARRILHO, E.; MIRANDA, C. E. S. M.; GERVASIO, A. P. & GINÉ, M. F. "Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA-CE): desafios, aplicações e perspectivas" *Quím. Nova*, **25**(3): 412, 2002.
42. Meios & Métodos "Análises químicas por injeção em fluxo: capítulo I", *Jornal de Tecnologia e Ciências publicado pela Micronal*. Ano VII, N° 41, 1984.
43. SOUZA, M. F. B. "Eletrodos quimicamente modificados a eletroanálise: Uma breve abordagem". *Quím. Nova*, **20**(2):191, 1997.
44. PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S. & KUBOTA, L. T. "Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas". *Quím. Nova*, **25**(6):1012, 2002.
45. KATZ, E.; LOTZBEYER, T.; SCHLERETH, D. D.; SCHUHMANN, W. & SCHMIDT, H. L. "Electrocatalytic Oxidation Of Reduced Nicotinamide Coenzymes At Gold And Platinum-Electrode Surfaces Modified With A Monolayer Of Pyrroloquinoline Quinone - Effect Of Ca²⁺ Cations". *Electroanal. Chem.* **373** (1-2): 189, 1994.
46. VARELA-JÚNIOR, J. J. G.; ARAÚJO, M. F. A.; CHAVES, J. A. P. & TANAKA, A. A. "Electrocatalise da reação de redução de oxigênio sobre eletrodos de grafite modificados com ftalocianina octametoxilada de ferro". *Eclét. Quím.* **28**(2): 9, 2003.
47. MOSES, P. R.; WIER, P. & MURRAY, R. W. "Chemically modified tin oxide electrode". *Anal. Chem.*, **47**:1882, 1975.
48. WILKINS, E. & ATANASOV, P. "Glucose monitoring: State of the art and future possibilities". *Med. Eng. Phys.* **18**(4): 273, 1996.
49. TURNER, APF. "Electrochemical sensors for continuous monitoring during surgery and intensive-care" *Acta Anaesth. Scand.* **39**:15, 1995.

- 50.UDOMSOPAGIT S, SUPHANTHARIKA M, KUNNECKE W, BILITEWAKI, U. & BHUMIRATANA, A. "Determination of L-glutamate in various commercial soy sauce products using flow injection analysis with a modified electrode" *World J Microb Biot* **14** (4):543-549, 1998.
- 51.ADAMS, R. N. "Carbon paste electrodes" *Anal Chem.*, **30**(9):1576, 1958.
- 52.MONIEN, H.; SPECKER, H. & ZINKE, K. "Über die anwendbarkeit verschiedener kohleelektroden zur inversen voltammetrie von silber" *Z Anal Chem. Fresenius.* **225**(2):342, 1967.
- 53.LINDQUIS, J. "Study of 7 different carbon paste electrodes". *Electroanal. Chem* **52**(1):37, 1974.
- 54.KUWANA, T. & FRENCH, W. H. "Electrooxidation or reduction of organic compounds into aqueous solutions using carbon paste electrode". *Anal. Chem.*, **36**:241, 1964.
- 55.LAMACHE, M. & BAUER, D. "Chronamperometric study of carbon paste electrode with electrolyte binder and insoluble electroactive solid". *J. Electroanal. Chem.* **79**:359, 1977.
- 56.KALCHER, K. "Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis". *Electroanal.* **2**:419, 1990.
57. GORTON, L. "Carbon-paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells". *Electroanalysis*, **7**:23, 1995.
- 58.ULAKHOVICH, N. A.; MEDYANTSEVA, E. P. & BUDNIKOV, G. K. "The carbon paste electrode as a sensor in voltametry analysis". *Zn. Anal. Khim.*, **48**:980, 1993.
- 59.LINDQUIST, J. "Study of 7 different carbon paste electrodes". *J. Electroanal. Chem.* **52**:37, 1974.
- 60.SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. & NIEMAN T. A. Principles of instrumental analysis. Chicago, Hartcourt Brace College Publishing, 1998. p. 300.
- 61.BRETT, A. M. O. & BRETT, C. M. A. Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações. Nova Iorque, Oxford University Press Inc., 1996. p.192.
62. GIOLITO, I. Métodos Eléctrométricos e Eletroanalíticos Fundamentos e aplicações, São Paulo, Multitec-Coordenadoria de Treinamento técnico, 1980, p.41.
- 63.LAITINEN, H. A. & HARRIS, W. E. Chemical Analysis. 2 ED; Internacional Student Edition

64. INGLE-JÚNIOR, J. D.; CROUCH, S. R., Spectrochemical Analysis, New Jersey, Prentice Hall, 1988, p. 513.
65. S. AYRAULT, B. JIMENEZ, E. GRANIER, M. FEDOROFF, D.J. JONES, C. LOOS-NEŠKOVIC, Sorption mechanisms of Cesium on $(\text{Cu}_2\text{Fe}^{\text{II}})-(\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6)$ and $\text{Cu}_3^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]_2$: hexacyanoferrates and their relation to the crystalline structure, *J. Solid State Chem.* **141**:475, 1998.
66. http://www.iic.cas.cz/~grygar/AbrSV_topics_hcf.html – Acessado em 22/05/2003.
67. KULESZA. P. J., MALIK. M. A., BERRETTONI, M., GIORGETTI M., ZAMPONI. S., SCHIMIDT R. & MARASSI. R. “Electrochemical charging, counteraction accommodation, and spectrochemical identity of microcrystalline solid cobalt hexacyanoferrate” *J. Phys. Chem. B.* **102**:1870, 1998.
68. KULESZA, P.J., MALIK. M.A., SCHIMIDT, R., SMOLINSKA. A., MIECZNIKOWSKI. K., ZAMPONI, S., CZERWINSKI, A., BERRETTONI, M. & MARASSI. R. “Electrochemical preparation and characterization of electrodes modified with mixed hexacyanoferrates of nickel and palladium”. *J. Electroanal. Chem.* **487**:57, 2000.
69. VITTAL. R., GOMATHI. H. & RAO. G.P. “Influence of a cationic surfactant on the modification of electrodes with nickel hexacyanoferrate surface films”. *Electrochim. Acta.* **45**:2083, 2000.
70. WANG, P., JING. X., ZHANG. W. & ZHU. G. ”Renewable manganous hexacyanoferrate-modified graphite organosilicate composite electrode and its electrocatalytic oxidation of L-cysteine”. *J. Solid State Electrochem.* **5**:369, 2001.
71. CUI, X., HONG, L. & LIN, X. “Electrochemical preparation, characterization and application of electrodes modified with hybrid hexacyanoferrates of copper and cobalt”. *J. Electroanal. Chem.* **526**:115, 2002.
72. GARCIA-JARENO. J. J., SANMATÍAS. A., BENITO, D., NAVARRO-LABOULAIS, J. & VICENTE, F. “The role of inner counterions within Pb films during electrochemical processes”. *Int. J. Inorg. Mat.* **1**:343, 1999.
73. URBANICZKY, C. & LUNSTROM, K. “Voltammetric studies on carbon paste electrodes: The influence of paste composition on electrode capacity and kinetics”. *J. Electroanal. Chem.* **176**:169, 1984.