

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

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS  
ELETROANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO  
SIMULTÂNEA DE ANALGÉSICOS EM  
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E FLUIDOS  
BIOLÓGICOS EMPREGANDO O ELETRODO DE  
DIAMANTE DOPADO COM BORO**

**Anderson Martin dos Santos\***

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de MESTRE  
EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA  
ANALÍTICA.

**Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho**

**\*Bolsista CNPq**

**SÃO CARLOS**

**2015**

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

S237dp

Santos, Anderson Martin dos.

Desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação simultânea de analgésicos em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos empregando o eletrodo de diamante dopado com boro / Anderson Martin dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2015.

91 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Química analítica. 2. Analgésicos. 3. Eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). 4. Determinação simultânea. 5. Fluidos biológicos. 6. Amperometria de múltiplos pulsos. I. Título.

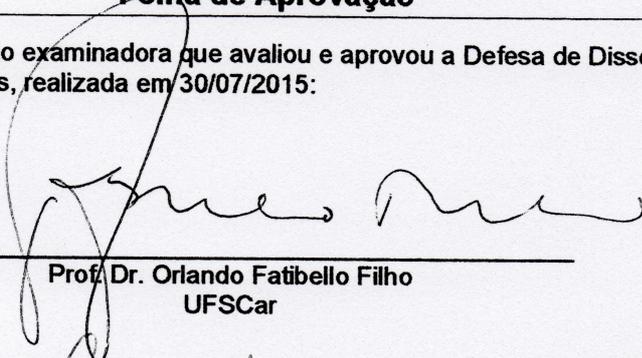
CDD: 543 (20<sup>a</sup>)

---

**Folha de Aprovação**

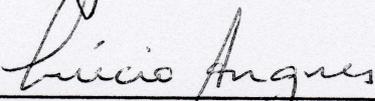
---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Anderson Martin dos Santos, realizada em 30/07/2015:



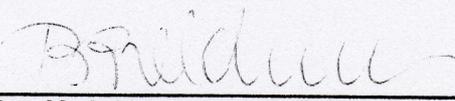
---

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho  
UFSCar



---

Prof. Dr. Lúcio Anghes  
USP



---

Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni  
UNESP

*Aos meus pais, Natalino e Sueli pelo amor, carinho, dedicação, paciência e incentivo  
prestado nos momentos mais difíceis dessa caminhada.*

*As minhas irmãs Suelen e Priscila.*

*Amo vocês!*

*DEDICO*

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

*Arthur Schopenhauer*

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein*

## *Agradecimentos*

A Deus por me dar força e sabedoria nos momentos difíceis;

Aos meus pais, Natalino e Sueli, pela confiança em mim depositada e todo amor e carinho;

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho pela oportunidade de realizar o mestrado no LABBES, pela orientação, incentivo, paciência e amizade que foram essenciais durante o período de mestrado;

Ao Prof. Dr. Romeu Rocha Filho pelas colaborações e discussão dos resultados deste trabalho e todos os ensinamentos transmitidos;

Ao Dr. Fernando Campanhã Vicentini por se mostrar sempre pronto para discussão e sugestões que foram essenciais para aprimorarem este trabalho, e também pela paciência e amizade;

Aos amigos e colegas do LABBES/LABiE, pelos momentos de discussão científica e também de descontração: Ademar, Adriana, Alexandrino, Alana, Barbara, Bruna, Cássio, Camila Rizzardi, Camila Proença, Cláudia, Elson, Fernando (Avaré), Fred, Jorge, Gisela, Laís, Luis (Cyber), Marcão, Marina, Natália, Patrícia, Thaísa e Tiago;

Aos demais familiares e amigos, que mesmo distantes contribuíram para o meu sucesso;

Aos Professores do Departamento de Química da UFSCar pelos seus ensinamentos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da UFSCar pela oportunidade;

A todos os funcionários do DQ, especialmente as secretárias Ariane, Cristina e Luciani pela atenção e colaboração;

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPESP e principalmente ao CNPQ pela bolsa concedida.

---

*Lista de Abreviaturas e Símbolos*

MPA	Amperometria de múltiplos pulsos (do inglês “ <i>Multiple pulse amperometry</i> ”)
FIA	Análise por injeção em fluxo (do inglês “ <i>Flow injection analysis</i> ”)
A	<i>Ampère</i>
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
cm	Centímetro
COD	Codeína
$r$	Coefficiente de correlação
$D$	Coefficiente de difusão
$\alpha$	Coefficiente de transferência de carga
$C$	Concentração da espécie em solução
$I$	Corrente
$I_p$	Corrente de pico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “ <i>High performance liquid chromatography</i> ”)
RSD	Desvio-padrão relativo (do inglês “ <i>Relative standard deviation</i> ”)
BDD	Diamante dopado com boro (do inglês “ <i>Boron-doped diamond</i> ”)
GCE	Eletrodo de carbono vítreo (do inglês “ <i>Glassy carbon electrode</i> ”).
BDDE	Eletrodo de diamante dopado com boro (do inglês “ <i>Boron-doped diamond electrode</i> ”)
CPE	Eletrodo de pasta de carbono (do inglês “ <i>Carbon paste electrode</i> ”).
$f$	Frequência de aplicação de pulsos de potencial

---

---

Hz	Hertz
$\Delta E$	Incremento de potencial
LD	Limite de detecção
L	Litro
$\mu$	micro ( $10^{-6}$ )
m	mili ( $10^{-3}$ )
mg	mili-grama
min	Minuto
n	nano ( $10^{-9}$ )
$n$	Número de elétrons
PAR	Paracetamol
%	Porcentagem
$E$	Potencial
$E_{det.}$	Potencial de determinação
$E_p$	Potencial de pico
$E^\circ$	Potencial formal
pH	Potencial hidrogeniônico
PTA	Pré-tratamento anódico
mol	Unidade de quantidade de matéria
S/N	Razão sinal-ruído (do inglês “ <i>Signal-to-noise</i> ”)
s	Segundos
BR	Tampão Britton-Robinson
TRA	Tramadol
$v$	Velocidade de varredura
V	<i>Volt</i>
SWV	Voltametria de onda quadrada (do inglês “ <i>Square-wave voltammetry</i> ”)
DPV	Voltametria de pulso diferencial (do inglês “ <i>Differential Pulse Voltammetry</i> ”)

---

---

*Lista de Tabelas*

TABELA 4.1 - Valores obtidos das áreas eletroativas do BDDE em diferentes pré-tratamentos empregando-se a equação de Randles-Sevcik .....	27
TABELA 4.2 - Parâmetros experimentais das técnicas de SWV e DPV otimizados para a determinação da COD.....	36
TABELA 4.3 - Parâmetros analíticos obtidos para determinação da COD utilizando a técnica de SWV e DPV .....	38
TABELA 4.4 - Parâmetros analíticos obtidos na determinação simultânea de PAR e COD .....	42
TABELA 4.5 - Comparação entre vários métodos eletroanalíticos propostos para a determinação simultânea de PAR e COD .....	43
TABELA 4.6 - Efeito de possíveis interferentes para determinação voltamétrica simultânea de PAR e COD em formulações farmacêuticas.....	45
TABELA 4.7 - Resultados da determinação simultânea de PAR e COD em formulações farmacêuticas pelo procedimento proposto (SWV) e por HPLC..	46
TABELA 4.8 - Determinação simultânea de PAR e COD em amostras de fluidos biológicos utilizando SWV e um BDDE-PTC .....	47
TABELA 4.9 - Cálculo do FC em função de cada concentração do PAR e a média entre os valores .....	55
TABELA 4.10 - Comparação entre os métodos eletroanalíticos propostos para a detecção simultânea dos analgésicos PAR e COD .....	58
TABELA 4.11 - Comparação dos resultados obtidos utilizando-se FIA–MPA e HPLC para determinação simultânea de PAR e COD em formulações farmacêuticas comerciais. ....	61
TABELA 4.12 - Determinação simultânea de PAR e COD em amostras de fluidos biológicos .....	62
TABELA 4.13 - Valores do fator de correção em função de cada concentração do PAR .....	71

---

---

TABELA 4.14 - Comparação entre vários métodos eletroanalíticos propostos para a detecção simultânea de PAR e TRA. ....	74
TABELA 4.15 - Efeito de possíveis interferentes na determinação amperométrica de PAR e TRA em formulações farmacêuticas .....	77
TABELA 4.16 - Resultados obtidos para a determinação simultânea de PAR e TRA em amostras farmacêuticas comerciais .....	78
TABELA 4.17 - Determinação simultânea de PAR e COD em amostras de fluidos biológicos .....	79

### *Lista de Figuras*

FIGURA 1.1 - Fórmula molecular do PAR.....	3
FIGURA 1.2 - Fórmula molecular da COD.....	4
FIGURA 1.3 - Fórmula molecular do TRA.....	5
FIGURA 1.4 – Proposta da reação de eletro-oxidação do/a <b>(a)</b> PAR, <b>(b)</b> COD e <b>(c)</b> TRA segundo Ensafi <i>et al.</i> <sup>54</sup> e Sanghavi <i>et al.</i> <sup>55</sup> .....	8
FIGURA 1.5 - Representação da superfície do BDDE com as diferentes terminações superficiais provocadas pelos pré-tratamentos eletroquímicos <b>(a)</b> catódico e <b>(b)</b> anódico.....	12
FIGURA 3.1 - Ilustração do <b>(a)</b> tarugo com um <i>O-ring</i> ( <i>anel</i> ) de vedação e delimitando a área geométrica em 0,69 cm <sup>2</sup> para encaixe do <b>(b)</b> BDDE, <b>(c)</b> contra eletrodo, <b>(d)</b> eletrodo de referência e <b>(e)</b> célula de vidro com tampa de Teflon <sup>®</sup> , contendo três orifícios para acoplamento dos eletrodos.....	19
FIGURA 3.2 - Ilustração da célula eletroquímica para o sistema FIA. Em <b>(a)</b> suporte em acrílico com <i>O-ring</i> para vedação, <b>(b)</b> suporte em acrílico com contato elétrico para acomodação do eletrodo de trabalho, <b>(c)</b> eletrodo de referência (Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L <sup>-1</sup> )) miniaturizado, <b>(d)</b> BDDE, <b>(e)</b> eletrodo auxiliar em aço inoxidável e saída das soluções.....	20
FIGURA 3.3 - Ilustração de um sistema FIA. As representações são: <b>(a)</b> bomba peristáltica, <b>(b)</b> injetor comutador manual, <b>(c)</b> célula eletroquímica, <b>(d)</b> solução transportadora (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05 mol L <sup>-1</sup> ), <b>(e)</b> solução da amostra e <b>(f)</b> descarte.....	21
FIGURA 4.1- Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de BDD com <b>(a)</b> PTA e <b>(b)</b> PTC em diferentes velocidades de varredura (10; 20; 30; 40; 50; 75; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450 e 500 mVs <sup>-1</sup> ) em solução de K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 1,0 × 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> preparada em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> . Gráfico da relação linear obtida de <i>I</i> <sub>p</sub> versus <i>v</i> <sup>1/2</sup> para correntes anódica ( <i>I</i> <sub>pa</sub> ) e catódica ( <i>I</i> <sub>pc</sub> ) em <b>(c)</b> PTA e <b>(d)</b> PTC.....	27

- FIGURA 4.2 - Voltamogramas cíclicos empregando-se o BDDE-PTC, **(a)** na ausência (—) e na presença (—) de 0,10 mmol L<sup>-1</sup> de PAR; **(b)** na ausência (—) e na presença (—) de 0,10 mmol L<sup>-1</sup> de COD; **(c)** na ausência (—) e na presença (—) de 0,10 mmol L<sup>-1</sup> de PAR e COD. Eletrólito suporte: tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0),  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 29
- FIGURA 4.3 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o BDDE com diferentes pré-tratamentos em solução de **(a)** PAR 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; **(b)** COD 4,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e **(c)** PAR 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e COD 4,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  após PTA (—) e PTC (—). Eletrólito suporte: tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0); ( $f = 70 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ ). ..... 31
- FIGURA 4.4 - Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de **(a)** PAR 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e **(b)** COD 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  preparadas em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH = 4,0) para diferentes velocidades de varredura ( $\nu$ ): (A – N) 20; 30; 40; 50; 75; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450 e 500  $\text{mV s}^{-1}$ . Gráficos inseridos: **(i)**  $\log I_p$  versus  $\log \nu$  e da relação linear obtida de **(ii)**  $I_p$  versus  $\nu^{1/2}$ . ..... 32
- FIGURA 4.5 – **(a)** Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o BDDE-PTC em diferentes pHs: 2,0 (—); 4,0 (—); 6,0 (—) e 8,0 (—) em solução de COD 4,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . **(b)** gráfico de  $E_p$  vs pH e de  $I_p$  vs pH. Eletrólito suporte: tampão de Britton-Robinson 0,04 mol L<sup>-1</sup>; ( $f = 70 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ ). ..... 34
- FIGURA 4.6 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o BDDE-PTC em diferentes eletrólitos suportes KCl 0,2 mol L<sup>-1</sup> (—), NaNO<sub>3</sub> 0,2 mol L<sup>-1</sup> (—), tampão de acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (—), tampão de Britton-Robinson 0,04 mol L<sup>-1</sup> (—) e tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (—) em solução de COD 4,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; ( $f = 70 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ ). ..... 35
- FIGURA 4.7 - **(a)** Voltamogramas de onda quadrada e **(b)** voltamogramas de pulso diferencial obtidas empregando-se o BDDE-PTC em tampão acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) para diferentes concentrações de COD: (1 – 12) 0,09; 0,20;

- 0,40; 0,50; 0,79; 0,99; 1,98; 3,95; 5,91; 7,87 e  $9,81 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Inseridos: curvas analíticas correspondentes. .... 37
- FIGURA 4.8 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando um BDDE-PTC para várias concentrações de: **(a)** PAR (1 – 15: 0, 0,20; 0,40; 0,60; 1,00; 2,00; 4,00; 5,90; 7,90; 9,80; 19,6; 39,2; 58,6; 78,0 e  $97,3 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) a uma concentração fixa de COD ( $6,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>); **(b)** COD (1 - 10: 0; 0,40; 0,60; 0,79; 0,99; 1,98; 3,95; 5,91; 7,87 e  $9,82 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) a uma concentração fixa de PAR ( $60,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>). Eletrólito suporte: solução tampão acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0),  $f = 60$  Hz,  $a = 60$  mV e  $\Delta E_s = 4$  mV. Inserido: curva analítica correspondente. .... 40
- FIGURA 4.9 - **(a)** Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando um BDDE-PTC para várias concentrações de: PAR (1 – 9: 0,20; 0,60; 1,00; 3,90; 4,00; 7,80; 9,70; 38,6; 57,6 e  $95,8 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) e COD (1 – 9: 0,40; 0,59; 0,79; 0,98; 1,95; 3,88; 5,79; 7,69 e  $9,58 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>). Curvas analíticas obtidas para **(b)** PAR e **(c)** COD. Eletrólito suporte: solução tampão acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) e  $f = 60$  Hz,  $a = 60$  mV e  $\Delta E_s = 4$  mV..... 41
- FIGURA 4.10 - **(a)** Amperogramas obtidos empregando FIA-MPA após injeções únicas de cada solução eletrolítica contendo PAR  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou COD  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . **(b)** Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para o PAR e COD representados graficamente pelos valores da corrente de pico em função dos correspondentes potenciais de pulso aplicado. Solução transportadora: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $350,0 \mu\text{L}$  e vazão:  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ ..... 49
- FIGURA 4.11 - Magnitude dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação de pulsos de potencial: 100 a 250 ms, **(a)** PAR  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial: 950 mV e **(b)** COD  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial: 1400 mV. Solução transportadora: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ ..... 51
- FIGURA 4.12 - Magnitude dos sinais da corrente de pico do PAR e da COD a  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função da **(a)** vazão (intervalo: 1,1 –  $5,5 \text{ mL min}^{-1}$ ) e do **(b)**

volume da amostra injetada (intervalo: 50 – 500 $\mu\text{L}$ ). Solução transportadora: $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ .....	52
FIGURA 4.13 - (a) Sequência de aplicação dos pulsos de potencial em função do tempo. (b) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se FIA–MPA para soluções eletrolíticas contendo apenas PAR (10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), apenas COD (10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou PAR + COD (ambos a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Solução transportadora: $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ ; volume de injeção: 350,0 $\mu\text{L}$ e vazão: 3,8 mL $\text{min}^{-1}$ . .....	53
FIGURA 4.14 - (a) Amperogramas obtidos utilizando FIA–MPA após sucessivas injeções de soluções eletrolíticas contendo PAR (A – I: 0,08; 0,50; 3,0; 9,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e COD (A – I: 0,05; 0,08; 0,20; 0,40; 0,80; 1,0; 4,0; 8,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e soluções de quatro amostras farmacêuticas adequadamente preparadas (J – M). Curvas analíticas obtidas para o (b) PAR e para a (c) COD. Solução transportadora: $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ ; volume de injeção: 350,0 $\mu\text{L}$ e vazão: 3,8 mL $\text{min}^{-1}$ .....	56
FIGURA 4.15 - Amperogramas obtidos usando FIA–MPA para sucessivas injeções da solução do eletrólito suporte contendo PAR (9,0; 40,0 ou 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e COD (0,4; 1,0 ou 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Solução transportadora: $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ ; volume de injeção: 350,0 $\mu\text{L}$ e vazão: 3,8 mL $\text{min}^{-1}$ . .....	59
FIGURA 4.16 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o BDDE–PTC, na ausência (–) e na presença (–) de 0,20 mmol $\text{L}^{-1}$ de PAR e TRA. Eletrólito suporte: tampão Britton-Robinson 0,04 mol $\text{L}^{-1}$ (pH 2,0), $\nu = 50$ mV $\text{s}^{-1}$ .....	63
FIGURA 4.17 - Voltamogramas cíclicos obtidos sem (linha sólida) e com (linha pontilhada) a adição de 0,2 mmol $\text{L}^{-1}$ de (a) PAR e (b) TRA utilizando um BDDE após (–) PTC ou (–) PTA. Eletrólito suporte: tampão Britton–Robinson 0,04 mol $\text{L}^{-1}$ (pH 2,0), $\nu = 50$ mV $\text{s}^{-1}$ .....	64
FIGURA 4.18 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o BDDE com diferentes pré-tratamentos em solução de (a) PAR 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ;	

- (b) COD  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (c) PAR e COD  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  após PTA (—) e PTC (---). Eletrólito suporte: tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH4,0); ( $f = 70 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ )..... 65
- FIGURA 4.19 - (a) Amperogramas obtidos no sistema FIA–MPA após injeções de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR ou COD. (b) Voltamogramas hidrodinâmicos correspondentes ao PAR e ao TRA obtidos pelos valores da corrente de pico em função dos correspondentes pulsos de potencial aplicados. Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $250,0 \mu\text{L}$  e vazão:  $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ . ..... 67
- FIGURA 4.20 - Magnitude dos sinais de corrente de pico em função do tempo de aplicação de pulsos de potencial (100 a 250 ms), (a) PAR  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; pulso de potencial:  $850 \text{ mV}$  e (b) TRA  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial:  $1600 \text{ mV}$ . Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ . ..... 68
- FIGURA 4.21 - Magnitude dos sinais da corrente de pico do PAR e do TRA a  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função da (a) vazão (intervalo:  $1,1 - 5,5 \text{ mL min}^{-1}$ ) e do (b) volume da amostra injetada (intervalo:  $50 - 500 \mu\text{L}$ ). Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . ..... 69
- FIGURA 4.22 - (a) Sequência de aplicação dos pulsos de potencial em função do tempo. (b) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se FIA–MPA para soluções eletrolíticas contendo apenas PAR ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), apenas TRA ( $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou PAR ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) + TRA ( $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $350,0 \mu\text{L}$  e vazão:  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ . ..... 70
- FIGURA 4.23 - (a) Amperogramas obtidos utilizando-se FIA–MPA após sucessivas injeções de soluções eletrolíticas contendo apenas o PAR (A – B:  $2,0$  e  $80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e de forma simultânea contendo PAR (C – J:  $1,00$ ;  $2,00$ ;  $4,00$ ;  $8,00$ ;  $20,00$ ;  $40,00$ ;  $80,00$  e  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e TRA (C – J:  $0,08$ ;  $0,20$ ;  $0,40$ ;  $0,80$ ;  $2,00$ ;  $4,00$ ;  $8,00$  e  $10,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e soluções de quatro amostras de

fluidos biológicos adequadamente preparadas (K – N). Curvas analíticas obtidas para o (b) PAR e para o (c) TRA. Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $350,0 \mu\text{L}$  e vazão:  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ ..... 73

FIGURA 4.24 - Amperogramas obtidos usando-se FIA–MPA e um BDDE–PTC para sucessivas injeções da solução do eletrólito suporte contendo PAR ( $2,0$ ;  $20,0$  ou  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e TRA ( $0,2$ ;  $2,0$  ou  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $350,0 \mu\text{L}$  e vazão:  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ . ..... 76

### Resumo

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ELETROANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANALGÉSICOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E FLUIDOS BIOLÓGICOS EMPREGANDO O ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO. Neste trabalho de mestrado foram desenvolvidos procedimentos eletroanalíticos para a determinação simultânea dos analgésicos paracetamol (PAR) e codeína (COD) e de PAR e tramadol (TRA) em amostras farmacêuticas e fluidos biológicos utilizando-se o eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE) pré-tratado catodicamente. Para o primeiro procedimento, empregou-se a voltametria de onda quadrada (SWV) para a determinação simultânea de PAR e COD em tampão acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) como eletrólito suporte, obtendo-se curvas analíticas lineares nos intervalos de concentração de  $0,2$  a  $95,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  para PAR e de  $0,4$  a  $9,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  para COD e limites de detecção (LDs) de  $0,018$  e de  $0,014 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente para o PAR e COD. O segundo procedimento desenvolvido para a determinação simultânea dos analgésicos PAR e COD foi por análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos (FIA-MPA) em solução transportadora de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . A sequência de aplicação dos pulsos em função do tempo foi de  $950 \text{ mV} / 200 \text{ ms}$  (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação apenas do PAR) e de  $1400 \text{ mV} / 100 \text{ ms}$  (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação de ambos os analitos (PAR e COD)). As curvas analíticas obtidas apresentaram linearidades de  $0,08$  a  $100,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  para PAR e de  $0,05$  a  $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  para COD e os LDs foram de  $0,030$  e  $0,035 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  para PAR e COD, respectivamente. A frequência analítica obtida foi de  $90$  determinações  $\text{h}^{-1}$ . O terceiro procedimento foi desenvolvido empregando-se FIA-MPA para a determinação simultânea de PAR e TRA. Uma sequência de aplicação dos pulsos de potencial em função do tempo foram de  $850 \text{ mV} / 200 \text{ ms}$  (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação

apenas de PAR) e de 1600 mV / 100 ms (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação de PAR e TRA). As curvas analíticas obtidas apresentaram linearidades de 1,0 a 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e de 0,08 a 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para PAR e TRA, respectivamente, com LDs de 0,030  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o PAR e de 0,040  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o TRA. Finalmente, todos os procedimentos desenvolvidos foram empregados para a determinação simultânea destes compostos (PAR + COD e PAR + TRA) em amostras farmacêuticas, sendo os resultados obtidos concordantes com os resultados obtidos empregando-se o método comparativo (HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência). Estes analgésicos também foram determinados simultaneamente em fluidos biológicos sintéticos (urina e soro humano) pelo método de adição e recuperação, sendo obtidas recuperações entre 90,8 a 108%.

*Abstract*

DEVELOPMENT OF ELECTROANALYTICAL PROCEDURES FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ANALGESICS IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS AND BIOLOGICAL FLUIDS EMPLOYING BORON-DOPED DIAMOND ELECTRODE. In this master dissertation, electroanalytical procedures for the simultaneous determination of analgesics paracetamol (PAR) and codeine (COD) and, PAR and tramadol (TRA) in pharmaceutical samples and biological fluids using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode (BDDE) were developed. In the first procedure, the square-wave voltammetry (SWV) was employed for the simultaneous determination of PAR and COD, using as supporting electrolyte 0.2 mol L<sup>-1</sup> acetate buffer (pH 4.0), and the analytical curves were linear in the concentration range from 0.2 to 95.8 μmol L<sup>-1</sup> for PAR and from 0.2 to 95.8 μmol L<sup>-1</sup> for COD, with detection limits (LODs) of 0.018 μmol L<sup>-1</sup> and 0.014 μmol L<sup>-1</sup>, respectively. The second procedure developed for the simultaneous determination of PAR and COD was based on a flow injection analysis with multiple pulses amperometric detection (FIA-MPA), using as transport solution a 0.05 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. The potential pulse application sequence in function of time was 950 mV / 200 ms (potential where only the PAR oxidation occurs) and 1400 mV / 100 ms (potential where both analytes suffers oxidation (PAR and COD)). The obtained analytical curves show linearity from 0.08 to 100.0 μmol L<sup>-1</sup> for PAR and 0.05 to 10.0 μmol L<sup>-1</sup> for COD, with LODs of 0.030 e 0.035 μmol L<sup>-1</sup> for PAR and COD, respectively. The analytical frequency was estimated as being 90 determinations h<sup>-1</sup>. After, an electroanalytical procedure using FIA-MPA it was developed a simultaneous determination of PAR and TRA. The potential pulse application sequence in function of time was 850 mV / 200 ms (potential where only occurs the PAR oxidation) and 1600 mV / 100 ms (potential where both analytes suffers

oxidation). The obtained analytical curves show linearities between 1.0 to 100.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 0.08 to 10.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for PAR and TRA, respectively, and the LOD was 0.030  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for PAR and 0.040  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for TRA. Finally, all developed procedures were employed for the simultaneous determination of these compounds (PAR + COD e PAR + TRA) in pharmaceutical samples, where the obtained results agree with those results obtained using a comparative method (HPLC – High-performance liquid chromatography). These compounds were simultaneously analyzed in synthetic biological fluids (urine and human serum) by addition and recuperation method, where the recuperations obtained ranged from 90.8 to 108%.

---

---

*Sumário*

1 - INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - Considerações gerais .....	1
1.2 - Analgésicos .....	1
1.2.1- Paracetamol.....	2
1.2.2- Codeína .....	3
1.2.3- Tramadol.....	4
1.2.4- Combinações dos analgésicos .....	6
1.3 - Reação de eletro-oxidação dos analgésicos PAR, COD e TRA.....	7
1.4 - Eletrodos à base de carbono .....	8
1.4.1- Eletrodo de diamante dopado com boro.....	9
1.4.1.1 - Pré-tratamento do BDDE.....	11
1.5 - Técnicas analíticas .....	12
1.5.1- Técnicas voltamétricas.....	12
1.5.2- Amperometria de múltiplos pulsos e sistema de análise por injeção em fluxo.....	13
2 - OBJETIVOS .....	15
3 - PARTE EXPERIMENTAL .....	16
3.1 - Reagentes e soluções.....	16
3.1.1- Preparação das amostras de formulações farmacêuticas.....	16
3.1.2- Preparação das amostras biológicas sintéticas .....	17
3.2 - Instrumentação .....	17
3.2.1- Eletrodos e célula eletroquímica.....	18
3.2.2- Sistema FIA .....	20
3.3 - Procedimentos analíticos.....	21
3.3.1- Pré-tratamento eletroquímico do BDDE .....	21

3.3.2- Procedimento analítico utilizando métodos voltamétricos para a determinação simultânea de PAR e COD .....	21
3.3.3- Procedimento analítico utilizando FIA–MPA para a determinação simultânea de PAR e COD e de PAR e TRA .....	23
3.3.4- Método comparativo .....	24
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
4.1 - Determinação da área eletroativa do BDDE em diferentes pré-tratamentos .....	26
4.2 - Estudo do comportamento eletroquímico do PAR e da COD sobre o BDDE .....	28
4.2.1- Estudo do efeito dos PTA e PTC sobre o BDDE .....	29
4.2.2- Estudo da velocidade de varredura de potencial .....	31
4.3 - Determinação simultânea de PAR e COD por voltametria utilizando um BDDE–PTC .....	33
4.3.1- Comportamento eletroquímico da molécula de COD .....	33
4.3.1.1 - Estudo do efeito do pH e do eletrólito suporte.....	33
4.3.1.2 - Comparação entre as técnicas SWV e DPV .....	35
4.3.2- Determinação simultânea de PAR e COD utilizando SWV e o BDDE–PTC .....	38
4.3.2.1 - Estudo de repetibilidade e de possíveis interferentes .....	43
4.3.2.2 - Determinação simultânea de PAR e COD em amostras farmacêuticas .....	45
4.3.2.3 - Determinação simultânea de PAR e COD em amostras de fluidos biológicos .....	46
4.4 - Determinação simultânea de PAR e COD empregando-se FIA–MPA e um BDDE–PTC.....	47
4.4.1- Otimização das condições do sistema FIA–MPA .....	48
4.4.1.1 - Estudo do efeito do tempo de aplicação dos pulsos de potencial.....	50

---

4.4.1.2 - Estudo da otimização dos parâmetros do sistema FIA.....	51
4.4.2- Estudo do comportamento eletroquímico do PAR e da COD utilizando FIA-MPA e um BDDE-PTC .....	52
4.4.3- Estudo de repetibilidade e de possíveis interferentes .....	58
4.4.4- Determinação simultânea de PAR e COD em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos .....	60
4.5 - Determinação simultânea de PAR e TRA empregando-se FIA-MPA e um BDDE-PTC.....	62
4.5.1- Comportamento eletroquímico dos analitos de PAR e TRA .....	62
4.5.2- Estudo do efeito dos PTA e PTC sobre o BDDE para a determinação simultânea de PAR e TRA .....	63
4.5.3- Otimização dos parâmetros do sistema FIA-MPA .....	65
4.5.3.1 - Estudo do efeito do tempo de aplicação dos pulsos de potencial.....	67
4.5.3.2 - Estudo da otimização dos parâmetros do sistema FIA.....	68
4.5.4- Estudo de repetibilidade e de possíveis interferentes .....	75
4.5.5- Determinação simultânea de PAR e TRA em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos .....	77
5 - CONCLUSÕES .....	80
6 - REFERÊNCIAS.....	83

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Considerações gerais

O desenvolvimento de novos procedimentos de análise é um processo contínuo em diversas áreas de pesquisa, onde o objetivo é o desenvolvimento de novas técnicas e/ou o aprimoramento das já existentes, buscando sempre métodos práticos, sensíveis, reprodutíveis, rápidos e de baixo custo.

Na química analítica não é diferente, e o emprego de técnicas eletroanalíticas para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos tem crescido significativamente, uma vez que estas técnicas têm se mostrado cada vez mais precisas, sensíveis e exatas devido principalmente a grande inovação na instrumentação eletroanalítica e o desenvolvimento de novas técnicas.

## 1.2 - Analgésicos

A utilização de analgésicos remonta à pré-história (cerca de 5.000 a.c.), onde segundo os historiadores, os Sumérios obtinham o ópio através de plantas para aplicar nos doentes<sup>1,2</sup>. Porém, apenas em 1806 Friedrich Serturmer isolou do ópio um composto conhecido hoje como morfina, e a codeína foi isolada do ópio alguns anos depois, marcando assim o surgimento da indústria farmacêutica<sup>2</sup>.

Em meados de 1886, a fim de substituir a morfina, foi descoberta a acetanilida (antifebrina), um derivado da anilina, que era utilizado como corante de tecidos<sup>2</sup>. Com esta descoberta outros fabricantes de tinturas passaram a direcionar suas pesquisas na busca de novos fármacos e, em 1887 Friedrech Bayer & Co. introduziu a fenacetina no mercado, um antipirético mais efetivo que a antifebrina<sup>3</sup>. Posteriormente, em 1893 Joseph von Mering, introduziu na prática clínica o paracetamol, que acabou substituindo a fenacetina, mesmo sendo menos efetivo. No entanto, o paracetamol foi utilizado extensivamente somente a partir de 1949<sup>3</sup>. Na sequência, pesquisadores sintetizaram o ácido acetilsalicílico (aspirina) em 1897, e ainda no mesmo ano criaram a heroína, que

foi comercializada até 1910, quando descobriram o seu potencial de dependência maior que o da morfina<sup>2</sup>.

No século XX, a cocaína (hoje proibida quase mundialmente) foi introduzida para o tratamento da depressão e de diversos tipos de dores por Sigmund Freud. No entanto, no mesmo século surgiu a maioria dos analgésicos e antipiréticos utilizados até hoje. Sendo que, a partir de 1940, surgiram diversos medicamentos derivados da morfina, como, o tramadol, a petidina, a metadona e a oxicodona.

Denominam-se analgésicos todos os medicamentos capazes de reduzir ou aliviar dores, ou seja, interromper as vias de transmissão nervosa<sup>4</sup>. Os analgésicos incluem as drogas narcóticas como a morfina e codeína, as drogas sintéticas com propriedades narcóticas, como o tramadol e o demerol e ainda as não narcóticas como o paracetamol, dipirona e ácido acetilsalicílico. Estes fármacos vêm sendo cada vez mais empregados no cotidiano da população, onde podem ser administrados de forma individual ou em combinações, como por exemplo: paracetamol e codeína e o paracetamol e tramadol<sup>5</sup>.

### **1.2.1 - Paracetamol**

Paracetamol (PAR) (acetaminofeno ou N-acetil-p-aminofenol) (FIGURA 1.1) é um analgésico-antipirético amplamente utilizado, e está entre as drogas mais extensivamente empregadas na área farmacêutica para o alívio de dores crônicas<sup>6</sup>. Sendo um dos melhores analgésicos disponíveis no mercado, o PAR vem substituindo o uso do ácido acetilsalicílico principalmente às pessoas que apresentam algum tipo de sensibilidade ao mesmo<sup>7</sup>.

Embora o PAR seja muito seguro em doses terapêuticas, apresentando menores efeitos colaterais em relação ao ácido acetilsalicílico, a sobredosagem pode ocasionar danos graves ao fígado, isto é, sua overdose está associada à hepatotoxicidade e, portanto, pode causar necrose hepática podendo chegar a níveis fatais<sup>6,8,9</sup>. Quando ingerido, o PAR é rapidamente absorvido pelo trato

gastrointestinal, sendo parcialmente convertido em metabolitos ativos no fígado e excretado (1 – 5% na forma inalterada) na urina<sup>10</sup>.

O PAR é geralmente prescrito para o tratamento de dores leves a moderadas e para reduzir a febre. Para o alívio de dores mais intensas, a combinação analgésica é frequentemente recomendada, usando analgésicos com diferentes modos de ação, como a codeína e o tramadol.

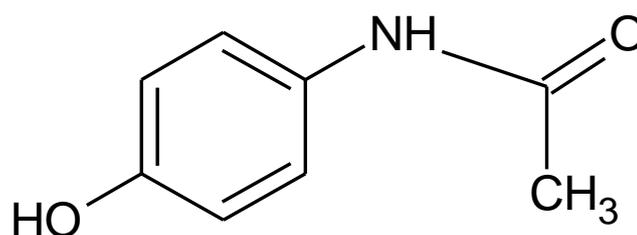


FIGURA 1.1 - Fórmula molecular do PAR.

### 1.2.2 - Codeína

A codeína (COD) ou 3-metilmorfina (FIGURA 1.2) é um fármaco alcalóide opiáceo que pode ser obtida de duas formas, extraída do ópio (produto natural da papoula) ou sinteticamente por metilação da morfina<sup>11</sup>.

Este composto é encontrado em vários medicamentos utilizados no combate a tosse, devido ao seu poder antitussígeno que ocorre pela inibição ou bloqueio da área do cérebro conhecida como centro da tosse<sup>12-16</sup>. Além disso, a COD possui um elevado poder analgésico que age diretamente sobre o sistema nervoso central, e por isso vem sendo muito empregada na indústria farmacêutica. Este medicamento apresenta aplicações semelhantes às da morfina, onde o seu efeito antitussígeno é de aproximadamente um terço e o seu poder analgésico é de apenas um vigésimo da ação da morfina, respectivamente.

Após a sua ingestão, a COD é metabolizada no fígado em morfina, norcodeína, normorfina, hidrocodona entre outros metabólitos<sup>17-19</sup>. A COD e seus metabólitos ativos, como morfina, são excretados quase que totalmente

pelos rins, e aproximadamente 4,9 – 8,2% é eliminada na urina de forma inalterada<sup>17</sup>.

A utilização da COD deve ser controlada, pois o organismo desenvolve rapidamente tolerância a este fármaco, o que pode levar a uma dependência da mesma<sup>20-22</sup>. A superdosagem de COD principalmente em crianças pode acarretar graves riscos à saúde, podendo provocar intoxicação, que se não for tratada pode levar a inconsciência, estado de coma e até mesmo a morte<sup>21,23,24</sup>. Devido a estas e outras características, torna-se fundamental o desenvolvimento de métodos sensíveis e rápidos para a determinação do fármaco em fluidos biológicos e um controle rígido de medicamentos à base de COD.

A COD é encontrada como um agente único ou em combinação com outras drogas, tais como ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, fenacetina, diclofenaco, paracetamol e cafeína.

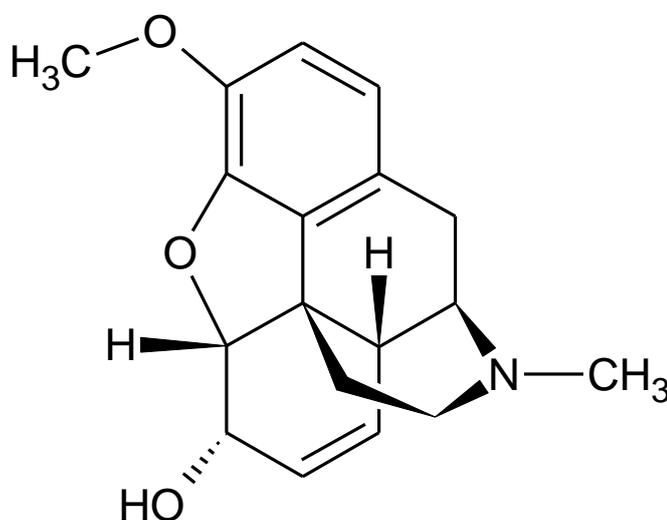


FIGURA 1.2 - Fórmula molecular da COD.

### 1.2.3 - Tramadol

O tramadol (TRA) ou (1R,2R)-2-[(dimetilamino)metil]-1-(3-metoxifenil) ciclohexanol (FIGURA 1.3) é um analgésico sintético que vem sendo muito utilizado desde 1977 como outros narcóticos. O TRA é classificado como um opióide de ação central, uma vez que se liga a receptores no cérebro (receptores

opióides) e inibe a recaptação de noradrenalina e serotonina, aumentando assim a liberação destes neurotransmissores. Este fármaco também é um análogo sintético da codeína, diferindo apenas por uma substituição metila no radical fenólico da estrutura da morfina<sup>25-27</sup>. O TRA vem sendo empregado para o tratamento de dores moderada a severa, pois atua sobre as células nervosas específicas da medula espinhal e do cérebro. Diversos estudos clínicos têm avaliado a eficácia do TRA para o alívio da dor pós-operatória, dor cirúrgica moderada, dor obstétrica, dor crônica, entre outras<sup>28,29</sup>.

O TRA assim como outras drogas, tem de ser utilizado com cautela. A sua concentração terapêutica está na faixa de 100-300 mg/dia. O fármaco age de forma rápida e é quase completamente absorvido após sua administração via oral, mas sua biodisponibilidade absoluta é de apenas 65-70% devido ao metabolismo de primeira passagem<sup>30</sup>. Aproximadamente 10-30% do fármaco é eliminado sem ser metabolizado na urina<sup>31</sup>.

Dependendo da sensibilidade individual e da dose empregada, o uso desse fármaco pode levar a diferentes níveis de reações adversas como náuseas, vômito, secura da boca, dor de cabeça, tontura e sonolência. Outras reações pouco frequentes podem ocorrer relacionadas à função cardiovascular e muito raramente têm sido reportadas convulsões epileptiformes<sup>32,33</sup>.

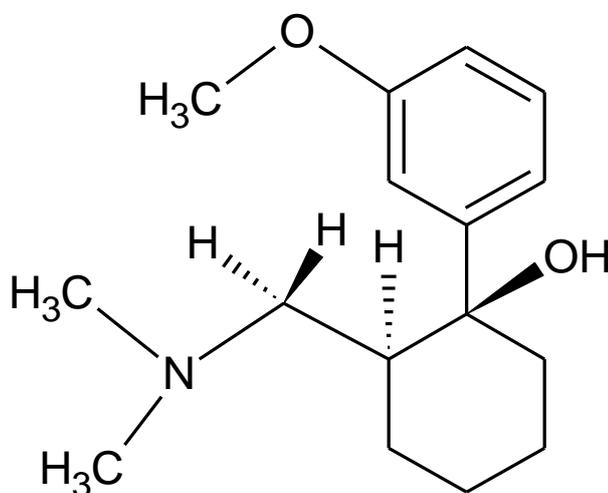


FIGURA 1.3 - Fórmula molecular do TRA.

## 1.2.4 - Combinações dos analgésicos

A suposição de que o mecanismo da ação analgésica do PAR é periférico proporciona a lógica para a combinação com analgésicos de ação central, como a COD e o TRA<sup>4,5,34,35</sup>. Assim, a partir destas combinações há um aumento da eficácia analgésica, ocasionando o alívio da dor e reduzindo possíveis efeitos colaterais<sup>4,36,37</sup>. No entanto, a sua utilização não controlada ou imprópria pode ocasionar sérias complicações a saúde, e sua overdose pode ser tóxica levando o indivíduo até mesmo a morte<sup>38</sup>. A determinação da concentração em que estes compostos se encontram em produtos farmacêuticos e fluidos biológicos são de extrema importância para evitar ou diagnosticar sobredosagens que podem vir a conduzir efeitos indesejáveis ou até mesmo intoxicação. Alguns métodos cromatográficos foram aplicados para a determinação simultânea destes medicamentos<sup>39-43</sup>. No entanto, estes métodos podem consumir muito tempo de análise, serem caros e muitas vezes necessitam de etapas de pré-tratamento das amostras. Como o PAR, COD e TRA são compostos eletroativos, os mesmos podem ser determinados eletroquimicamente. Métodos eletroquímicos mostraram grandes vantagens na análise de amostras farmacêuticas e de fluidos biológicos<sup>44-46</sup>, além de estar em rápido desenvolvimento. Portanto, o desenvolvimento de procedimentos analíticos simples, rápidos, sensíveis e precisos para a identificação e quantificação de fármacos é atualmente de grande interesse e importância.

Devido à grande utilização destes analgésicos surge a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de detecção e quantificação simultânea destes compostos, buscando sempre procedimentos rápidos, simples e precisos para garantir a qualidade dos medicamentos.

Alguns estudos envolvendo a determinação eletroanalítica simultânea destes fármacos já foram relatados na literatura. Pournaghi-Azar e Saadatirad<sup>47</sup> desenvolveram um procedimento para a determinação simultânea de PAR e COD utilizando um eletrodo de alumínio modificado com uma fina camada de

paládio metálico e a técnica de voltametria de pulso diferencial. Em seguida, Babaei *et al.*<sup>48</sup> propuseram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas utilizando voltametria de pulso diferencial.

Afkhami *et al.*<sup>49</sup> desenvolveram um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanocomposto de grafeno-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> aplicando a voltametria de onda quadrada para a determinação simultânea dos mesmos analgésicos.

Babaei *et al.*<sup>50</sup> confeccionaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e, utilizou a voltametria de pulso diferencial para a determinação simultânea de PAR e TRA. Já Ghorbani-Bidkorbeh *et al.*<sup>51</sup> desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de carbono e a mesma técnica voltamétrica. No entanto, Afkhami *et al.*<sup>52</sup> utilizaram a voltametria de onda quadrada e um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de grafeno/NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> para a determinação simultânea de PAR e TRA.

### 1.3 - Reação de eletro-oxidação dos analgésicos PAR, COD e TRA

As reações de eletro-oxidação destes analgésicos já foram relatadas por vários autores<sup>48,52-55</sup>. Porém, recentemente foi proposto por Ensafi *et al.*<sup>54</sup> um mecanismo para a eletro-oxidação do PAR e da COD. Neste trabalho, os autores relatam a oxidação do PAR e da COD sobre um eletrodo contendo nanoestrutura porosa de silício/paládio em solução de tampão Britton–Robinson pH 5,0. Segundo os autores, as reações de eletro-oxidação do PAR e da COD envolvem a participação de dois prótons e dois elétrons (FIGURA 1.4 (a) e (b)), sendo que o mecanismo proposto para o PAR está em concordância com aquele apresentado por Sanghavi *et al.*<sup>55</sup>. Estes últimos autores também estudaram o comportamento eletroquímico do TRA empregando-se um eletrodo de pasta de carbono vítreo modificado com Dowex50wx2 em solução de tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,0. A eletro-oxidação destes analgésicos envolve dois prótons e

dois elétrons para o PAR e um próton e dois elétrons para o TRA, como apresentado na FIGURA 1.4 (a) e (c).

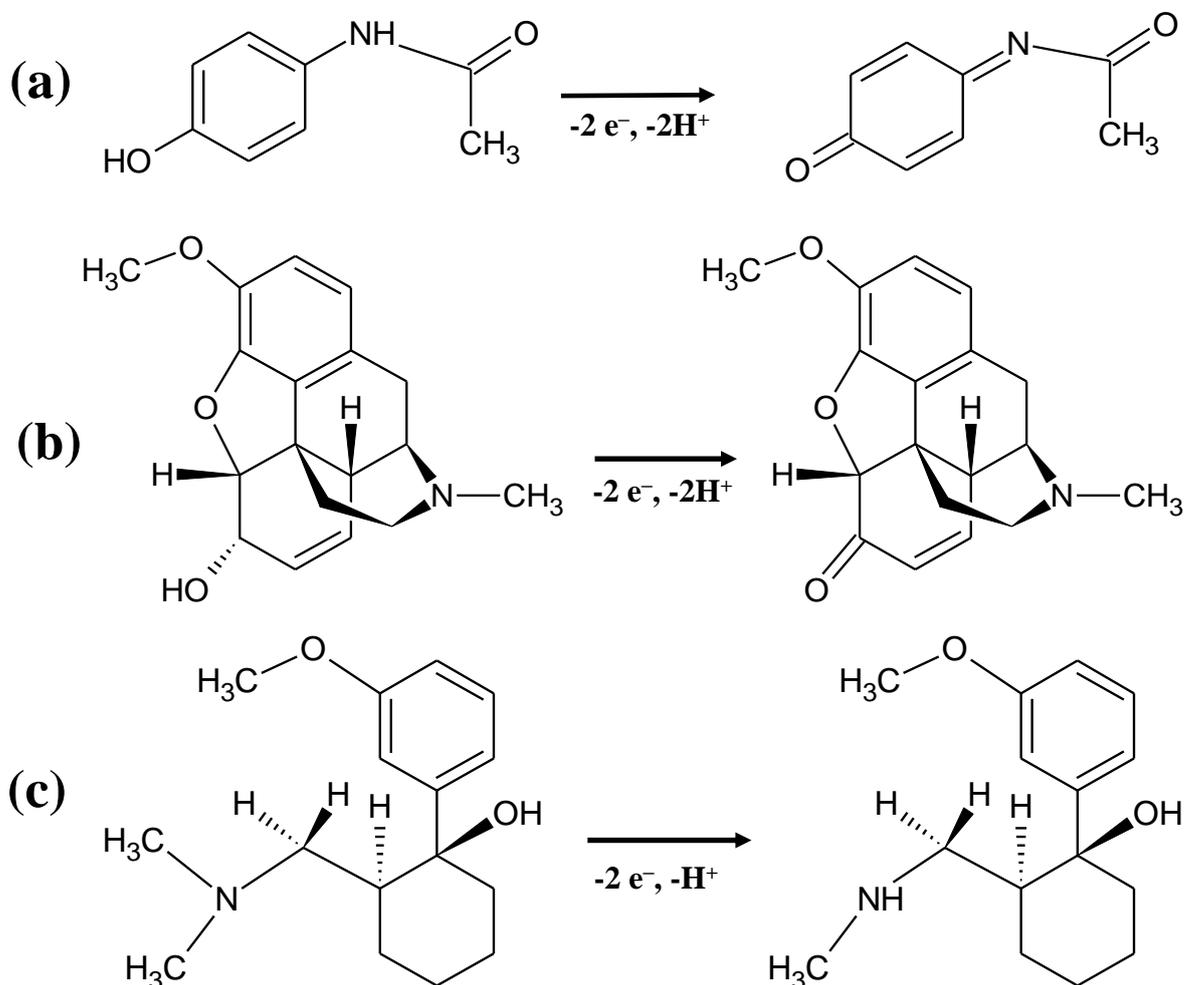


FIGURA 1.4 – Proposta da reação de eletro-oxidação do/a (a) PAR, (b) COD e (c) TRA segundo Ensafi *et al.*<sup>54</sup> e Sanghavi *et al.*<sup>55</sup>

## 1.4 - Eletrodos à base de carbono

O carbono pode se ligar de várias formas diferentes, obtendo-se assim inúmeras formas alotrópicas, diferindo-se assim apenas pelo arranjo geométrico. Devido a estas características únicas do átomo de carbono o mesmo tem sido muito utilizado na confecção de eletrodos de trabalho<sup>56</sup>.

Um fator crucial para a escolha do eletrodo de trabalho é sem dúvida a sua condutividade elétrica. Em geral, os eletrodos baseados em carbono têm se destacado muito devido a apresentarem algumas características como uma ampla janela de potencial, baixa corrente de fundo, baixo custo, facilidade de modificação e aplicação como sensor ou detector<sup>57-59</sup>. Com isso, o emprego de eletrodo à base de carbono tem se diferenciado muito quando comparados a outros tipos de eletrodos, principalmente os confeccionados por metais nobres, como a platina e o ouro, embora estes apresentem elevadas taxas de transferências de elétrons frente aos eletrodos de carbono<sup>60</sup>.

Vários eletrodos estão sendo confeccionados e empregados em eletroquímica e eletroanalítica, destacando-se os eletrodos de pasta de carbono<sup>61,62</sup>, carbono vítreo<sup>63,64</sup>, grafite pirolítico<sup>65,66</sup>, diamante dopado com boro<sup>67,68</sup>, nanotubos de carbono<sup>69</sup>, entre outros.

#### **1.4.1 - Eletrodo de diamante dopado com boro**

A palavra "diamante" é derivada de uma palavra grega "Adamas" que significa "o incontestável". O homem por sua vez, o conhece há milhares de anos, no entanto, durante um bom tempo ficou conhecido apenas por ser tratar de uma pedra dura e resistente, onde, devido a sua raridade e algumas propriedades passou a ser visto apenas como um cristal precioso e de brilho atraente, sendo desta forma empregado para a fabricação de joias. Posteriormente, com o avanço da ciência uma série de propriedades físicas começou a ser desvendada como, baixa taxa de desgaste, capacidade de isolamento elétrico quase perfeito, alta densidade atômica, alta condutividade térmica, alta dureza e inércia química, o que, o caracteriza como um material promissor, que por este motivo vem sendo estudado tão profundamente<sup>70,71</sup>.

Devido ao diamante ser muito raro na natureza, a sua aplicabilidade era muito limitada até meados do século XIX, no qual, forçaram os cientistas a tentarem sintetizá-lo. No entanto, a fabricação do diamante para ser usado como

joia é muito cara e inviável economicamente. Porém, hoje em dia existem vários métodos para a sintetização de filmes de diamante, sendo que, os dois métodos mais comuns para sua síntese são: deposição química a vapor (CVD, do inglês *Chemical Vapor Deposition*) e o crescimento em altas pressões e altas temperaturas (HPHT, do inglês *High Pressure High Temperature*). O segundo (HPHT) requer um alto custo de produção (elevada temperatura (1670 K) e pressão (5.000.000 KPa)) inviabilizando assim a sua produção em grandes escalas. Por outro lado, o primeiro empregando CVD utiliza menores temperaturas e pressões (temperatura de 1270 K e pressão entre 1 e 10 KPa), sendo assim, este método vem sendo o mais empregado na síntese dos filmes de diamante, por apresentar maior viabilidade econômica, versatilidade, manuseio simplificado e ainda permitir o crescimento dos filmes em vários substratos diferentes<sup>72</sup>.

Com a melhora na tecnologia para produzir os filmes de diamante a partir da CVD, começaram a ser desenvolvidos filmes de diamantes sintéticos, possibilitando assim através da dopagem (onde o mais utilizado é o boro) produzir filmes com características semicondutoras<sup>72</sup>. Assim, filmes de diamante dopado com boro (BDD, do inglês, *boron-doped diamond*), fez com que houvesse um aumento nas possibilidades da aplicação deste material para fins eletroquímicos<sup>73,74</sup>.

Na eletroquímica e/ou eletroanalítica, os eletrodos de BDD (BDDE) têm se destacado muito devido ao seu grande número de propriedades eletroquímicas que o distinguem dos outros eletrodos frequentemente utilizados, tais como grafite pirolítico, pasta de carbono e carbono vítreo. Algumas das propriedades do BDD que lhe proporcionam esta diferenciação é justamente sua elevada estabilidade a corrosão em meios fortemente agressivos, estabilidade de resposta por longos intervalos de tempo, baixa e estável corrente de fundo, ampla janela de potenciais em meio aquoso e não aquoso, fraca adsorção de moléculas

polares e extraordinária estabilidade morfológica e microestrutural a altas temperaturas<sup>74</sup>.

Devido a esta grande gama de propriedades do BDDE, o mesmo vem sendo cada vez mais utilizado no desenvolvimento de procedimentos eletroquímicos e/ou eletroanalíticos, por possibilitar um aumento da precisão, estabilidade e proporcionar baixos limites de detecção na determinação de compostos orgânicos<sup>67,75</sup> e inorgânicos<sup>76,77</sup>.

#### **1.4.1.1 - Pré-tratamento do BDDE**

As propriedades eletroquímicas do BDDE são fortemente influenciadas pela sua terminação superficial que pode ser em hidrogênio ou em oxigênio<sup>67,68</sup>. No entanto, estas mudanças podem ser facilmente realizadas empregando diferentes técnicas. Uma das técnicas utilizadas é o pré-tratamento eletroquímico na superfície do eletrodo em meio ácido, por polarização catódica ou anódica<sup>78</sup>. Com esta técnica, ao aplicar um pré-tratamento anódico (PTA) a superfície do filme de BDD adquire uma terminação preferencialmente em oxigênio (grupos oxigenados como: carboxila, carbonila e hidroxila) obtendo desta forma uma superfície hidrofílica. No caso do pré-tratamento catódico (PTC), a superfície do filme de BDD adquire terminações preferencialmente em hidrogênio, obtendo-se desta forma uma superfície hidrofóbica<sup>79-81</sup>. Conforme o tipo de pré-tratamento realizado na superfície do BDDE alguns analitos aumentam significativamente a sua atividade eletroquímica, melhorando as condições analíticas dos procedimentos desenvolvidos. Sendo assim, é fundamental um estudo prévio do pré-tratamento a ser adotado para a determinação de cada tipo de composto. De fato, há vários estudos na literatura envolvendo diferentes analitos, no qual foram relatados que ao utilizar um BDDE-PTC apresentaram maior corrente de pico de oxidação e, em muitos casos, houve um deslocamento do pico de oxidação para potencial menos positivo<sup>46,82-84</sup>. Por outro lado, da mesma forma, os efeitos benéficos do PTA também têm sido relatados para a

determinação de outros analitos<sup>81,85</sup>. Na FIGURA 1.7 é apresentado um esquema da superfície do BDDE após os diferentes pré-tratamentos eletroquímicos (PTC e PTA, respectivamente).



FIGURA 1.5 - Representação da superfície do BDDE com as diferentes terminações superficiais provocadas pelos pré-tratamentos eletroquímicos (a) catódico e (b) anódico.

## 1.5 - Técnicas analíticas

### 1.5.1 - Técnicas voltamétricas

A voltametria compreende um conjunto de técnicas eletroanalíticas nos quais a informação sobre o analito é obtida por meio de medidas de corrente em função de um potencial aplicado e em condições que estimulam a polarização de um eletrodo de trabalho<sup>86</sup>.

A voltametria é uma técnica eletroanalítica em que a corrente faradaica que flui através de uma célula eletrolítica é medida em função do potencial aplicado a um eletrodo polarizável chamado de eletrodo de trabalho. A instrumentação consiste de um potenciostato/galvanostato e de uma célula eletroquímica convencional com orifícios para encaixe de três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência (geralmente um eletrodo de calomelano saturado ou de prata/cloreto de prata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$  ( $\text{KCl}$  3,0 mol  $\text{L}^{-1}$ )) cujo potencial permanece constante durante o experimento e um contra-eletrodo

(eg. um fio enrolado ou placa de platina)<sup>87</sup>. Estes eletrodos são imersos em uma solução conhecida como eletrólito suporte, cuja função, quando adicionado em altas concentrações (aproximadamente 100 vezes maior que a da espécie eletroativa) diminui consideravelmente a queda ôhmica e minimiza a corrente migratória ou a diminui a valores desprezíveis.

A voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) é uma técnica muito utilizada para adquirir informações qualitativas e/ou quantitativas do sistema eletroquímico em estudo. Geralmente é o primeiro estudo realizado podendo ser obtidas informações importantes dos processos eletroquímicos de uma substância eletroativa no eletrodo de trabalho<sup>87,88</sup>. Já a voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) e a voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) são técnicas voltamétricas de pulso, empregadas na maioria dos casos nas determinações quantitativas, por serem técnicas mais sensíveis, sendo os limites de detecção obtidos comparáveis aos de outras técnicas como as cromatográficas, possibilitando assim quantificar concentrações de espécies inorgânicas e/ou orgânicas<sup>87,88</sup>.

### **1.5.2 - Amperometria de múltiplos pulsos e sistema de análise por injeção em fluxo**

A amperométrica de múltiplos pulsos (MPA, do inglês *Multiple Pulse Amperometry*) acoplada ao sistema de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*) tem sido muito empregada hoje em dia em trabalhos eletroanalíticos.<sup>89-92</sup>

A técnica de detecção MPA além de simples e versátil é muito utilizada devido à possibilidade da aplicação de diferentes pulsos de potencial sequenciais e continuamente em função do tempo em um mesmo eletrodo de trabalho, sendo possível a aplicação de até 10 pulsos de potencial com a aquisição de 10

amperogramas distintos<sup>93</sup>, possibilitando com isso a determinação simultânea de substâncias eletroativas com potenciais redox distintos<sup>91,92</sup>.

O sistema FIA tem sido bastante utilizado no desenvolvimento de procedimentos analíticos devido às suas várias vantagens, como o uso de instrumentação simples, menor interferência do analista, consumo reduzido de amostras e reagentes e, conseqüentemente, redução na geração de resíduos<sup>94</sup>.

Alguns estudos já realizados utilizando MPA acoplada a um sistema FIA na detecção simultânea de diferentes compostos com potenciais redox distintos mostraram a grande vantagem na execução da técnica.<sup>95</sup> Na literatura encontram-se alguns trabalhos já desenvolvidos utilizando o sistema FIA com detecção MPA.

Silva *et al.*<sup>92</sup> desenvolveram um método com aplicação de três pulsos de potenciais empregando-se um eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína.

Gimenes *et al.*<sup>91</sup> também descrevem um método de MPA empregando-se a aplicação de uma sequência de três pulsos de potenciais em um eletrodo de carbono vítreo para a determinação rápida e indireta de dopamina na presença de um excesso de ácido ascórbico.

Devido a estas vantagens, a detecção com o acoplamento da FIA–MPA é de grande interesse para o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos em análises onde se deseja a detecção simultânea de compostos eletroativos. Ademais, essa técnica apresenta também outras características vantajosas, como boa repetibilidade, sensibilidade e menor tempo de análise<sup>89,90,92,93,96,97</sup>.

## **2 - OBJETIVOS**

O presente trabalho de pesquisa tem como objetivo o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação simultânea dos analgésicos PAR e COD e de PAR e TRA em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos empregando-se técnicas voltamétricas de pulso e/ou FIA-MPA, utilizando-se como eletrodo de trabalho o BDDE-PTC.

## 3 - PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 - Reagentes e soluções

Padrões de cloridrato de tramadol (TRA) e fosfato de codeína (COD) foram adquiridos da FAGRON (São Paulo, Brasil) e o PAR foi adquirido da Sigma-Aldrich, tendo todos grau de pureza > 99%. Todos os demais reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico (pureza  $\geq$  99%). As soluções foram preparadas utilizando água ultrapura obtida em um sistema Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, MA) com resistividade superior a 18,2 M $\Omega$  cm.

Soluções estoques de COD, PAR e TRA, todas em uma concentração de  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>, foram preparadas diariamente utilizando água ultrapura como solvente.

#### 3.1.1 - Preparação das amostras de formulações farmacêuticas

Seis amostras de formulações farmacêuticas foram adquiridas em drogarias locais, sendo elas quatro de PAR e COD e duas de PAR e TRA. Das amostras de PAR e COD duas continham 500 mg/comprimido de PAR e 30 mg/comprimido de COD e duas 500 mg/comprimido de PAR e 7,5 mg/comprimido de COD, respectivamente. As amostras de PAR e TRA continham 325 mg/comprimido de PAR e 37,5 mg/comprimido de TRA, respectivamente. Para a preparação destas amostras, foram utilizados dez comprimidos de cada um, sendo então pesados e, em seguida, triturados utilizando-se um almofariz e pistilo. Posteriormente, a massa equivalente a um comprimido de cada amostra foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o seu volume completado com água ultrapura. As amostras foram levadas ao banho ultrassônico por 15 min e os sólidos não dissolvidos foram separados por filtração. Com isso, foram obtidas as respectivas soluções-estoque para cada amostra.

### 3.1.2 - Preparação das amostras biológicas sintéticas

Para poder investigar a potencialidade e seletividade dos procedimentos voltamétricos e/ou amperométricos desenvolvidos para a determinação simultânea de PAR e COD ou PAR e TRA em amostras biológicas reais de soro humano e urina, foram preparados fluidos biológicos sintéticos contendo a maioria dos componentes que poderiam estar presentes neste tipo de amostra, seguindo procedimentos pré-estabelecidos na literatura<sup>98,99</sup>.

Para a preparação das amostras de soro humano foram dissolvidos em água 3,0 g de NaCl, 2,3 mg de glicina, 3,2 mg de serina, 0,16 g de NaHCO<sub>3</sub>, 3,5 mg de triptofano, 6,6 mg de fenilalanina, 3,7 mg de tirosina, 6,3 mg de histidina, 9,1 mg de lisina, 29,0 mg de ácido aspártico, 10,0 mg de arginina e 9,1 mg de alanina utilizando um balão volumétrico de 250 mL. No caso das amostras de urina sintética, foram dissolvidos 0,40 g de KCl, 0,73 g de NaCl, 0,25 g de NH<sub>4</sub>Cl, 0,56 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,28 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,35 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 6,25 g de uréia em água utilizando um balão volumétrico de 250 mL. Em seguida as amostras foram fortificadas com concentrações conhecidas de PAR e COD e de PAR e TRA, e analisadas diretamente pelos respectivos métodos voltamétricos e/ou amperométricos.

### 3.2 - Instrumentação

Para a realização dos experimentos voltamétricos e amperométrico (CV, SWV, DPV e MPA), utilizou-se um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT – 12 (Eco Chemie, Holanda) acoplado a um computador gerenciado pelo software GPES 4.9.

As medidas de pH das soluções foram realizadas utilizando-se um pHmetro modelo Orion EA 940 equipado com um eletrodo de vidro e um eletrodo de referência externo Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>).

O equipamento de banho de ultrassom utilizado foi um UNIQUE modelo Ultraclean 1400 A.

Todas as pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica Mettler, modelo H10 com precisão de  $\pm 0,1$  mg e uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D com precisão de  $\pm 0,01$  mg.

Para as medidas cromatográficas utilizou-se um cromatógrafo modelo LC-10AT Shimadzu com detector de UV-VIS, modelo SPD-M10-AVP, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack CLC-ODS (6,0 × 150 mm, 5 μm) e um injetor manual com alça de amostragem de 20 μL.

### 3.2.1 - Eletrodos e célula eletroquímica

O eletrodo de trabalho utilizado foi o eletrodo de filme de diamante dopado com boro (dopagem de 8000 ppm) depositado sobre um substrato de silício, adquirido da Adamant Technologies SA, Suíça, no qual foi preparado como descrito previamente<sup>100</sup>.

A célula eletroquímica utilizada para as medidas voltamétricas e para o pré-tratamento do BDDE foi uma célula de vidro de compartimento único com capacidade de 25,0 mL, equipada com uma tampa de Teflon<sup>®</sup>, contendo três orifícios nos quais foram acoplados os eletrodos de referência, trabalho e contra eletrodo como mostrado na FIGURA 3.1.

Para a elaboração do eletrodo de trabalho foi utilizado um adaptador (tarugo) constituído de um *O-ring* de vedação que também serve para delimitar a área geométrica em 0,69 cm<sup>2</sup> e para o encaixe do BDDE, o eletrodo de referência foi o eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>) e como contra eletrodo utilizou-se uma placa de platina de 0,5 cm de largura e 1,0 cm de comprimento como pode ser visto na FIGURA 3.1.

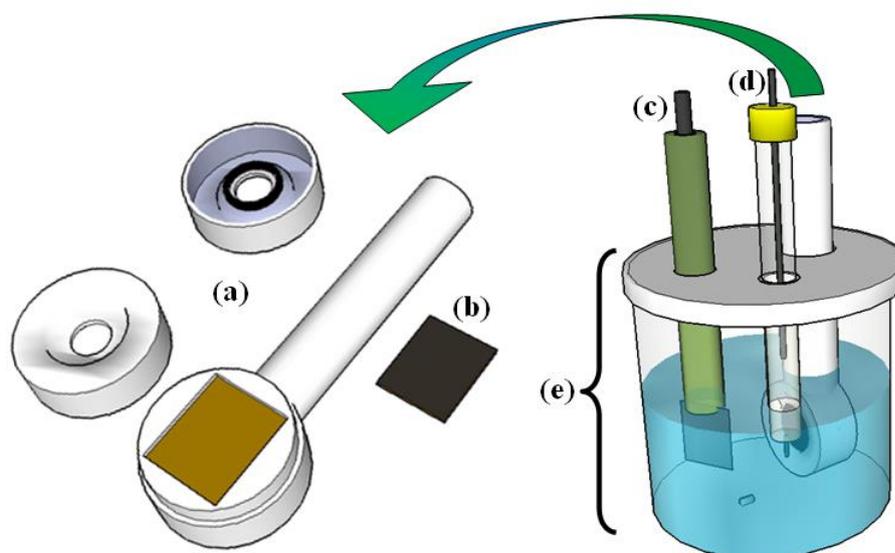


FIGURA 3.1 - Ilustração do (a) tarugo com um *O-ring* (anel) de vedação e delimitando a área geométrica em  $0,69 \text{ cm}^2$  para encaixe do (b) BDDE, (c) contra eletrodo, (d) eletrodo de referência e (e) célula de vidro com tampa de Teflon<sup>®</sup>, contendo três orifícios para acoplamento dos eletrodos.

A célula eletroquímica para o sistema FIA foi construída com uma configuração mista entre a configuração *wall jet* e camada delgada. Esta célula constituída de acrílico foi projetada de acordo com um modelo proposto por Richter *et al.*<sup>101</sup> com algumas modificações e adaptações feitas em nosso grupo de pesquisa. Na FIGURA 3.2 está ilustrada a montagem e a configuração da célula eletroquímica desenvolvida. Na qual o eletrodo de trabalho, no caso o BDDE, teve a sua área delimitada com o auxílio de um anel (*O-ring*) de borracha que também foi usado para vedar a passagem da solução. O eletrodo de referência foi um eletrodo de Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) miniaturizado de modo a ser acoplado no sistema. Já o eletrodo auxiliar foi um tubo em aço inoxidável que também serviu para a saída das soluções empregadas na análise.

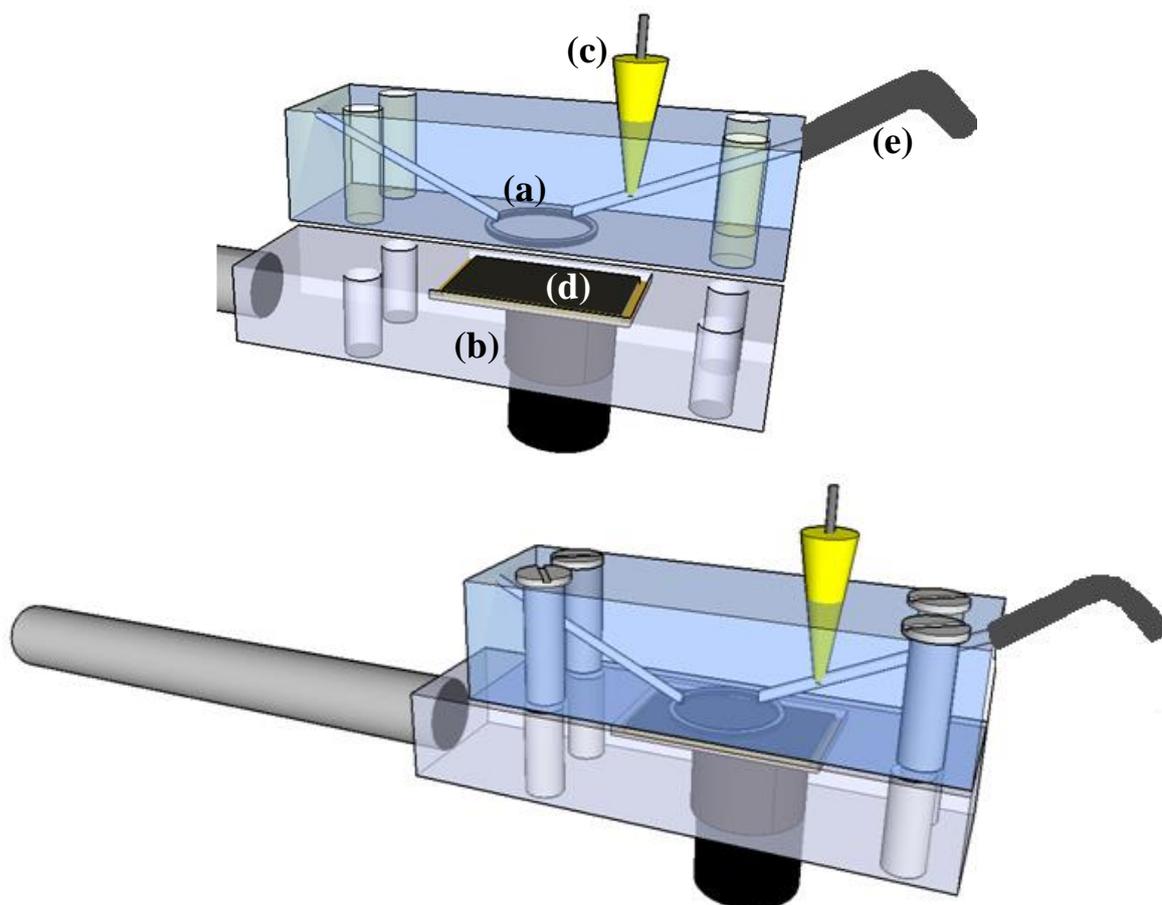


FIGURA 3.2 - Ilustração da célula eletroquímica para o sistema FIA. Em (a) suporte em acrílico com *O-ring* para vedação, (b) suporte em acrílico com contato elétrico para acomodação do eletrodo de trabalho, (c) eletrodo de referência (Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>)) miniaturizado, (d) BDDE, (e) eletrodo auxiliar em aço inoxidável e saída das soluções.

### 3.2.2 - Sistema FIA

O sistema FIA empregado foi composto basicamente por uma bomba peristáltica a qual foi utilizada para propulsionar a solução transportadora e as amostras, um injetor comutador manual construído em acrílico com alça de amostragem com volumes conhecidos para inserir as soluções padrão e as amostras, e uma célula eletroquímica como descrito anteriormente. Para os tubos da linha de condução e da alça de amostragem foram utilizados tubos de polipropileno de 0,8 mm de diâmetro interno. O esquema de um sistema FIA de linha única está representado na FIGURA 3.3.

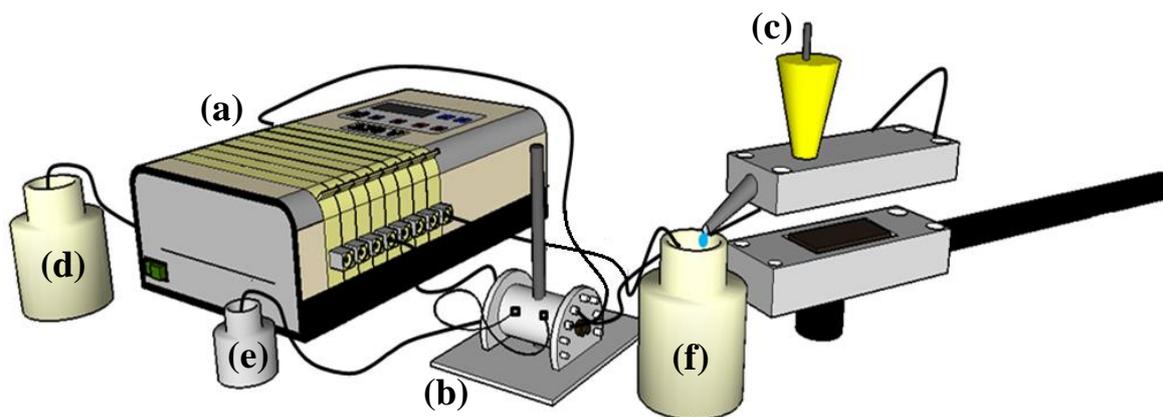


FIGURA 3.3 - Ilustração de um sistema FIA. As representações são: (a) bomba peristáltica, (b) injetor comutador manual, (c) célula eletroquímica, (d) solução transportadora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ), (e) solução da amostra e (f) descarte.

### 3.3 - Procedimentos analíticos

#### 3.3.1 - Pré-tratamento eletroquímico do BDDE

Para executar o PTA aplicou-se uma corrente de  $0,04 \text{ A cm}^{-2}$  por 30 s, e para executar o PTC aplicou-se uma corrente de  $-0,04 \text{ A cm}^{-2}$  por 180 s, ambos em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ . O PTC foi realizado em um tempo de seis vezes maior que o tempo de PTA, tendo em vista que é mais difícil reduzir do que oxidar o eletrólito suporte para a geração dos grupos funcionais. O pré-tratamento do BDDE foi realizado uma única vez a cada dia de trabalho antes de iniciar as medidas, sendo que o pré-tratamento selecionado era sempre precedido do outro pré-tratamento (por exemplo: quando se desejava um PTC, antes deste era realizado um PTA e assim vice-versa) para condicionamento e limpeza do eletrodo.

#### 3.3.2 - Procedimento analítico utilizando métodos voltamétricos para a determinação simultânea de PAR e COD

Para o desenvolvimento dos procedimentos voltamétricos para a determinação simultânea dos analgésicos PAR e COD foram seguidas as etapas

descritas abaixo.

Primeiramente utilizou-se a CV para estudar o perfil voltamétrico do BDDE e dos analitos. Em seguida, estudaram-se os tipos de pré-tratamento a ser empregado no BDDE, sendo eles o PTC e PTA, visto que esses podem interferir de maneiras distintas na intensidade de corrente e de potencial dos analitos.

Após a definição do tipo de pré-tratamento do BDDE, e tendo em vista a determinação simultânea do PAR e COD em fármacos, nos quais a concentração da COD se encontra em menor proporção, os parâmetros foram todos otimizados para se obter a melhor resposta eletroquímica para a COD. Assim, investigou-se o melhor eletrólito suporte (composição e pH), e com esse, posteriormente, foram otimizados os parâmetros para a SWV (frequência de aplicação do pulso ( $f$ ), amplitude de potencial ( $a$ ) e incremento de varredura ( $\Delta E$ )) e DPV (velocidade de varredura ( $v$ ), amplitude de potencial ( $a$ ) e tempo de modulação do pulso ( $t$ )) de forma a se obter as melhores condições analíticas para a determinação de COD.

Sob as condições ótimas, foram construídas as respectivas curvas analíticas para cada técnica voltamétrica. Desta forma, foi selecionada a técnica com os melhores resultados para a continuidade dos estudos analíticos para a determinação simultânea de PAR e COD. Os limites de detecção (LDs) foram calculados como sendo igual a três vezes o desvio padrão para o ensaio em branco ( $n = 10$ ), dividido pela sensibilidade da respectiva curva analítica<sup>102</sup>.

A estabilidade do método foi verificada através de estudos de repetibilidade intra-dia ( $n = 10$ ) e inter-dias ( $n = 5$ ). E ainda para investigar a seletividade do mesmo, foram realizadas análises dos concomitantes encontrados nas formulações farmacêuticas para verificar possíveis interferências destes nos sinais dos analitos.

O procedimento voltamétrico desenvolvido foi empregado na análise de amostras farmacêuticas e biológicas (urina e soro humano) fortificadas com concentrações conhecidas de cada analito. Estes foram determinados utilizando-

se a técnica de interpolação da corrente obtida para cada um nas amostras da curva analítica (corrente vs. concentração do analito).

As amostras farmacêuticas também foram analisadas empregando-se um método comparativo, que neste caso foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês – *High-performance liquid chromatography*) para a avaliação da exatidão do procedimento voltamétrico estabelecido, como será descrito posteriormente.

### **3.3.3 - Procedimento analítico utilizando FIA–MPA para a determinação simultânea de PAR e COD e de PAR e TRA**

Para o desenvolvimento do procedimento amperométrico utilizou-se o acoplamento da FIA–MPA para a determinação simultânea dos analgésicos PAR e COD e de PAR e TRA sendo suas etapas descritas abaixo.

Inicialmente, para poder definir os potenciais a serem aplicados a cada analito utilizou-se FIA–MPA, na qual, foram aplicados 10 pulsos de potenciais distintos de forma sequencial em uma ampla faixa de modo individual para cada analito. Com isso, foram construídos os voltamogramas hidrodinâmicos por meio dos sinais de corrente de pico obtido para os diferentes potenciais aplicados.

Posteriormente, foram otimizados os parâmetros do sistema FIA, a fim de encontrar as melhores condições analíticas para o desenvolvimento do sistema, deste modo, foram avaliados a vazão do sistema numa faixa de 1,1 a 5,5 mL min<sup>-1</sup> e o volume da alça de amostragem no intervalo de 50 a 500 µL. Em seguida, foi verificado o efeito do tempo de aplicação de pulso variando-se este na faixa de 100 a 250 ms.

Com os parâmetros da FIA–MPA já otimizados, foi avaliada a possibilidade da determinação simultânea dos analitos de interesse. Dessa forma, aplicou-se uma sequência com os dois pulsos de potenciais selecionados

em função do tempo sobre o BDDE, em uma solução contendo apenas um dos analitos de cada vez ou uma mistura de ambos os analitos.

Em seguida, para calcular o fator de correção (FC) para a determinação simultânea foi construída uma curva analítica aplicando os dois pulsos de potencial com apenas o analito de menor potencial de oxidação.

Para a obtenção dos amperogramas para a confecção da curva analítica, foram injetadas soluções contendo os padrões dos analitos em diferentes concentrações de forma crescente. Após cada injeção, foram registrados os sinais de corrente para cada pulso de potencial aplicado e com o FC construiu-se a curva analítica para cada analito. Os LDs foram obtidos aplicando-se o método de sinal/ruído, na proporção de 3:1<sup>103,104</sup>.

As amostras de formulações farmacêuticas e fluidos biológicos (urina e soro humano) foram injetadas de forma subsequente às injeções utilizadas para a obtenção da curva analítica. Foram verificados alguns dos concomitantes regularmente encontrados nas formulações farmacêuticas analisadas.

A estabilidade do procedimento proposto foi verificada através de estudos de repetibilidade intra-dia ( $n = 10$ ) e inter-dias ( $n = 3$ ) em três concentrações diferentes.

As amostras farmacêuticas também foram estudadas empregando-se um método comparativo (HPLC) para a avaliação da exatidão do procedimento amperométrico estabelecido, como será descrito posteriormente.

### **3.3.4 - Método comparativo**

As amostras de formulações farmacêuticas determinadas nesta dissertação empregando-se os métodos eletroanalíticos aqui desenvolvidos foram comparadas com os resultados obtidos empregando-se o HPLC.

As amostras contendo PAR e COD foram analisadas conforme procedimento descrito por Ramos-Martos *et al.*<sup>43</sup>, com algumas adaptações. A coluna cromatográfica empregada foi uma Shim-Pack CLC-ODS (6,0 mm × 150 mm,

5  $\mu\text{m}$ ). O comprimento de onda selecionado no detector UV–Vis (modelo SPD–M10–AVP) foi de 284 nm para ambos os compostos. A fase móvel foi uma mistura de acetonitrila/água (75/25 v/v) em um modo isocrático de eluição, com uma vazão de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ , e o volume de injeção foi de 20,0  $\mu\text{L}$ .

Para as amostras farmacêuticas contendo PAR e TRA foi utilizado o procedimento proposto por Karunakaran *et al.*<sup>105</sup>, com algumas adaptações. No qual utilizou-se um modo de eluição isocrático. A coluna cromatográfica empregada foi uma Shim-Pack CLC-ODS (6,0 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). A fase móvel foi composta de uma mistura de ácido trifluoroacético 0,1%, acetonitrila e metanol (50/8/42 v/v). O comprimento de onda selecionado no detector UV–Vis fotodiodo foi de 272 nm para os dois compostos. A vazão foi de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ , e um volume de injeção de 20,0  $\mu\text{L}$ .

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Determinação da área eletroativa do BDDE em diferentes pré-tratamentos

A área eletroativa foi estimada de acordo com o pré-tratamento da superfície do BDDE (PTA ou PTC), em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> na presença de hexacianoferrato (II) de potássio 1,0 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (FIGURA 4.1 (a) e (b)), usando a equação de Randles-Sevcik (Eq. 1)<sup>106</sup>.

$$I_p = \pm (2,69 \times 10^5) n^{3/2} AD^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Eq. 1}$$

onde  $I_p$  é a corrente de pico (A),  $n$  é o número de elétrons envolvidos na reação,  $A$  é a área eletroativa (cm<sup>2</sup>),  $D$  é o coeficiente de difusão do [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (7,6 × 10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>),  $v$  é a velocidade de varredura de potencial (V s<sup>-1</sup>), e  $C$  é a concentração do [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> em solução (mol cm<sup>-3</sup>). Os coeficientes angulares dos gráficos de  $I_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$  para o processo de oxidação foram: 3,00 × 10<sup>-4</sup> A V<sup>-1/2</sup> s<sup>1/2</sup> para o BDDE-PTA (FIGURA 4.1 (c)) e 3,65 × 10<sup>-4</sup> A V<sup>-1/2</sup> s<sup>1/2</sup> para o BDDE-PTC (FIGURA 4.1 (d)). As áreas eletroativas foram estimadas em 0,41 cm<sup>2</sup> para o BDDE-PTA, no qual se aplicou uma corrente de 0,04 A cm<sup>-2</sup> por 30 s e de 0,50 cm<sup>2</sup> para o BDDE-PTC, no qual se aplicou uma corrente de -0,04 A cm<sup>-2</sup> por 180 s (TABELA 4.1).

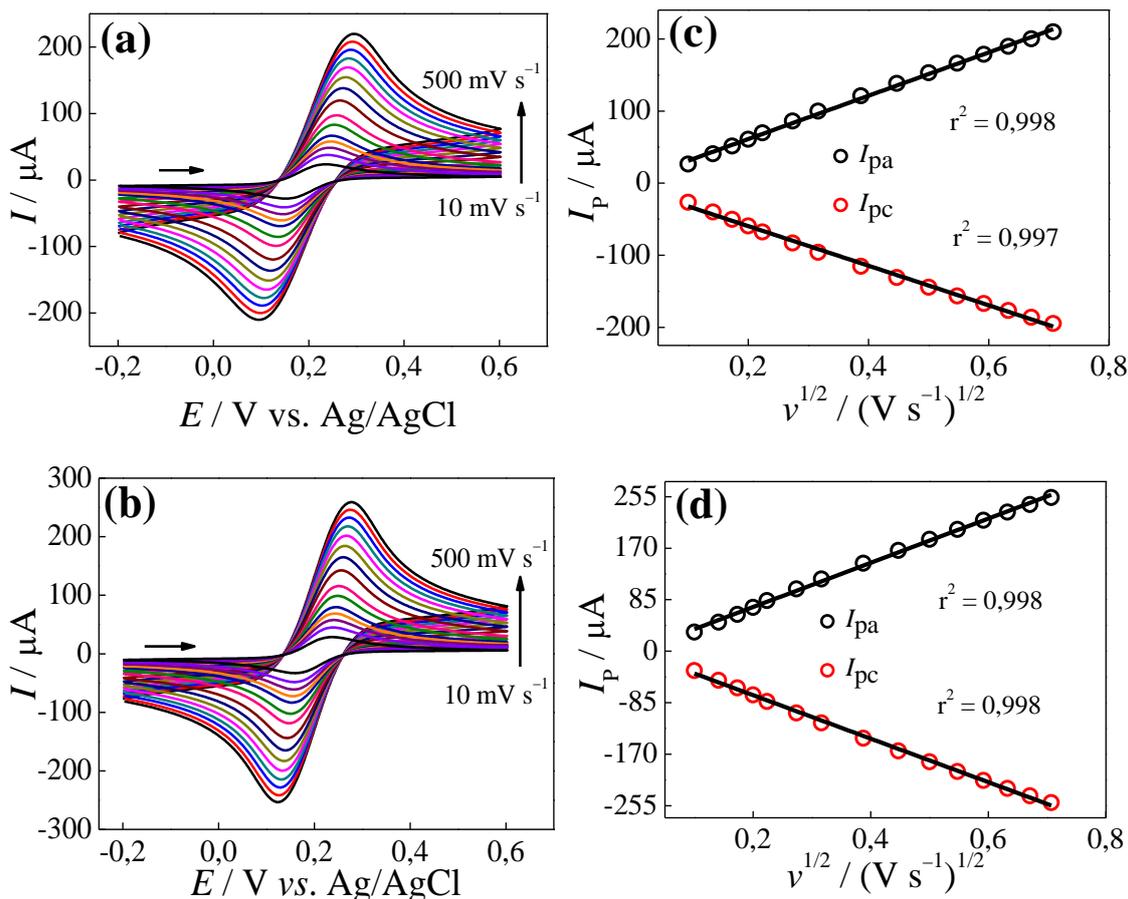


FIGURA 4.1- Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de BDD com (a) PTA e (b) PTC em diferentes velocidades de varredura (10; 20; 30; 40; 50; 75; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450 e 500  $mVs^{-1}$ ) em solução de  $K_4[Fe(CN)_6]$   $1,0 \times 10^{-3} mol L^{-1}$  preparada em  $KCl$   $0,1 mol L^{-1}$ . Gráfico da relação linear obtida de  $I_p$  versus  $v^{1/2}$  para correntes anódica ( $I_{pa}$ ) e catódica ( $I_{pc}$ ) em (c) PTA e (d) PTC.

TABELA 4.1 - Valores obtidos das áreas eletroativas do BDDE em diferentes pré-tratamentos empregando-se a equação de Randles-Sevcik

BDDE	Área geométrica ( $cm^2$ )	Área eletroativa ( $cm^2$ )
PTA	0,69	$0,41 \pm 0,01$
PTC	0,69	$0,50 \pm 0,01$

Como podem ser observadas as áreas eletroativas do BDDE com os diferentes pré-tratamentos (PTA e PTC) são menores que a área geométrica

(0,69 cm<sup>2</sup>) isso pode ser atribuído a não uniformidade da distribuição do boro na superfície do eletrodo, sendo ela, dependente do nível de dopagem<sup>107</sup>. Porém, com o PTC apresentou uma área eletroativa um pouco maior do que com o PTA, o que é coerente com o fato de que normalmente o comportamento cinético do par redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-/3-</sup> é mais reversível no BDDE-PTC do que com o PTA<sup>85</sup>. No entanto, as áreas eletroativas obtidas nestas duas condições de pré-tratamento são relativamente próximas (comparadas com a área geométrica), o que indica que a melhora da atividade eletroquímica do BDDE para alguns analitos, não está relacionada apenas a área eletroativa, mas, provavelmente, à interação do analito com os diferentes grupos funcionais promovidos pelo pré-tratamento na superfície do BDDE.

## 4.2 - Estudo do comportamento eletroquímico do PAR e da COD sobre o BDDE

Inicialmente, para observar o comportamento eletroquímico dos analgésicos foram realizados experimentos utilizando a técnica de CV empregando um BDDE-PTC.

Os voltamogramas cíclicos obtidos de forma individual e simultânea para as soluções de PAR (100,0 μmol L<sup>-1</sup>) e de COD (100,0 μmol L<sup>-1</sup>) preparadas em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) estão apresentados na FIGURA 4.2 (a) e (b). Como podem ser observados os dois compostos são eletroativos, e apresentaram pico de corrente no sentido positivo de varredura do potencial, indicando assim a ocorrência de processos de oxidação destes analitos sobre o BDDE. Além disso, não foi observado nenhum pico no sentido inverso de varredura (redução) nas condições empregadas, o que caracterizou um processo irreversível para estes compostos. Os potenciais de pico para cada composto apresentaram valores em torno de 750 e 1250 mV para o PAR e a COD, respectivamente, o que possibilitou a determinação simultânea destes analitos (FIGURA 4.2 (c)).

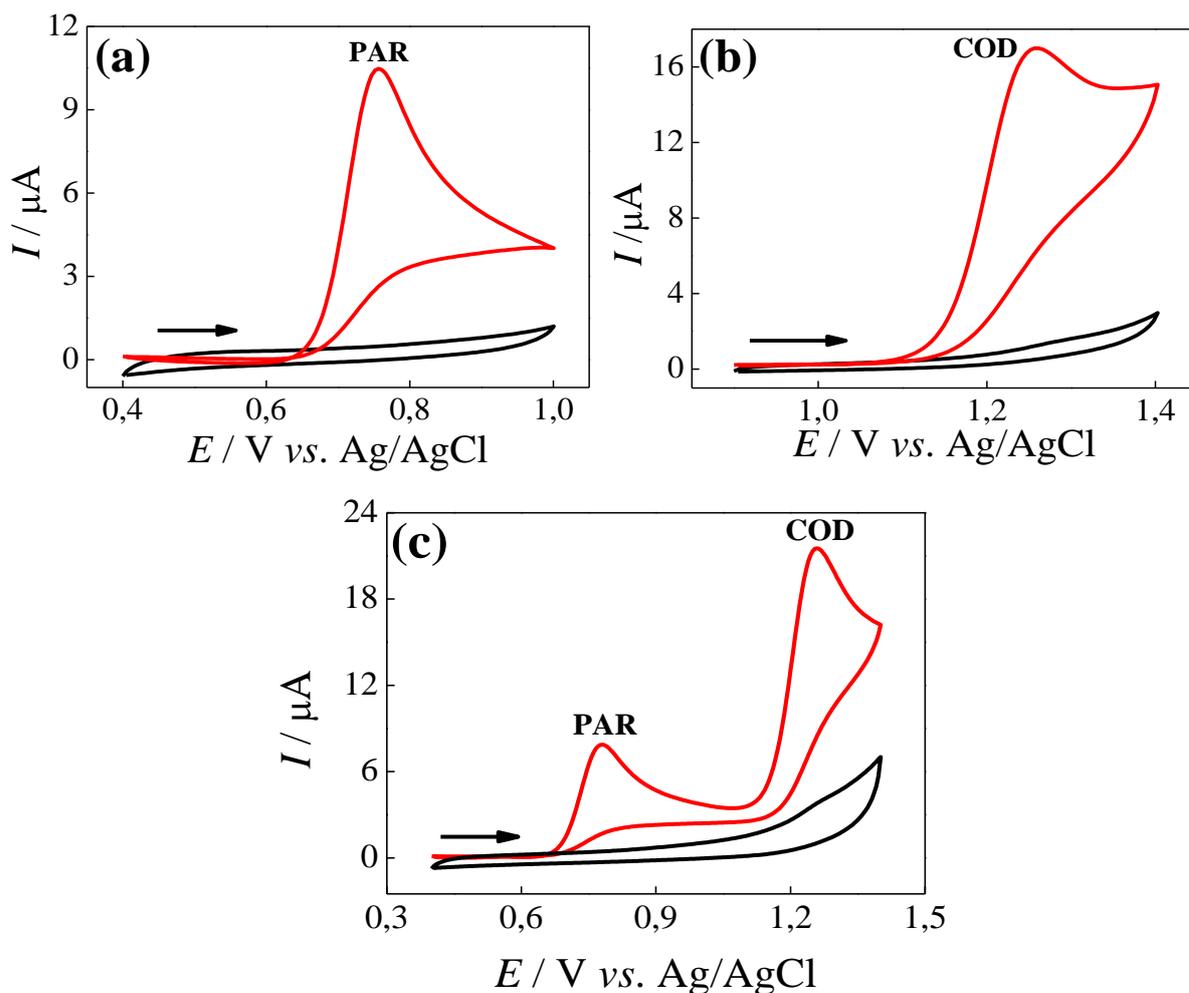


FIGURA 4.2 - Voltamogramas cíclicos empregando-se o BDDE-PTC, (a) na ausência (—) e na presença (—) de  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$  de PAR; (b) na ausência (—) e na presença (—) de  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$  de COD; (c) na ausência (—) e na presença (—) de  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$  de PAR e COD. Eletrólito suporte: tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0),  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.2.1 - Estudo do efeito dos PTA e PTC sobre o BDDE

Como mencionado anteriormente, o pré-tratamento eletroquímico feito no BDDE pode aumentar significativamente a atividade eletroquímica deste eletrodo para um determinado analito, sendo esta dependente da terminação superficial do eletrodo<sup>68,108</sup>. Uma superfície predominantemente terminada em hidrogênio é obtida com o BDDE-PTC<sup>80,81</sup>. Por outro lado, uma superfície predominantemente terminada com oxigênio é obtida com o BDDE-PTA<sup>80,81</sup>.

Com isso, um aumento da atividade eletroquímica pode aumentar o desempenho analítico do método eletroquímico gerando desta forma uma maior detectabilidade (valores menores de LD e limite de quantificação), aumento da seletividade (quando há diminuição do potencial de trabalho), maior sensibilidade (aumento do coeficiente angular da curva analítica), entre outros. Assim, fez-se um estudo da influência dos diferentes pré-tratamentos (catódico e anódico) do BDDE em relação ao comportamento eletroquímico dos analgésicos PAR e COD.

Deste modo, o efeito do pré-tratamento do BDDE foi investigado para a determinação simultânea de PAR e COD empregando-se a SWV, no qual foram utilizados soluções dos analitos de interesse nas concentrações de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o PAR e de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a COD em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0). O pré-tratamento eletroquímico sobre o BDDE foi realizado como descrito na Seção 3.3.1.

Na FIGURA 4.3 são apresentados os voltamogramas para as determinações individual e simultânea de PAR e COD utilizando o BDDE com os dois tipos de pré-tratamentos (PTA e PTC). Foi verificado que com o BDDE-PTC houve uma melhora na resposta eletroquímica de ambos os analitos em termos de maior intensidade de corrente e diminuição do potencial de oxidação. Para as correntes de picos de oxidação ocorreu um aumento por um fator de 1,8 e 9,5 para o PAR e COD, respectivamente. Além disso, a separação entre os picos de oxidação para estes analitos foi aumentada de 289 mV (PTA) para 441 mV (PTC). Assim, todos os novos ensaios foram realizados utilizando um BDDE-PTC.

O comportamento eletroquímico do BDDE diante dos diferentes pré-tratamentos (PTA ou PTC) já foram reportados na literatura de várias maneiras<sup>46,67,109</sup>. No entanto, há muita especulação tentando explicar a relação existente entre os grupos funcionais na superfície do eletrodo e a resposta voltamétrica. Porém, há certo consenso de que com o eletrodo pré-tratado

catodicamente é possível observa um aumento do sinal analítico e uma diminuição do potencial de trabalho na maioria das determinações.

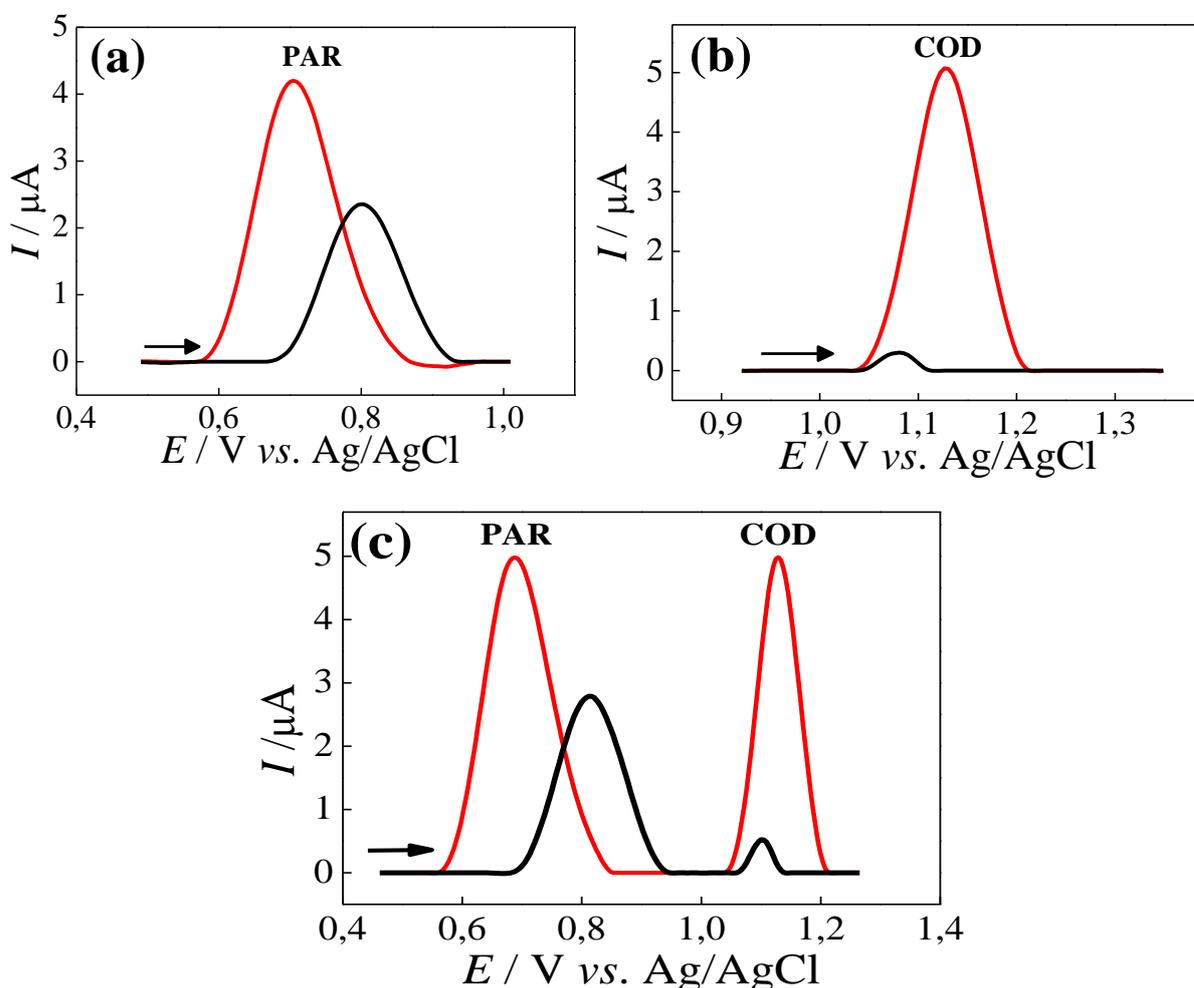


FIGURA 4.3 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o BDDE com diferentes pré-tratamentos em solução de (a) PAR  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (b) COD  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (c) PAR  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e COD  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  após PTA (→) e PTC (←). Eletrólito suporte: tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0); ( $f = 70 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ ).

#### 4.2.2 - Estudo da velocidade de varredura de potencial

O efeito da velocidade de varredura de potencial na resposta analítica do BDDE-PTC foi avaliada na presença de PAR ou COD  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0). Os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura ( $20 - 500 \text{ mV s}^{-1}$ ) são apresentados na

FIGURA 4.4 (a) e (b). A dependência do logaritmo da corrente de pico ( $\log I_p$ ) com o logaritmo da velocidade de varredura ( $\log v$ ) pode ser observada nos gráficos inseridos na FIGURA 4.4 (a) e (b). Os coeficientes angulares obtidos nas regressões lineares de  $\log I_p$  em função de  $\log v$  foram iguais a 0,45 e 0,60 para o PAR e COD, respectivamente, indicando assim a transferência difusional de massa do analito em solução para a superfície do BDDE-PTC, uma vez que os valores obtidos foram próximos do valor teórico de 0,5 reportados para processos controlados por difusão<sup>106</sup>. Esta informação foi confirmada pela relação linear obtida entre a corrente de pico ( $I_p$ ) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) para ambos analitos (gráficos inseridos na FIGURA 4.4 (a) e (b)), indicando assim que a transferência de massa das espécies é controlada por difusão segundo a equação de Randles-Sevcik.

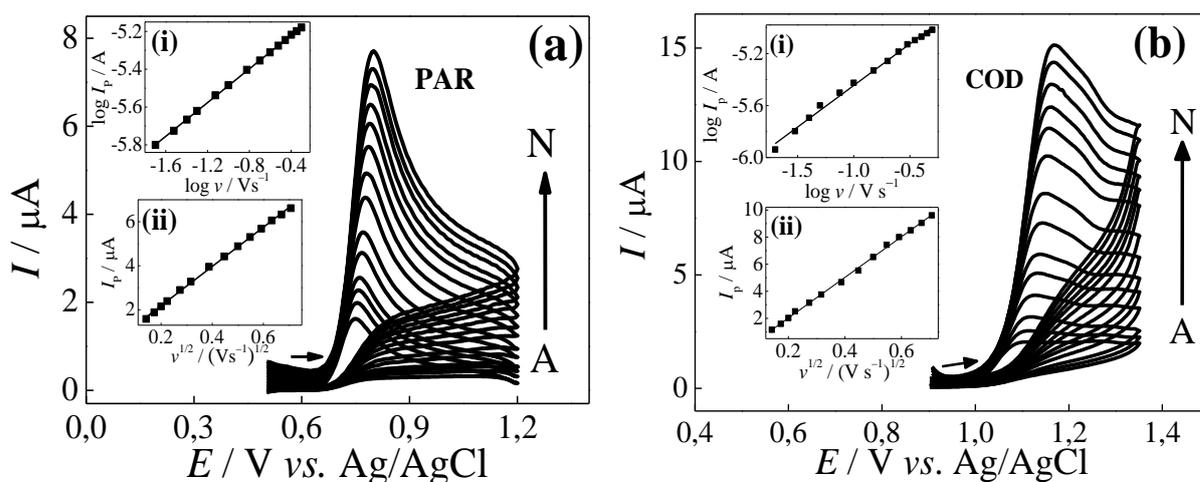


FIGURA 4.4 - Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de (a) PAR  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (b) COD  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  preparadas em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 4,0$ ) para diferentes velocidades de varredura ( $v$ ): (A – N) 20; 30; 40; 50; 75; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450 e  $500 \text{ mV s}^{-1}$ . Gráficos inseridos: (i)  $\log I_p$  versus  $\log v$  e da relação linear obtida de (ii)  $I_p$  versus  $v^{1/2}$ .

### **4.3 - Determinação simultânea de PAR e COD por voltametria utilizando um BDDE–PTC**

O primeiro procedimento eletroanalítico desenvolvido consistiu na determinação voltamétrica simultânea de PAR e COD em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas, e os resultados obtidos são apresentados a seguir.

#### **4.3.1- Comportamento eletroquímico da molécula de COD**

Após estudar o comportamento eletroquímico dos analitos e o tipo de pré-tratamento a ser utilizado no BDDE foram investigados o efeito do pH e do eletrólito suporte a ser empregado para a oxidação da COD e a melhor técnica a ser utilizada, SWV ou DPV. Os parâmetros foram todos otimizados para a COD, uma vez que este analito é encontrado em menor concentração que o PAR nas amostras de formulações farmacêuticas. Abaixo serão discutidos todos os estudos realizados.

##### **4.3.1.1 - Estudo do efeito do pH e do eletrólito suporte**

Inicialmente, foi investigado o efeito do pH do eletrólito suporte sobre a oxidação da COD no BDDE–PTC. Neste estudo foi utilizado tampão de Britton-Robinson  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  nos valores de pH iguais a 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 utilizando uma solução de COD  $4,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Como pode ser observado na FIGURA 4.5 (a), os voltamogramas de onda quadrada obtidos nas soluções com pHs 2,0–8,0 mostram que a reação de oxidação da COD depende da concentração hidrogeniônica do eletrólito suporte, sendo a maior magnitude do sinal analítico obtido em pH igual a 4,0. Pode ser observado também para a COD, que com o aumento do pH da solução de 2,0–8,0, o potencial de pico deslocou-se para valores menos positivos, mostrando que prótons estão envolvidos na reação eletroquímica (FIGURA 4.5 (b)). A dependência de  $E_p$  com o pH (FIGURA 4.5 (b)), apresentou uma relação linear na faixa de pH de 2,0 a 8,0, seguindo a

seguinte equação de regressão linear:  $E_p = 1,28 - 0,047\text{pH}$  ( $r = 0,997$ ). O valor do coeficiente angular obtido para a curva de  $E_p$  vs. pH foi próximo ao valor teórico de  $59,1 \text{ mV pH}^{-1}$  para processos envolvendo o mesmo número de prótons e elétrons. Este resultado sugere a transferência de 2 elétrons e 2 prótons durante a reação de eletrooxidação da molécula de COD, de acordo com o reportado na literatura<sup>54</sup>.

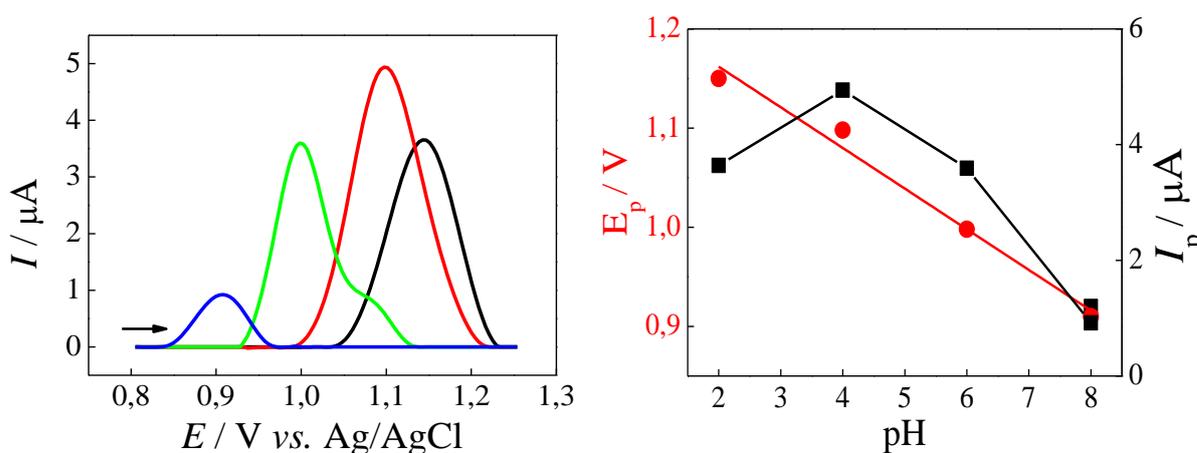


FIGURA 4.5 – (a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o BDDE–PTC em diferentes pHs: 2,0 (—); 4,0 (—); 6,0 (—) e 8,0 (—) em solução de COD  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (b) gráfico de  $E_p$  vs pH e de  $I_p$  vs pH. Eletrólito suporte: tampão de Britton-Robinson  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ; ( $f = 70 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ ).

Em seguida, diferentes eletrólitos suportes foram investigados usando uma concentração fixa de COD  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os eletrólitos investigados foram soluções tampão Britton-Robinson  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0), tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0), cloreto de potássio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH ajustado para 4,0 com solução de HCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ), tampão acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e nitrato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH ajustado para 4,0 com solução de  $\text{HNO}_3$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) (FIGURA 4.6). Como pode ser observado nesta figura, a maior magnitude do sinal analítico foi obtida em solução tampão acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) e solução de

KCl  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0). No entanto, o potencial de pico para a COD em solução tampão acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) foi de  $1,09 \text{ mV}$ , ligeiramente menor que aquele obtido em solução de KCl  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) que foi de  $1,13 \text{ mV}$ .

Tendo em vista os propósitos analíticos deste trabalho, e a pequena concentração da COD em comparação com o PAR em amostras farmacêuticas, decidiu-se trabalhar em pH 4,0 e tampão acetato como eletrólito suporte, uma vez que estes proporcionaram uma corrente de pico de maior intensidade, podendo desta forma levar a melhores parâmetros analíticos, tal como, alta sensibilidade e menor LD.

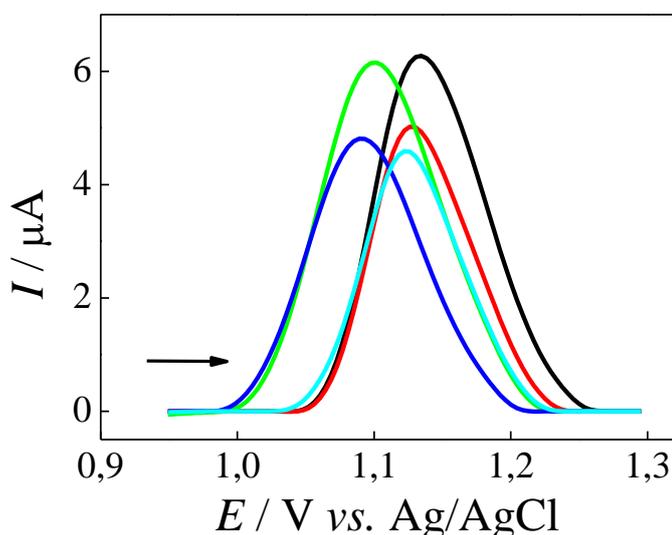


FIGURA 4.6 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o BDDE-PTC em diferentes eletrólitos suportes KCl  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (—), NaNO<sub>3</sub>  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (—), tampão de acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (—), tampão de Britton-Robinson  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (—) e tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (—) em solução de COD  $4,0 \text{ μmol L}^{-1}$ ; ( $f = 70 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ ).

#### 4.3.1.2 - Comparação entre as técnicas SWV e DPV

Para o desenvolvimento do método voltamétrico para a determinação da COD utilizando o BDDE-PTC e, posteriormente a determinação simultânea de PAR e COD, foram estudadas as técnicas de SWV e DPV. Em um primeiro

momento, foram otimizados os parâmetros experimentais relacionados com cada uma das técnicas utilizando uma solução de COD  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  preparada em tampão acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0). Na TABELA 4.2 são mostrados os intervalos em que cada um dos parâmetros foi estudado e os respectivos valores selecionados.

TABELA 4.2 - Parâmetros experimentais das técnicas de SWV e DPV otimizados para a determinação da COD

<b>Técnica</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Faixa estudada</b>	<b>Valor selecionado</b>
<b>SWV</b>	<b>Frequência, <math>f</math> (Hz)</b>	10 – 100	60
	<b>Amplitude, <math>a</math> (mV)</b>	10 – 100	60
	<b>Incremento, <math>\Delta E_s</math> (mV)</b>	1 – 8	4
<b>DPV</b>	<b>Velocidade, <math>v</math> (mV s<sup>-1</sup>)</b>	2,5 – 25	10
	<b>Amplitude, <math>a</math> (mV)</b>	10 – 100	90
	<b>Tempo de modulação, <math>t</math> (ms)</b>	2,5 – 20	10

Posteriormente, após a otimização dos parâmetros experimentais, foram construídas as respectivas curvas analíticas pela adição de diferentes concentrações da solução padrão de COD em solução de tampão acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0). Na FIGURA 4.7 estão representados os voltamogramas de SW e DP e as respectivas curvas analíticas. As faixas lineares obtidas para ambas as técnicas foram de  $8,99 \times 10^{-8}$  a  $9,81 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , e a SWV foi descrita pela seguinte equação  $\Delta I_p (\mu\text{A}) = -0,28 + 1,32 \times 10^6 C_{\text{COD}} (\text{mol L}^{-1})$  ( $r = 0,999$ ). Já a DPV foi descrita pela equação  $\Delta I_p (\mu\text{A}) = -0,08 + 0,78 \times 10^6 C_{\text{COD}} (\text{mol L}^{-1})$  ( $r = 0,999$ ). Os LDs foram calculados como 1,19 e 1,43  $\text{nmol L}^{-1}$  para SWV e DPV, respectivamente. Os LD foram calculados conforme a Eq. (2):

$$LD = \frac{3 \times s}{m} \quad \text{Eq. 2}$$

sendo  $s$  o desvio-padrão de 10 medidas do branco (apenas do eletrólito suporte) e  $m$  é o valor do coeficiente angular da curva analítica (sensibilidade).

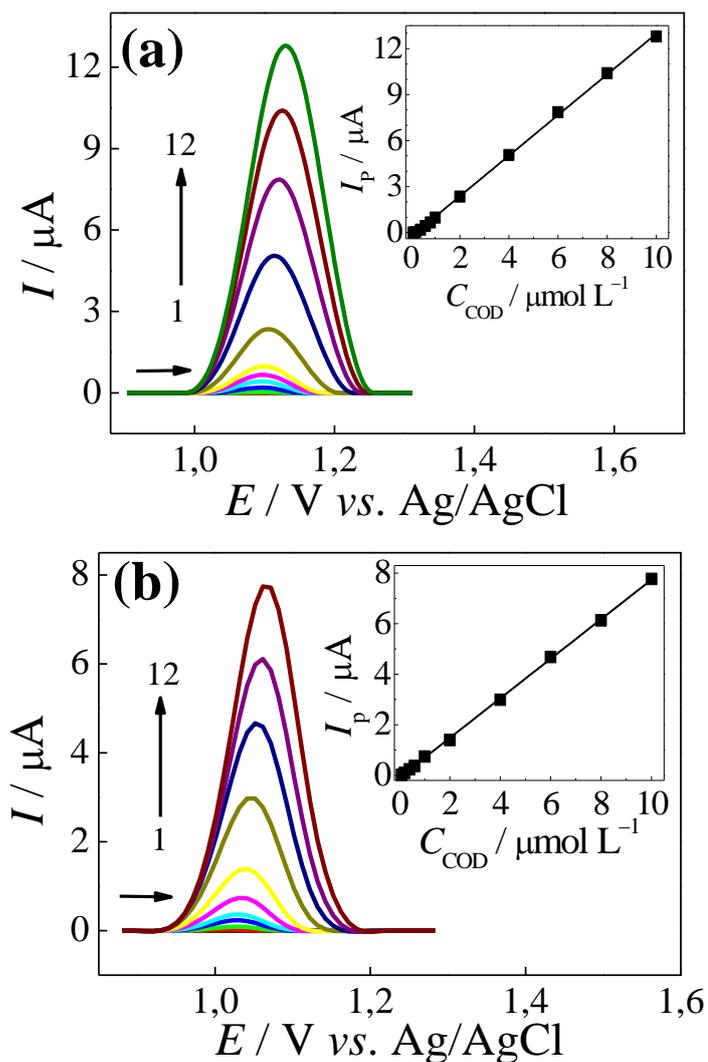


FIGURA 4.7 - (a) Voltamogramas de onda quadrada e (b) voltamogramas de pulso diferencial obtidas empregando-se o BDDE-PTC em tampão acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) para diferentes concentrações de COD: (1 – 12)  $0,09; 0,20; 0,40; 0,50; 0,79; 0,99; 1,98; 3,95; 5,91; 7,87$  e  $9,81 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Inseridos: curvas analíticas correspondentes.

Os parâmetros analíticos obtidos para a determinação individual da COD utilizando SWV e DPV estão apresentados na TABELA 4.3.

TABELA 4.3 - Parâmetros analíticos obtidos para determinação da COD utilizando a técnica de SWV e DPV

<b>Parâmetros analíticos</b>	<b>SWV</b>	<b>DPV</b>
<b>Faixa linear (mol L<sup>-1</sup>)</b>	0,09 – 9,81 × 10 <sup>-6</sup>	0,09 – 9,81 × 10 <sup>-6</sup>
<b>Sensibilidade (μA mol<sup>-1</sup> L)</b>	1,32 × 10 <sup>6</sup>	0,78 × 10 <sup>6</sup>
<b>Coefficiente de correlação (r)</b>	0,999	0,999
<b>Limite de detecção (mol L<sup>-1</sup>)</b>	1,19 × 10 <sup>-9</sup>	1,43 × 10 <sup>-9</sup>

Comparando os resultados obtidos empregando-se ambas as técnicas eletroanalíticas, pode-se notar que a técnica utilizando SWV apresentou os melhores parâmetros analíticos, tais como, maior sensibilidade e menor LD. Portanto, esta técnica voltamétrica foi selecionada para o desenvolvimento do procedimento eletroanalítico para a determinação simultânea de COD e PAR.

#### **4.3.2 - Determinação simultânea de PAR e COD utilizando SWV e o BDDE–PTC**

Para investigar a possibilidade da determinação simultânea do PAR e da COD, primeiramente, estudou-se o comportamento eletroquímico dos dois analgésicos um na presença do outro, sendo então fixada a concentração de um dos analitos e variando-se a concentração do outro, objetivando-se verificar se havia interferência na determinação de um analito no outro e vice-versa. Sendo assim, a curva analítica para o PAR foi construída variando-se a concentração de 0,20 – 97,3 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> e fixando-se a concentração da COD em 6,0 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>. Na FIGURA 4.8 (a) são mostrados os respectivos voltamogramas de onda quadrada, e como pode ser observada, a corrente de pico anódica para o

PAR aumentou regularmente com a concentração ( $\Delta I_p (\mu\text{A}) = 0,34 + 1,40 \times 10^5 C_{\text{PAR}} (\text{mol L}^{-1})$ ,  $r = 0,999$ ), demonstrando assim que a COD não interfere na quantificação do PAR, e por outro lado, a corrente de pico anódica para a COD se manteve praticamente constante mesmo com as adições sucessivas de PAR, com um desvio padrão relativo (RSD) de 1,53%. Posteriormente, a concentração de PAR foi fixada em  $60,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e a curva analítica para a COD foi construída variando a concentração de  $0,40 - 9,82 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Como pode ser observado na FIGURA 4.8 (b), na qual são apresentados os respectivos voltamogramas de onda quadrada, que a corrente de pico de oxidação para COD aumentou regularmente com a concentração ( $\Delta I_p (\mu\text{A}) = -0,46 + 8,48 \times 10^5 C_{\text{COD}} (\text{mol L}^{-1})$ ,  $r = 0,999$ ), e a corrente de pico de oxidação para o PAR permaneceu praticamente constante com um RSD de 1,11%, com estes resultados constatou-se que o PAR e a COD não sofre interferência na determinação um do outro.

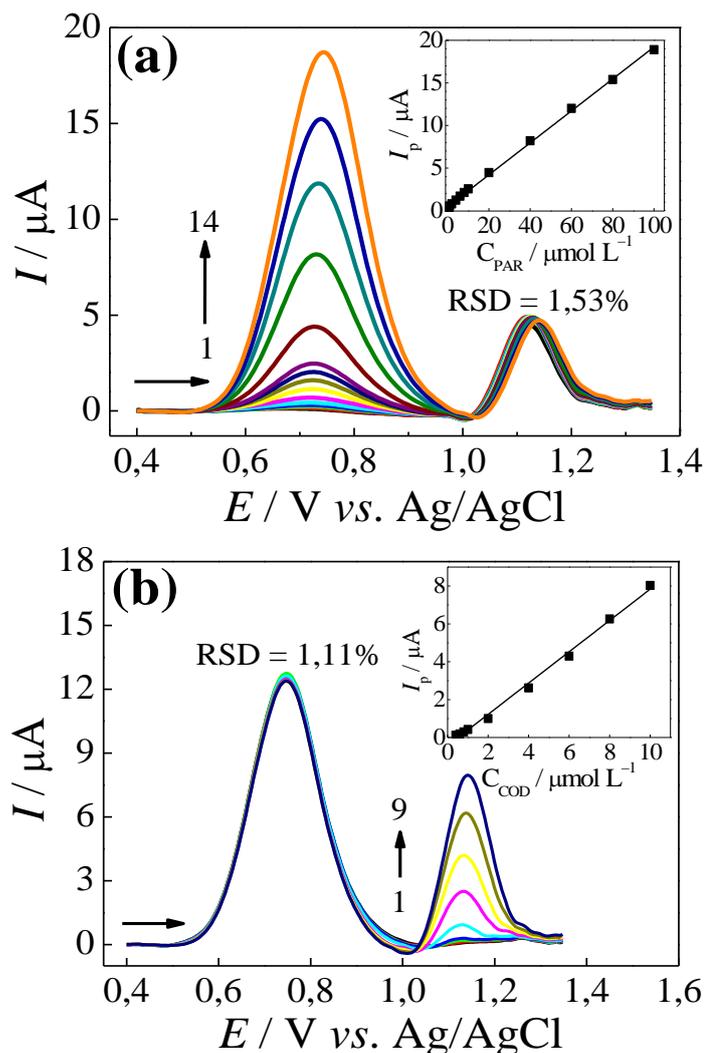


FIGURA 4.8 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando um BDDE-PTC para várias concentrações de: (a) PAR (1 – 14: 0,20; 0,40; 0,60; 1,00; 2,00; 4,00; 5,90; 7,90; 9,80; 19,6; 39,2; 58,6; 78,0 e 97,3  $\times 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ) a uma concentração fixa de COD ( $6,0 \times 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ); (b) COD (1 - 9: 0,40; 0,60; 0,79; 0,99; 1,98; 3,95; 5,91; 7,87 e 9,82  $\times 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ) a uma concentração fixa de PAR ( $60,0 \times 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ). Eletrólito suporte: solução tampão acetato 0,2 mol L $^{-1}$  (pH 4,0),  $f = 60$  Hz,  $a = 60$  mV e  $\Delta E_s = 4$  mV. Inserido: curva analítica correspondente.

Em seguida, determinaram-se simultaneamente ambos os analgésicos pela adição sucessiva dos padrões para a construção da curva analítica (corrente de pico anódica em função da concentração do analito) que foi linear na faixa de concentrações de  $0,20 - 95,8 \times 10^{-6}$  mol L $^{-1}$  para o PAR e de  $0,40 - 9,58 \times 10^{-6}$

mol L<sup>-1</sup> para a COD. Na FIGURA 4.9 (a) são mostrados os voltamogramas de onda quadrada obtidos e em (b) e (c) as respectivas curvas analíticas. As equações de calibração correspondentes foram:

$$\text{PAR: } \Delta I_p (\mu\text{A}) = 0,28 + 2,01 \times 10^5 C_{\text{PAR}} (\text{mol L}^{-1})$$

$$\text{COD: } \Delta I_p (\mu\text{A}) = -0,35 + 8,61 \times 10^5 C_{\text{COD}} (\text{mol L}^{-1})$$

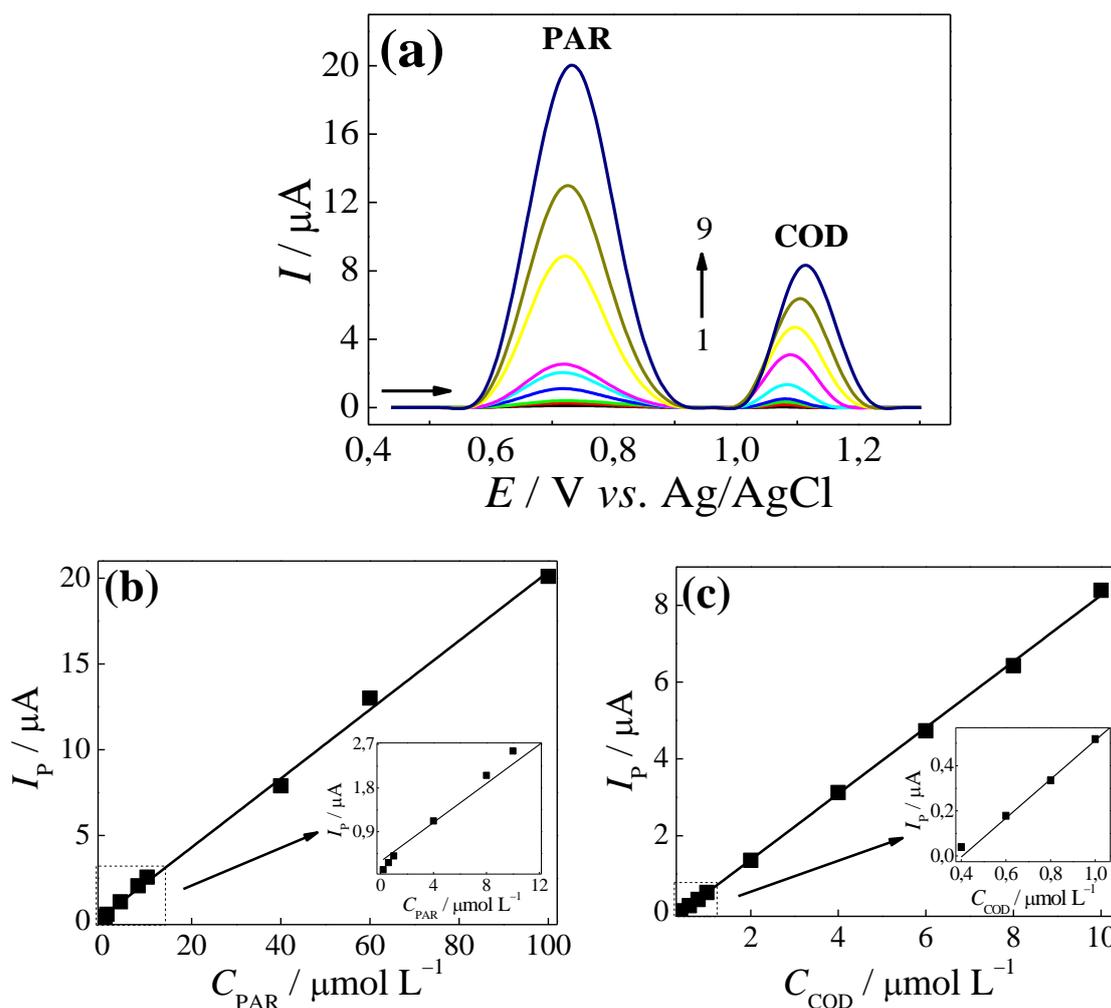


FIGURA 4.9 - (a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando um BDDE-PTC para várias concentrações de: PAR (1 – 9: 0,20; 0,60; 1,00; 3,90; 7,80; 9,70; 38,6; 57,6 e  $95,8 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) e COD (1 – 9: 0,40; 0,59; 0,79; 0,98; 1,95; 3,88; 5,79; 7,69 e  $9,58 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>). Curvas analíticas obtidas para (b) PAR e (c) COD. Eletrólito suporte: solução tampão acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) e  $f = 60$  Hz,  $a = 60$  mV e  $\Delta E_s = 4$  mV.

As curvas analíticas obtidas apresentaram coeficientes de correlação igual a 0,999 para ambos os analgésicos (PAR e COD), indicando assim uma boa linearidade na faixa de concentração estudada.

Os LDs (calculados como descrito na Seção 4.3.1.2) obtidos para ambos os analitos foram de  $1,80 \times 10^{-8}$  e  $1,44 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> para o PAR e COD, respectivamente. Na TABELA 4.4 são mostrados todos os parâmetros analíticos obtidos da determinação simultânea dos analgésicos utilizando um BDDE-PTC e a técnica de SWV.

TABELA 4.4 - Parâmetros analíticos obtidos na determinação simultânea de PAR e COD

Parâmetros analíticos	SWV	
	PAR	COD
Faixa linear (mol L <sup>-1</sup> )	0,02 – $9,58 \times 10^{-5}$	0,40 – $9,58 \times 10^{-6}$
Sensibilidade ( $\mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$ )	$2,01 \times 10^5$	$8,61 \times 10^5$
Coefficiente de correlação (r)	0,999	0,999
Limite de detecção (mol L <sup>-1</sup> )	$1,80 \times 10^{-8}$	$1,44 \times 10^{-8}$

Os parâmetros analíticos obtidos empregando-se o procedimento proposto foram comparados com os encontrados na literatura utilizados para a determinação simultânea de PAR e COD, como mostrado na TABELA 4.5. Como pode ser visto o BDDE-PTC apresentou um LD menor do que vários eletrodos empregados para o mesmo fim, por exemplo, Pournaghi-Azar e Saadatirad<sup>47</sup>, Ensafi *et al.*<sup>54</sup> e Babaei *et al.*<sup>48</sup> e muito semelhantes aos publicados por Afkhami *et al.*<sup>49</sup>. No entanto, deve-se notar que estes autores utilizam um eletrodo de carbono modificado com nanocompósito de óxido-grafeno e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, já o procedimento aqui proposto não emprega eletrodo modificado, sendo que o BDDE é ativado eletroquimicamente apenas uma vez antes de ser

utilizado durante um período de 8–9 horas de trabalho, simplificando desta maneira o procedimento eletroanalítico. O procedimento desenvolvido se mostrou simples e com excelente desempenho analítico para a determinação simultânea de PAR e COD em ampla faixa linear de concentrações destes analitos e LDs relativamente baixos.

TABELA 4.5 - Comparação entre vários métodos eletroanalíticos propostos para a determinação simultânea de PAR e COD

Eletrodo	Método	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Ref.
		PAR	COD	PAR	COD	
Al/Pd	DPV	100 – 3000	100 – 3000	5	5	[47]
Si/Pd	DPV	1,0 – 700	1,0 – 700	0,4	0,3	[54]
MWCNT/GCE	DPV	5 – 400	5 – 240	0,19	0,20	[48]
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -Grph/ CPE	SWV	0,03 – 12	0,03 – 12	0,025	0,011	[49]
BDDE-PTC	SWV	0,20 – 96	0,40 – 9,6	0,018	0,014	Este trab.

Al/Pd - camada fina de Pd eletrodepositada em Al; Si/Pd - nanoestrutura porosa de silício/paládio; MWCNT/GCE - carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas; CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-grph/CPE - pasta de carbono modificado com nanocompósito de óxido-grafeno e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

#### 4.3.2.1 - Estudo de repetibilidade e de possíveis interferentes

As repetibilidades intra-dia e inter-dias foram realizadas em solução tampão acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) utilizando a técnica de SWV. Sendo assim, a repetibilidade intra-dia foi determinada por meio de medições sucessivas ( $n = 10$ ) de PAR  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e COD  $8,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. Os RSDs determinados foram iguais a 1,2% para o PAR e 1,8% para a COD. Um nível

mais elevado de concentração também foi testado: PAR a  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e COD em  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, sendo obtidos RSDs de 0,9% para o PAR e 1,3% para a COD.

A repetibilidade inter-dias foi avaliada pela determinação voltamétrica em cinco dias diferentes ( $n = 5$ ) de uma solução contendo PAR  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e COD  $8,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, sendo obtidos valores de RSDs igual a 3,9% para o PAR e de 4,9% para a COD. Em seguida, estudaram-se concentrações mais elevadas (PAR em  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e COD em  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) sendo encontrados RSDs de 3,2% e 4,2% para o PAR e COD, respectivamente.

Os resultados de repetibilidade intra e inter-dias obtidos foram satisfatórios com RSDs menores do que 5,0% para todas as concentrações estudadas. Estes resultados mostram a excelente precisão do procedimento proposto.

Para a análise dos possíveis interferentes, foram estudados alguns dos excipientes tipicamente encontrados em formulações farmacêuticas contendo PAR e COD, a saber: estearato de magnésio, amido, dióxido de silício, celulose, bissulfito de sódio, ácido benzóico e benzoato de sódio. Nestes estudos, empregou-se solução tampão acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) contendo 10,0 μmol L<sup>-1</sup> de PAR e 4,0 μmol L<sup>-1</sup> de COD. As medidas foram feitas nas razões de concentração de analito/excipiente de 1:10 para o PAR e de 1:25 para a COD. Como mostrado na TABELA 4.6, todas as espécies estudadas resultaram em interferências menores do que 7% nestas razões de concentrações estudadas. Os resultados se mostraram aceitáveis devido à elevada razão de concentração dos concomitantes empregadas nestes estudos, sendo bem maiores que aquelas concentrações encontradas nas amostras analisadas.

TABELA 4.6 - Efeito de possíveis interferentes para determinação voltamétrica simultânea de PAR e COD em formulações farmacêuticas

Excipiente	PAR (%) <sup>a</sup>	COD (%) <sup>a</sup>
	1 : 10	1 : 25
Estearato de magnésio	1,6	2,9
Amido	-5,5	-1,6
Dióxido de silício	-2,0	-1,6
Celulose	-2,2	-1,1
Docusato de sódio	-1,7	2,1
Bissulfito de sódio	2,5	-6,4
Ácido benzóico	1,9	3,2
Benzoato de sódio	0,0	0,8

<sup>a</sup>  $n = 3$ .

#### 4.3.2.2 - Determinação simultânea de PAR e COD em amostras farmacêuticas

Em seguida, o procedimento voltamétrico proposto foi aplicado para a determinação simultânea de PAR e COD em quatro amostras farmacêuticas comerciais. O procedimento usado para determinar a concentração de PAR e COD em cada amostra farmacêutica foi o de interpolação a partir da curva analítica. Na TABELA 4.7 são mostrados os resultados obtidos da determinação simultânea de PAR e COD em amostras farmacêuticas comerciais empregando o procedimento proposto (SWV) e o comparativo (HPLC). Como podem ser observados, os erros relativos da comparação dos teores destes analitos determinados empregando-se os dois métodos analíticos são menores do que 10 %, mostrando assim a importância do método voltamétrico proposto. Ademais, os resultados obtidos empregando-se os dois métodos analíticos foram comparados estatisticamente aplicando-se o teste  $t$ -pareado para um nível de confiança de 98%. Os valores calculados do  $t_{exp.}$  (4,33 para o PAR e 1,49 para a

COD) foram menores do que o valor do  $t_{\text{crítico}}$  (4,54;  $\alpha = 0,02$ ). Deste modo, pode-se concluir que não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos aplicando-se os dois métodos, a este nível de confiança. Estes valores indicaram a excelente exatidão do procedimento voltamétrico, confirmando assim, que o procedimento proposto utilizando um BDDE-PTC é apropriado para a determinação simultânea de PAR e COD em formulações farmacêuticas comerciais.

TABELA 4.7 - Resultados da determinação simultânea de PAR e COD em formulações farmacêuticas pelo procedimento proposto (SWV) e por HPLC

Amostra	PAR (mg)			COD (mg)		
	HPLC <sup>a</sup>	SWV <sup>a</sup>	Erro (%) <sup>b</sup>	HPLC <sup>a</sup>	SWV <sup>a</sup>	Erro (%) <sup>b</sup>
A	576 ± 12	551 ± 6	-4,3	29,0 ± 0,4	29,4 ± 0,2	1,4
B	553 ± 8	504 ± 1	-8,9	26,6 ± 0,7	26,1 ± 0,4	-1,9
C	525 ± 1	509 ± 10	-3,0	6,1 ± 0,1	6,7 ± 0,1	9,8
D	541 ± 4	498 ± 9	-7,9	5,7 ± 0,1	6,2 ± 0,0	8,8

<sup>a</sup>  $n = 3$ ; <sup>b</sup> Erro % =  $((100 * (\text{valor SWV} - \text{valor HPLC})) / \text{valor HPLC})$

#### 4.3.2.3 - Determinação simultânea de PAR e COD em amostras de fluidos biológicos

Finalmente, a determinação simultânea de PAR e COD em fluidos biológicos sintéticos (urina e o soro humano) foram realizadas utilizando-se a SWV e um BDDE-PTC. A urina e o soro humano foram enriquecidos com duas concentrações diferentes de PAR e COD e analisados pelo método proposto. Os resultados mostrados na TABELA 4.8 (recuperação, variando de 98,0 – 106%), indicam que não houve interferência significativa da matriz para as amostras analisadas pelo procedimento proposto, e que o mesmo tem um grande potencial

para ser aplicado em determinações simultâneas de PAR e COD em amostras biológicas reais.

TABELA 4.8 - Determinação simultânea de PAR e COD em amostras de fluidos biológicos utilizando SWV e um BDDE-PTC

Amostra	PAR			COD		
	Adic. ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Determ. <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Rec. (%)	Adic. ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Determ. <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Rec. (%)
Urina	1,00	1,03 $\pm$ 0,09	103	0,50	0,49 $\pm$ 0,08	98,0
Urina	60,0	59,1 $\pm$ 0,1	98,5	6,00	5,98 $\pm$ 0,09	99,7
S.H.	1,00	1,01 $\pm$ 0,09	101	0,50	0,49 $\pm$ 0,07	98,0
S.H.	60,0	59,5 $\pm$ 0,1	99,2	6,00	6,38 $\pm$ 0,05	106

<sup>a</sup>  $n = 3$ ; Adic. = Adicionado; Determ. = Determinado; Rec. = Recuperado; S.H. = Soro humano.

#### 4.4 - Determinação simultânea de PAR e COD empregando-se FIA-MPA e um BDDE-PTC

O segundo procedimento analítico desenvolvido envolve a determinação simultânea de dois analgésicos (PAR e COD) utilizando FIA-MPA.

Como discutido anteriormente (Seção 4.2) o comportamento eletroquímico das moléculas de PAR e COD foram investigadas inicialmente por voltametria cíclica, sendo então constatada a viabilidade da aplicação eletroanalítica empregando-se o eletrodo de diamante dopado com boro. Outro parâmetro estudado foi o tipo de pré-tratamento aplicado sobre a superfície do BDDE, sendo eles, o PTA e o PTC, no qual, como já avaliado (Seção 4.2.1) a resposta eletroquímica destes compostos são melhorados quando se aplica o PTC sobre a superfície do BDDE. Sendo assim, no início de todos os dias de trabalho, antes de realizar as medidas amperométricas, o BDDE foi previamente pré-tratado catodicamente e utilizado em seguida por 8-9 horas de trabalho.

#### 4.4.1 - Otimização das condições do sistema FIA-MPA

Após ter definido o melhor tipo de pré-tratamento a ser empregado no BDDE e tendo em vista a resposta eletroquímica das moléculas alvo de PAR e COD, foram feitos diversos experimentos para a otimização das condições de trabalho do sistema FIA-MPA. Em um primeiro momento, avaliou-se a influência da composição da solução transportadora sobre os sinais de FIA-MPA. Neste estudo, as seguintes composições da solução transportadora foram testadas: tampão Britton-Robinson (BR) 0,04 mol L<sup>-1</sup> (pH variando entre: 2,0–12,0) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Os melhores parâmetros analíticos como maior magnitude do sinal analítico e melhor separação entre os picos, foram obtidos utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> (dados não apresentados). Desta forma, o efeito da concentração do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi investigado no intervalo de concentração deste ácido de 0,01 a 0,50 mol L<sup>-1</sup>. A maior corrente (maior sinal analítico) e melhor separação entre os sinais foram verificados utilizando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> como solução transportadora (dados não apresentados). Dessa forma, a solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> foi selecionada como solução transportadora para o restante das análises.

Também foram estudados os potenciais a serem aplicados para a determinação simultânea de PAR e COD utilizando o sistema FIA-MPA. Nesta avaliação, foram empregados dez pulsos de potenciais sequenciais (600 mV a 1600 mV) aplicados no BDDE-PTC com injeções sucessivas da solução eletrolítica contendo 10,0 μmol L<sup>-1</sup> de PAR ou COD. Os amperogramas obtidos são mostrados na FIGURA 4.10 (a). A partir das correntes de pico registradas para cada pulso de potencial aplicado, foram construídos os respectivos voltamogramas hidrodinâmicos, como pode ser observado na FIGURA 4.10 (b). Com esses resultados foi possível observar que o PAR começou a se oxidar em 750 mV, e a corrente de pico aumentou até um potencial de 950 mV, mantendo-se praticamente constante em potenciais superiores. Já a oxidação da COD começou em 1100 mV, e, de forma semelhante ao caso do PAR, a corrente de

pico aumentou significativamente até 1400 mV e manteve-se quase constante para valores mais elevados para os pulsos de potenciais aplicados. Com base nesses dados, os pulsos de potencial de 950 mV e 1400 mV foram selecionados para o PAR e para a COD, respectivamente. Ademais, o PAR foi determinado sem a interferência da COD por não sofrer oxidação no potencial de 950 mV. No entanto, no potencial igual a 1400 mV ambos os analitos (PAR e COD) foram oxidados. Como o sinal analítico para o PAR é ligeiramente maior no potencial de 1400 mV que aquele verificado no potencial de 950 mV, foi determinado um fator de correção (FC). Este FC foi calculado após a otimização do sistema de FIA-MPA, que incluiu a investigação da influência da vazão, volume da amostra injetada e o tempo de pulso de potencial aplicado.

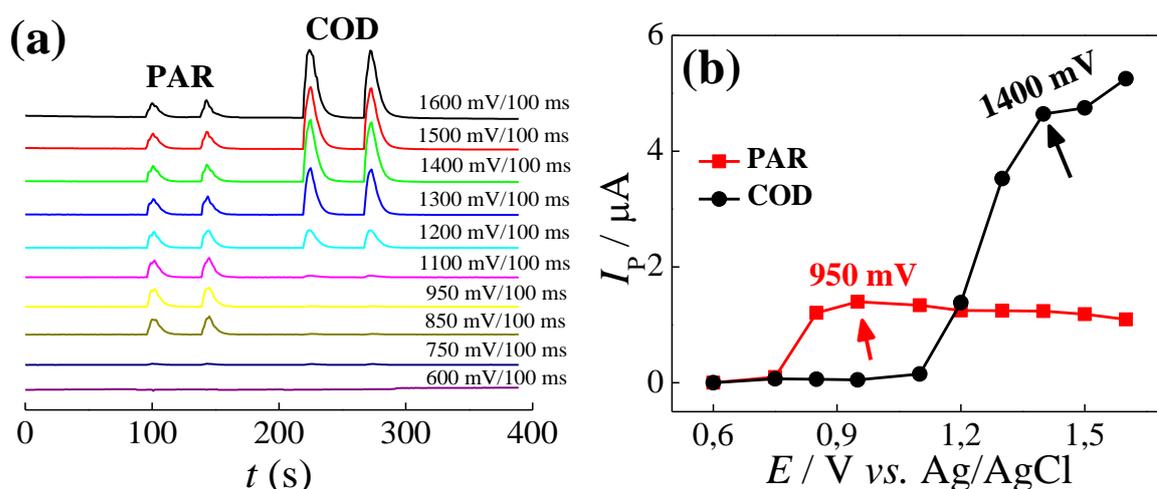


FIGURA 4.10 - (a) Amperogramas obtidos empregando FIA-MPA após injeções únicas de cada solução eletrolítica contendo PAR  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou COD  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (b) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para o PAR e COD representados graficamente pelos valores da corrente de pico em função dos correspondentes potenciais de pulso aplicado. Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $350,0 \mu\text{L}$  e vazão:  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### 4.4.1.1 - Estudo do efeito do tempo de aplicação dos pulsos de potencial

Para a realização do estudo do efeito do tempo de aplicação dos pulsos de potencial foram utilizadas soluções de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR e COD, respectivamente, em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  como solução transportadora. Sendo assim, dois pulsos de potencial foram aplicados variando-se o tempo de aplicação entre 100 e 250 ms para o PAR (950 mV) e para a COD (1400 mV) no BDDE-PTC. Na FIGURA 4.11 são mostrados os gráficos da magnitude de corrente de pico em função do tempo de aplicação do pulso de potencial. Como pode ser notado na FIGURA 4.11 (a), a magnitude do sinal analítico do PAR (950 mV) aumentou significativamente com o aumento do tempo de aplicação dos pulsos de potencial até 200 ms e, em tempos superiores, ocorreu uma diminuição do sinal analítico. Para a COD (1400 mV), a magnitude do sinal analítico diminuiu constantemente com o aumento do tempo de aplicação dos pulsos de potencial, como mostrado na FIGURA 4.11 (b). Sendo assim, seleccionou-se um tempo de aplicação dos pulsos de potencial de 200 ms para o PAR e de 100 ms para a COD, por apresentarem maior sinal analítico (maior magnitude de corrente).

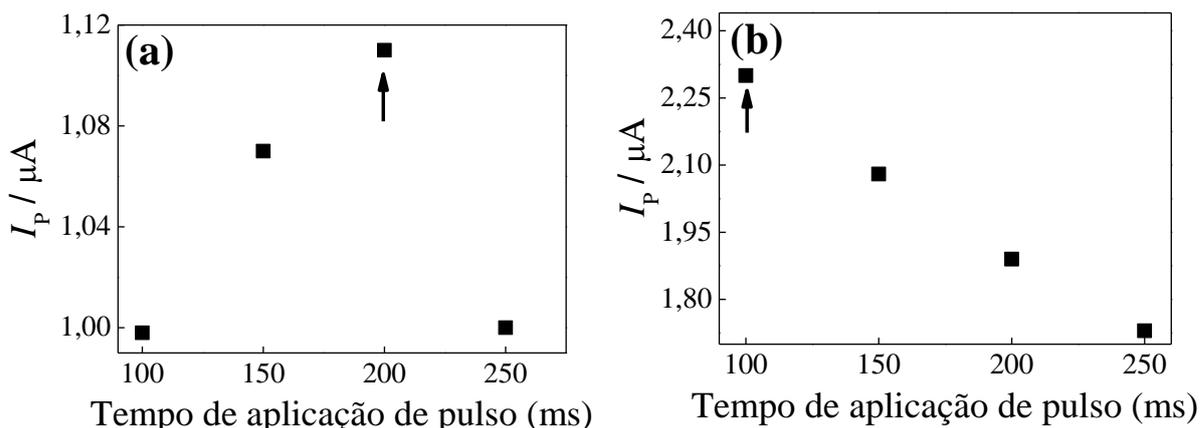


FIGURA 4.11 - Magnitude dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação de pulsos de potencial: 100 a 250 ms, (a) PAR  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial: 950 mV e (b) COD  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial: 1400 mV. Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### 4.4.1.2 - Estudo da otimização dos parâmetros do sistema FIA

Por se tratar de um sistema em fluxo, alguns parâmetros do sistema FIA devem ser otimizados, tais como: vazão da solução transportadora (neste caso,  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) e volume de amostra inserida no sistema FIA. Estes dois parâmetros do sistema são responsáveis por controlar o tempo de contato da zona de amostra com o eletrodo, ou seja, devem ser otimizados para se obter as melhores condições analíticas.

Na FIGURA 4.12 (a), são apresentados os gráficos de magnitude de corrente de pico em função da vazão da solução transportadora. A vazão foi investigada no intervalo de  $1,1 - 5,5 \text{ mL min}^{-1}$ , aplicando-se os potenciais de 950 e 1400 mV sobre o BDDE-PTC para uma solução contendo  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR e COD, respectivamente. Ao analisar a FIGURA 4.12 (a), nota-se que, para ambos os analitos, o comportamento foi praticamente o mesmo, ou seja, o sinal de corrente de pico aumentou significativamente com o aumento da vazão até aproximadamente  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ , mantendo-se quase constante nas vazões

superiores. Sendo assim, uma vazão de  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$  da solução transportadora foi selecionada para os trabalhos posteriores.

Em sequência, avaliou-se o efeito do volume da amostra injetada no sistema FIA em um intervalo de  $50 - 500 \mu\text{L}$ , utilizando-se uma solução de PAR  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e COD  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  simultaneamente. Como pode ser observado a partir da FIGURA 4.11 (b), o sinal de corrente aumentou até um volume de amostra de  $350 \mu\text{L}$  mantendo-se praticamente constante após este volume de amostra. Assim, o volume de  $350 \mu\text{L}$  da amostra injetada foi selecionado para os estudos subsequentes.

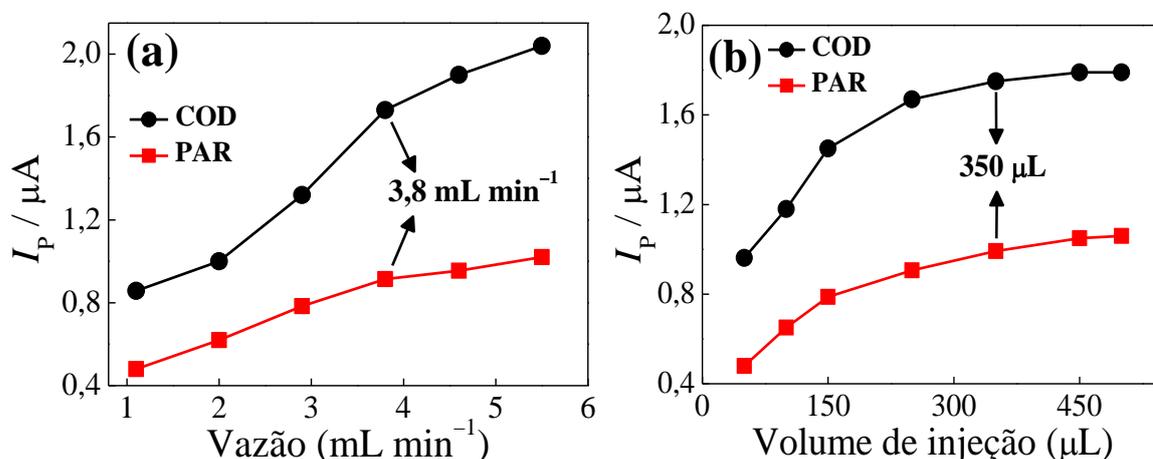


FIGURA 4.12 - Magnitude dos sinais da corrente de pico do PAR e da COD a  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função da (a) vazão (intervalo:  $1,1 - 5,5 \text{ mL min}^{-1}$ ) e do (b) volume da amostra injetada (intervalo:  $50 - 500 \mu\text{L}$ ). Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.4.2 - Estudo do comportamento eletroquímico do PAR e da COD utilizando FIA-MPA e um BDDE-PTC

Para avaliar a possibilidade da determinação eletroquímica simultânea dos analgésicos PAR e COD, foram obtidos amperogramas com a aplicação de dois pulsos de potencial no BDDE em função do tempo, a saber:  $950 \text{ mV}$  por  $200 \text{ ms}$  e  $1400 \text{ mV}$  por  $100 \text{ ms}$ , para injeções em triplicata com soluções eletrolíticas contendo  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR,  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  COD ou uma mistura de PAR e

COD a  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Como pode ser observado na FIGURA 4.13, no potencial de 950 mV apenas o PAR foi oxidado, e, no potencial de 1400 mV ambos os analitos (PAR e COD) foram oxidados. Além disso, é possível confirmar que a corrente de oxidação para o PAR detectado a 950 mV foi idêntica na presença ou ausência da COD, e que a corrente de oxidação a 1400 mV é a soma dos sinais analíticos de ambos os analitos neste potencial (PAR + COD). Portanto, é possível concluir que não há nenhuma interferência ou qualquer interação entre os compostos, tornando assim possível a determinação simultânea destes analgésicos. Porém, como os dois analitos são oxidados em potencial de 1400 mV é necessário a subtração do sinal de corrente do PAR para se obter o sinal analítico da COD, como discutido a seguir.

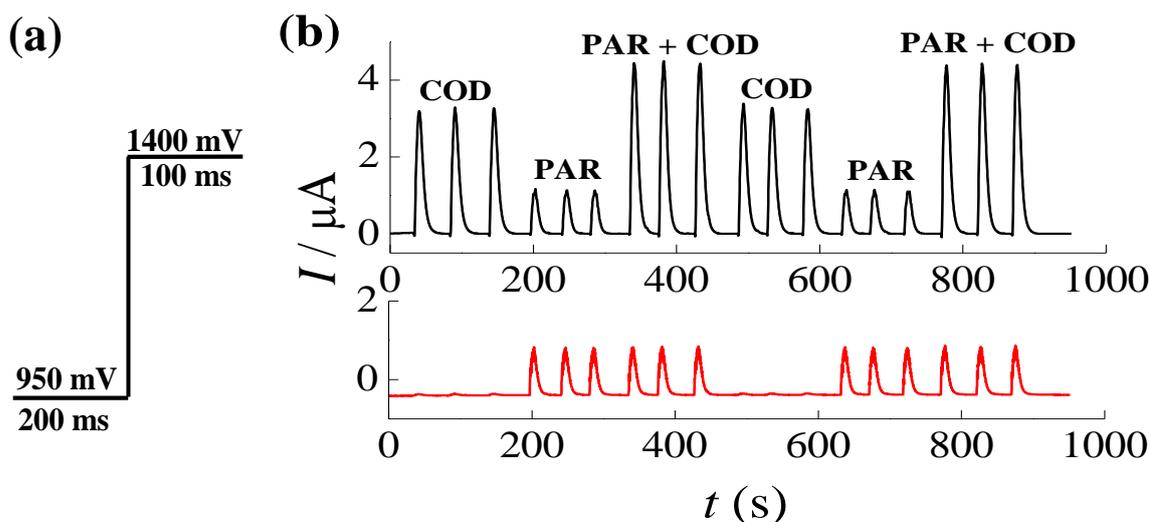


FIGURA 4.13 - (a) Sequência de aplicação dos pulsos de potencial em função do tempo. (b) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se FIA-MPA para soluções eletrolíticas contendo apenas PAR ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), apenas COD ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou PAR + COD (ambos a  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $350,0 \mu\text{L}$  e vazão:  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ .

Como mencionado anteriormente, os dois analgésicos são oxidados em 1400 mV. Desta forma, para se obter o valor da corrente de oxidação apenas da COD é necessário realizar uma subtração do sinal analítico referente ao PAR. Porém, o sinal de corrente do PAR em 1400 mV é maior do que o sinal analítico obtido em 950 mV, sendo então necessário determinar o FC, para a determinação do sinal analítico para o PAR no potencial de 1400 mV. Assim, construiu-se uma curva analítica aplicando-se os dois pulsos de potencial (950 e 1400 mV) com apenas o PAR, nos quais foram observados que houve um pequeno aumento no sinal de corrente no potencial de 1400 mV em comparação com aquele obtido no potencial de 950 mV. O valor do FC foi assim calculado por comparação entre os dois picos de corrente obtidos em 950 e 1400 mV (Eq. 3). O FC foi necessário para se obter o valor exato da oxidação do PAR no potencial de 1400 mV através do sinal de oxidação obtido a 950 mV (sem a interferência da COD). Como pode ser observado na TABELA 4.9 o valor do FC foi praticamente constante ( $1,04 \pm 0,02$ ), para soluções contendo diferentes concentrações de PAR inseridas no sistema de FIA-MPA. Para obter a concentração real da COD nas determinações simultâneas, o valor do sinal de corrente de oxidação do PAR em 950 mV ( $I_{PAR(950\text{ mV})} \times FC$ ) foi subtraído do valor total da oxidação no potencial de 1400 mV ( $I_{total(ACP + COD)}$ ), obtendo-se, assim, apenas o valor do sinal de corrente de oxidação da COD ( $I_{COD}$ ), (Eq. 4). Portanto, com este FC foi possível quantificar ambos os analitos simultaneamente, sem a interferência de um analito no outro.

$$FC = \frac{I_{PAR(1400\text{ mV})}}{I_{PAR(950\text{ mV})}} \quad \text{Eq. 3}$$

$$I_{COD} = I_{total(1400\text{ mV})} - (FC \times I_{PAR(950\text{ mV})}) \quad \text{Eq. 4}$$

TABELA 4.9 - Cálculo do FC em função de cada concentração do PAR e a média entre os valores

Concentração de PAR ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Fator de Correção (FC) <sup>a</sup>	Média do Fator de Correção
0,08	1,06	
0,50	1,05	
3,00	1,01	
9,00	1,03	
20,00	1,05	1,04 $\pm$ 0,02
40,00	1,02	
60,00	1,06	
80,00	1,03	
100,00	1,04	

<sup>a</sup> $n = 3$ .

Após a otimização de todos os parâmetros empregando a técnica FIA-MPA, obteve-se as respectivas curvas analíticas. Na FIGURA 4.14 (a), são mostrados os amperogramas de pulso obtidos injetando-se soluções padrão contendo PAR e COD em diferentes níveis de concentração (A – I), bem como de amostras farmacêuticas (J – M). As soluções-padrão foram adicionadas em concentrações crescentes de 0,08 – 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR e 0,05 – 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de COD, e após a injeção das amostras, as soluções padrão foram inseridas no sistema FIA em concentrações decrescentes de 100,0 – 0,08  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR e 10,0 – 0,05  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de COD, respectivamente, objetivando-se verificar a repetibilidade dos sinais transientes, a estabilidade da linha base, e/ou efeito de memória do sistema FIA-MPA. As curvas analíticas obtidas para a determinação simultânea de PAR e COD estão apresentadas nas FIGURAS 4.14 (b) e (c).

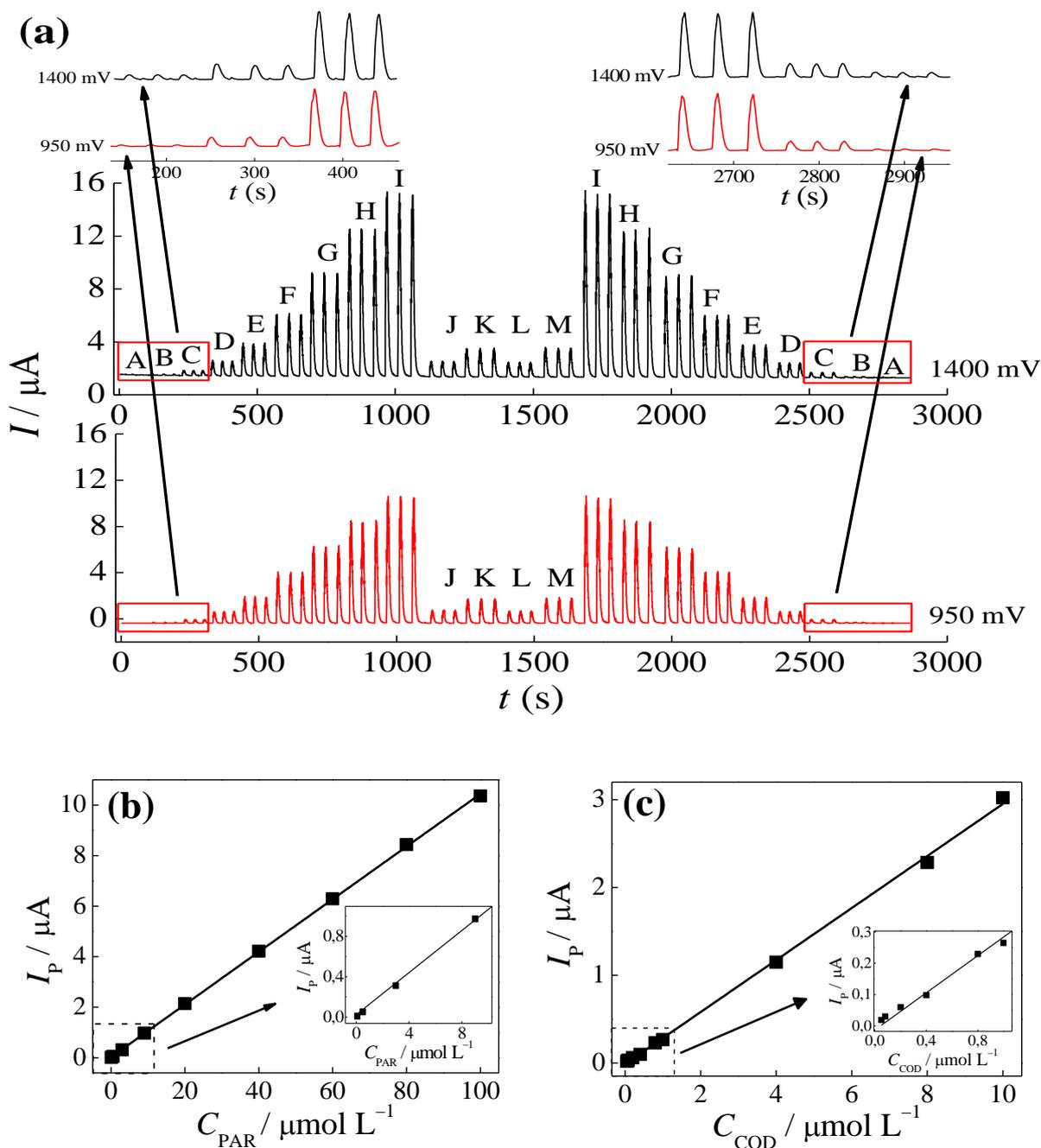


FIGURA 4.14 - (a) Amperogramas obtidos utilizando FIA-MPA após sucessivas injeções de soluções eletrolíticas contendo PAR (A – I: 0,08; 0,50; 3,0; 9,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e COD (A – I: 0,05; 0,08; 0,20; 0,40; 0,80; 1,0; 4,0; 8,0 e 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e soluções de quatro amostras farmacêuticas adequadamente preparadas (J – M). Curvas analíticas obtidas para o (b) PAR e para a (c) COD. Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ ; volume de injeção: 350,0  $\mu\text{L}$  e vazão: 3,8  $\text{mL min}^{-1}$ .

Como pode ser observado, a corrente de oxidação dos analgésicos aumentou linearmente de 0,08 – 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o PAR e de 0,05 – 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para a COD, seguindo as equações de regressão linear:

$$\text{PAR: } \Delta I_p (\mu\text{A}) = 0,024 + 1,042 \times 10^5 C_{\text{PAR}} (\text{mol L}^{-1}); (r = 0,999)$$

$$\text{COD: } \Delta I_p (\mu\text{A}) = -0,013 + 2,964 \times 10^5 C_{\text{COD}} (\text{mol L}^{-1}); (r = 0,999)$$

Os LDs encontrados foram de 0,030  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o PAR e de 0,035  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para a COD. O LD para o PAR foi calculado utilizando-se três vezes o sinal/ruído no potencial de 950 mV ( $3s/ N_{950\text{mV}}$ ) e para a COD foi calculado da mesma forma, mas levando em conta a soma do ruído a 950 mV e 1400 mV ( $3s / (N_{950\text{mV}} + N_{1400\text{mV}})$ ).

Uma comparação do desempenho do procedimento analítico proposto utilizando FIA–MPA e um BDDE–PTC com outros métodos descritos na literatura para a determinação simultânea de PAR e COD é apresentada na TABELA 4.5<sup>47,48,54</sup>. O procedimento proposto foi melhor em termos de sensibilidade e LD em comparação com a maioria dos métodos reportados, com exceção do método desenvolvido por Afkhami *et al.*<sup>49</sup>. No entanto, estes autores utilizaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanocompósito de óxido-grafeno e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , enquanto que o método aqui proposto não envolve o uso de um eletrodo modificado. O procedimento aqui apresentado demonstrou excelente desempenho analítico para a determinação simultânea destes analgésicos em termos de faixa linear, baixos LDs, elevada sensibilidade, e alta frequência analítica (aproximadamente 90 determinações  $\text{h}^{-1}$ ).

TABELA 4.10 - Comparação entre os métodos eletroanalíticos propostos para a detecção simultânea dos analgésicos PAR e COD

Eletrodo	Método	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Ref.
		PAR	COD	PAR	COD	
		Al/Pd	DPV	100 – 3000	100 – 3000	
Si/Pd	DPV	1,0 – 700	1,0 – 700	0,4	0,3	[54]
MWCNT/GCE	DPV	5 – 400	5 – 240	0,19	0,20	[48]
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - Grph/ CPE	SWV	0,03 – 12	0,03 – 12	0,025	0,011	[49]
BDDE-PTC	MPA	0,08 – 100	0,05 – 10	0,030	0,035	Este trab.

Al/Pd - camada fina de Pd eletrodepositada em Al; Si/Pd - nanoestrutura porosa de silício/paládio; MWCNT/GCE - carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas; CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-grph/CPE - pasta de carbono modificado com nanocompósito de óxido-grafeno e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

#### 4.4.3 - Estudo de repetibilidade e de possíveis interferentes

Para investigar a repetibilidade do procedimento utilizando FIA-MPA, foram realizadas análises intra-dia e inter-dias. Para as medidas de repetibilidade intra-dia, realizou-se dez sucessivas medições empregando-se três soluções de diferentes concentrações de PAR e COD (9,0; 40,0 e 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o PAR e de 0,40; 1,0 e 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para a COD), como pode ser observado na FIGURA 4.14. Os valores de sinal de corrente obtidos apresentaram RSDs de 0,90%; 1,21% e 1,16% para o PAR e de 1,46%; 0,76% e 1,80% para a COD, respectivamente. Além disso, a repetibilidade inter-dias do procedimento foi estudada realizando-se medidas em três dias diferentes ( $n = 3$ ), utilizando as mesmas três concentrações supramencionadas, obtendo-se os seguintes valores de RSD: 2,57%; 3,03% e 2,93% para o PAR e 4,11%; 3,28% e 3,97% para a

COD. Estes resultados obtidos indicam que o procedimento analítico proposto usando um BDDE–PTC acoplado ao sistema FIA–MPA apresentou boa precisão (boa repetibilidade) nas condições experimentais investigadas.

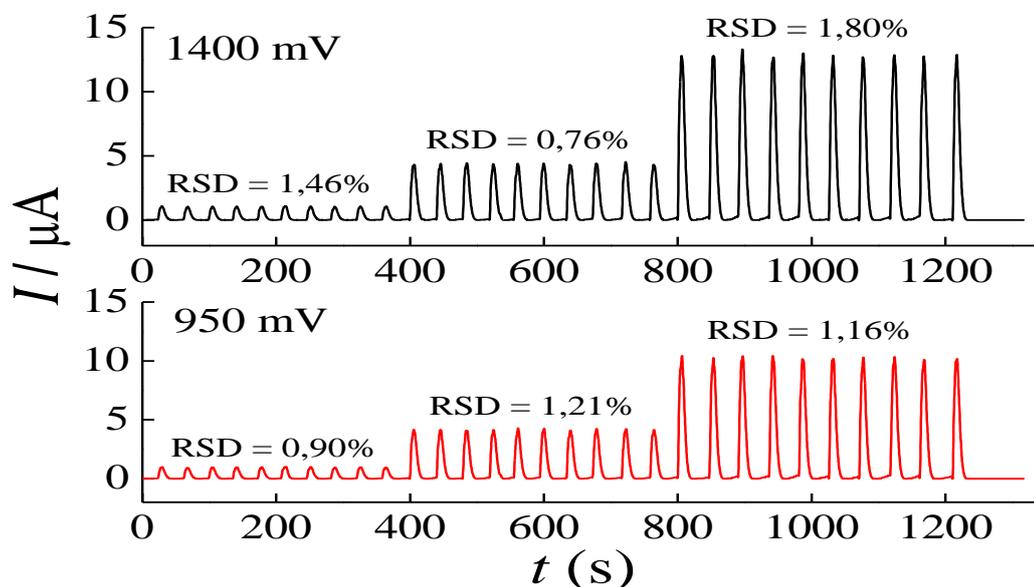


FIGURA 4.15 - Amperogramas obtidos usando FIA–MPA para sucessivas injeções da solução do eletrólito suporte contendo PAR (9,0; 40,0 ou 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e COD (0,4; 1,0 ou 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ ; volume de injeção: 350,0  $\mu\text{L}$  e vazão: 3,8  $\text{mL min}^{-1}$ .

Posteriormente, tendo em vista a determinação de amostras farmacêuticas, investigou-se a possível interferência de alguns dos excipientes tipicamente encontrados em formulações farmacêuticas contendo PAR e COD. Neste estudo, os seguintes excipientes foram considerados: estearato de magnésio, celulose, docusato de sódio, dióxido de silício, amido, bissulfito de sódio, ácido benzóico e benzoato de sódio. Assim, para avaliar o efeito destes concomitantes sobre a resposta amperométrica, as medições foram realizadas em uma solução contendo 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR e COD, respectivamente, na ausência e na presença destes concomitantes, na razão de concentração de 1:10 (analito: excipiente). Os RSDs obtidos para as correntes de pico registradas na presença de cada um dos excipientes foram calculados e obteve um valor menor que 6,0%

para todos os concomitantes estudados. Levando-se em consideração os valores de RSD obtidos, foi possível concluir que o método proposto apresentou seletividade para a determinação simultânea PAR e COD, viabilizando desta forma a determinação destes analgésicos em produtos farmacêuticos.

#### **4.4.4 - Determinação simultânea de PAR e COD em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos**

O procedimento desenvolvido empregando FIA-MPA foi utilizado para a determinação simultânea de PAR e COD em amostras farmacêuticas comerciais. Estas amostras também foram analisadas por HPLC para comparação dos resultados e poder avaliar a exatidão do método voltamétrico proposto. Os resultados obtidos empregando-se ambos os métodos estão apresentados na TABELA 4.11. Como pode ser observado, os erros relativos encontrados são menores do que 10 %, indicando assim uma boa exatidão do método proposto, uma vez que erros relativos de até 20 % são tolerados pela ANVISA<sup>110</sup>. Os resultados foram também comparados estatisticamente, aplicando-se o teste *t*-pareado, a um nível de confiança de 95%. Os valores experimentais calculados para o PAR (3,07) e COD (0,69) foram menores do que o valor crítico (3,18), permitindo assim concluir que os resultados obtidos empregando-se os dois métodos analíticos não apresentam diferenças significativas a um nível de confiança de 95%. Com isso, estes valores confirmaram a precisão adequada do procedimento FIA-MPA e sua eficácia na quantificação do PAR e da COD em amostras farmacêuticas comerciais.

TABELA 4.11 - Comparação dos resultados obtidos utilizando-se FIA-MPA e HPLC para determinação simultânea de PAR e COD em formulações farmacêuticas comerciais.

Amostra	PAR (mg)			COD (mg)		
	HPLC	FIA-MPA	Erro (%) <sup>a</sup>	HPLC	FIA-MPA	Erro (%) <sup>a</sup>
<b>J</b>	576 ± 12	527 ± 7	-8,5	29,0 ± 0,4	27,8 ± 0,2	-4,1
<b>K</b>	525 ± 1	522 ± 6	-0,6	6,1 ± 0,1	6,7 ± 0,7	9,8
<b>L</b>	553 ± 8	507 ± 2	-8,3	26,6 ± 0,7	28,1 ± 0,5	5,6
<b>M</b>	541 ± 4	510 ± 3	-5,7	5,7 ± 0,1	5,9 ± 0,7	3,5

<sup>a</sup> Erro (%) = [(valor FIA-MPA – valor HPLC) / valor HPLC] × 100.

Por fim, duas amostras biológicas sintéticas, urina e soro humano, foram analisadas empregando-se o procedimento amperométrico proposto. As amostras foram analisadas utilizando-se ambos os analitos em duas concentrações diferentes de PAR (2,0 e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e COD (0,60 e 5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Na TABELA 4.12 são apresentados os valores encontrados para a análise destas amostras. Como podem ser observadas, as recuperações para ambos os analitos variam de 92,0% a 108%, podendo assim ser concluído que as matrizes biológicas sintéticas não interferem significativamente no método desenvolvido, mostrando desta forma a potencialidade e importância do método desenvolvido para a determinação simultânea de PAR e COD em amostras biológicas reais.

TABELA 4.12 - Determinação simultânea de PAR e COD em amostras de fluidos biológicos

Amostra	PAR			COD		
	Adic. ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Determ. <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Rec. (%)	Adic. ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Determ. <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Rec. (%)
Urina	2,00	1,84 $\pm$ 0,04	92,0	0,60	0,64 $\pm$ 0,04	107
Urina	50,0	49,1 $\pm$ 0,6	98,2	5,0	5,1 $\pm$ 0,3	102
S.H.	2,00	1,85 $\pm$ 0,04	92,5	0,60	0,65 $\pm$ 0,02	108
S.H.	50,0	49,7 $\pm$ 0,3	99,4	5,0	4,9 $\pm$ 0,4	98,0

<sup>a</sup>  $n = 3$ . Adic. = Adicionado; Determ. = Determinado; Rec. = Recuperado; S.H. = Soro humano.

#### 4.5 - Determinação simultânea de PAR e TRA empregando-se FIA-MPA e um BDDE-PTC

O terceiro procedimento analítico desenvolvido envolveu a determinação simultânea de dois analgésicos (PAR e TRA) utilizando-se FIA-MPA e um BDDE-PTC.

##### 4.5.1 - Comportamento eletroquímico dos analitos PAR e TRA

Inicialmente, o comportamento eletroquímico dos analitos PAR e TRA foram investigados por voltametria cíclica. Na FIGURA 4.16 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de PAR e TRA 0,2 mmol L<sup>-1</sup> preparada em tampão Britton-Robinson 0,04 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) utilizando um BDDE-PTC. Como pode ser verificado, houve a ocorrência de um processo de oxidação bem definido para ambos os compostos PAR e TRA em 800 e 1600 mV, respectivamente. Após a inversão da direção de varredura de potenciais, os analgésicos não apresentaram picos de redução, indicando assim, um processo irreversível na faixa de potenciais estudada.

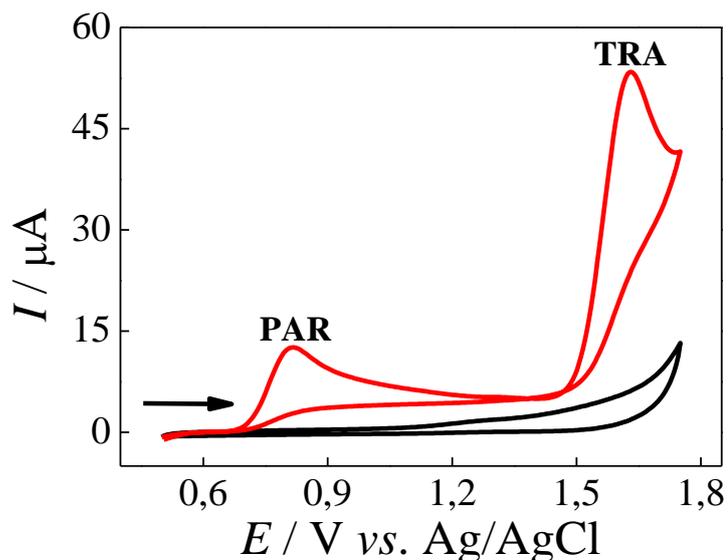


FIGURA 4.16 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o BDDE-PTC, na ausência (—) e na presença (-) de 0,20 mmol L<sup>-1</sup> de PAR e TRA. Eletrólito suporte: tampão Britton-Robinson 0,04 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0),  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.5.2 - Estudo do efeito dos PTA e PTC sobre o BDDE para a determinação simultânea de PAR e TRA

O efeito do pré-tratamento eletroquímico no BDDE foi investigado para a determinação simultânea de PAR e TRA usando-se voltametria cíclica. Como mencionado, a detecção pode ser fortemente influenciada pelo pré-tratamento realizado sobre a superfície do BDDE. Na FIGURA 4.17 estão ilustrados os voltamogramas cíclicos obtidos no presente estudo para ambos os analitos, utilizando o BDDE pré-tratado catodicamente ou anodicamente. Como pode ser observado, ao utilizar o BDDE-PTC houve um aumento nas correntes de oxidação de ambos os analgésicos e também um deslocamento do potencial de oxidação do PAR para um valor menos positivo, melhorando assim a separação dos potenciais de pico dos compostos em cerca de 800 mV, aumentando, portanto, a resolução do método.

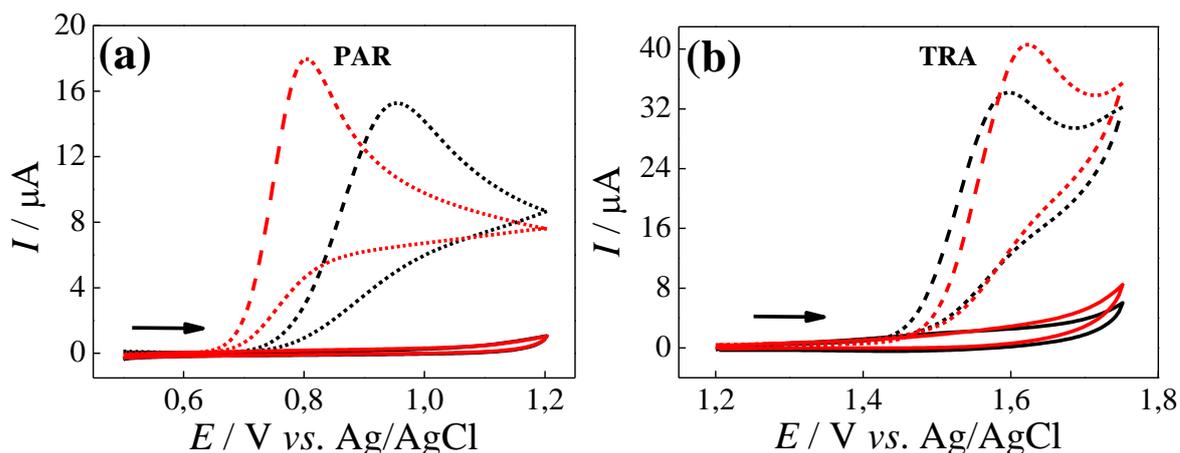


FIGURA 4.17 - Voltamogramas cíclicos obtidos sem (linha sólida) e com (linha pontilhada) a adição de  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de (a) PAR e (b) TRA utilizando um BDDE após (-) PTC ou (-) PTA. Eletrólito suporte: tampão Britton–Robinson  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2.0),  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Além disso, o efeito do pré-tratamento do BDDE também foi avaliado utilizando SWV (FIGURA 4.18). De um modo semelhante, o BDDE–PTC forneceu a maior intensidade de sinal de corrente de oxidação para ambos os compostos, e um deslocamento do potencial de oxidação do PAR para um valor menos positivo, resultando desta forma em uma melhor separação entre os potenciais de pico dos analgésicos. Sendo assim, todos os estudos posteriores foram realizados empregando-se o BDDE–PTC.

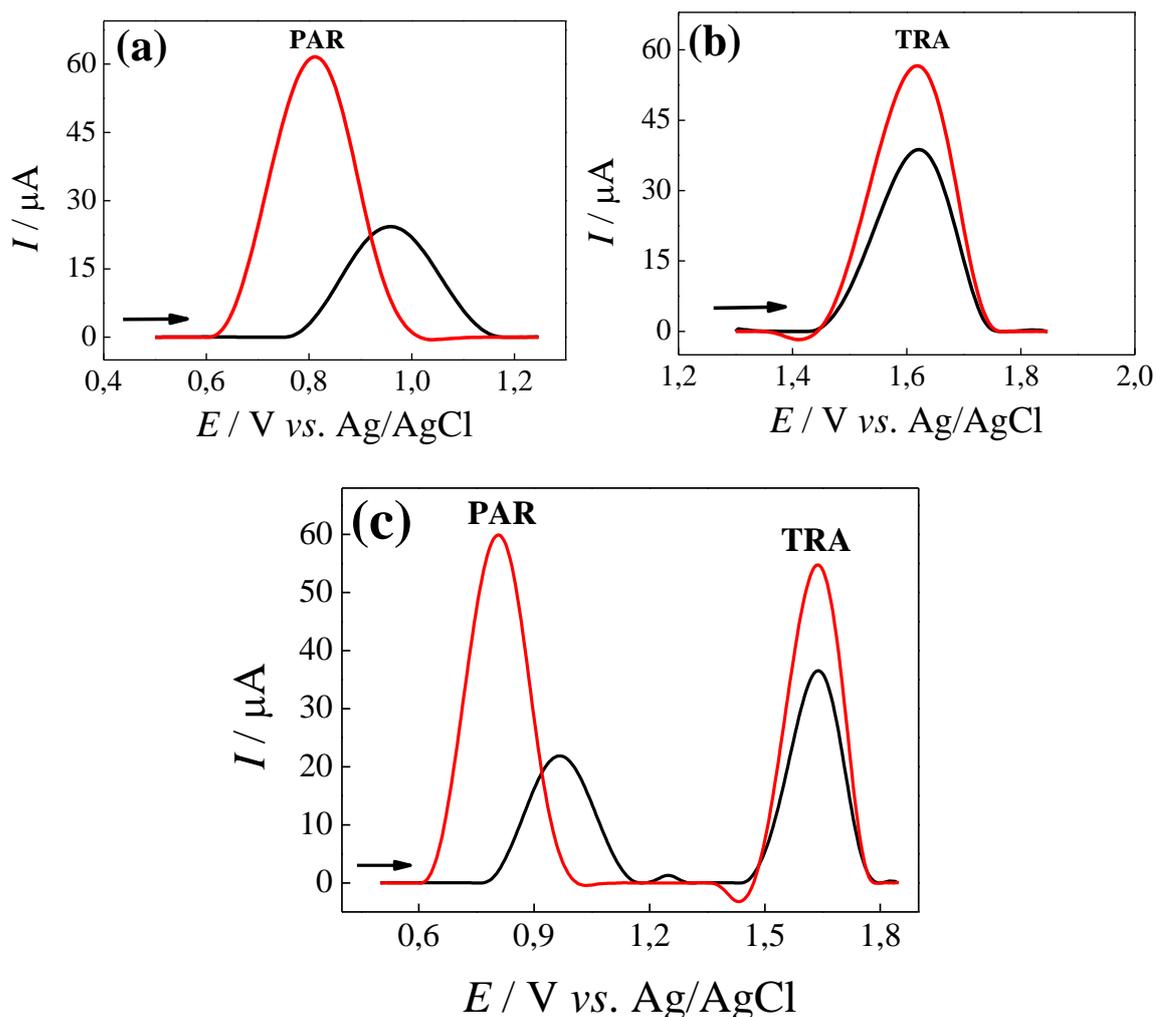


FIGURA 4.18 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o BDDE com diferentes pré-tratamentos em solução de (a) PAR  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (b) COD  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (c) PAR e COD  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  após PTA (—) e PTC (—). Eletrólito suporte: tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH4,0); ( $f = 70 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ ).

### 4.5.3 - Otimização dos parâmetros do sistema FIA–MPA

Primeiramente, avaliou-se o efeito da solução transportadora sobre as medições realizadas empregando-se FIA–MPA. Neste estudo, foram utilizadas solução eletrolítica contendo  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR e TRA em soluções de tampão Britton-Robinson  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (de pH 2,0 a 10,0) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , nos quais, o melhor sinal analítico (maior intensidade de corrente) foi obtido

usando  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Posteriormente, o efeito da concentração do  $\text{H}_2\text{SO}_4$  foi investigado ( $0,01$  a  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ ), e o melhor sinal analítico foi obtido utilizando-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  como solução transportadora. Sendo assim, está selecionada para o restante das análises.

Em seguida, foram avaliados os melhores potenciais a serem aplicados para a determinação simultânea de PAR e TRA utilizando-se o sistema FIA-MPA. Neste procedimento, foram empregados dez pulsos de potencial sequenciais ( $600 \text{ mV}$  a  $1900 \text{ mV}$ ), aplicados sobre o BDDE-PTC com injeções sucessivas da solução padrão contendo  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR ou  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRA (FIGURA 4.19 (a)). O sinal de corrente (sinal analítico) para cada pulso de potencial aplicado foi medido e utilizado para construir os voltamogramas hidrodinâmicos para o PAR e para o TRA (FIGURA 4.19 (b)). Como mostrado nos voltamogramas hidrodinâmicos, o PAR começou a ser oxidado próximo de  $750 \text{ mV}$  e a corrente de oxidação máxima foi obtida em  $850 \text{ mV}$ . Já para o TRA, o processo de oxidação se iniciou em aproximadamente  $1450 \text{ mV}$ , e não foi possível obter um patamar de corrente máxima, porém, ocorreu um aumento significativo da corrente de pico até  $1600 \text{ mV}$ . Sendo assim, o pulso de potencial de  $1600 \text{ mV}$  foi escolhido de modo a minimizar possíveis interferências em potenciais mais elevados. Com base nestes voltamogramas hidrodinâmicos, verifica-se que no pulso de potencial de  $850 \text{ mV}$  (corrente máxima do PAR) apenas o PAR sofreu oxidação, portanto, sem a interferência do TRA, e já no pulso de potencial de  $1600 \text{ mV}$  ambos os compostos (PAR e TRA) foram oxidados.

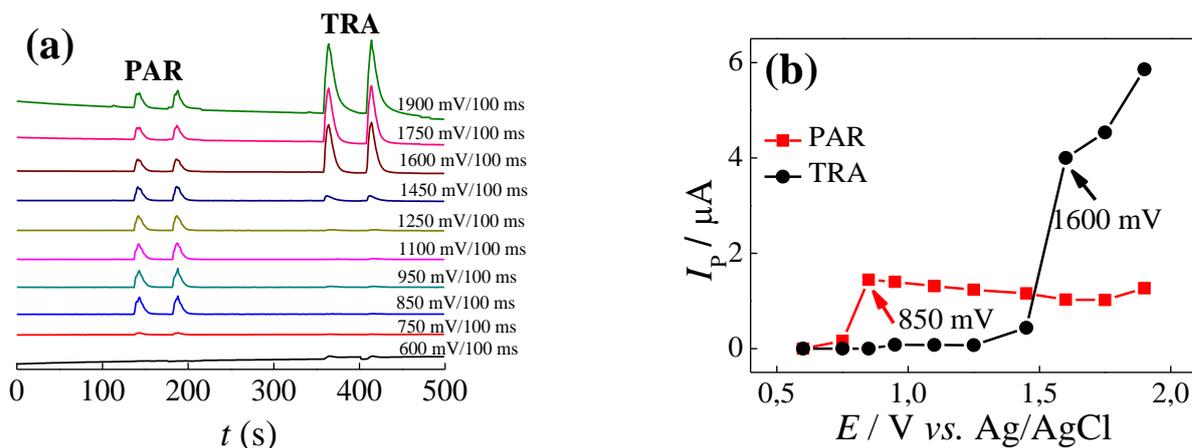


FIGURA 4.19 - (a) Amperogramas obtidos no sistema FIA–MPA após injeções de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR ou COD. (b) Voltamogramas hidrodinâmicos correspondentes ao PAR e ao TRA obtidos pelos valores da corrente de pico em função dos correspondentes pulsos de potencial aplicados. Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $250,0 \mu\text{L}$  e vazão:  $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### 4.5.3.1 - Estudo do efeito do tempo de aplicação dos pulsos de potencial

O estudo do efeito do tempo de aplicação dos pulsos de potencial foi realizado utilizando-se soluções contendo  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR e  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRA em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  como solução transportadora. Desta maneira, dois pulsos de potencial foram aplicados, nos quais, variou-se o tempo de aplicação entre 100 e 250 ms para o PAR (850 mV) e para o TRA (1600 mV) no BDDE–PTC. Na FIGURA 4.20 são mostrados os gráficos da magnitude de corrente de pico em função do tempo de aplicação dos pulsos de potencial. Como pode ser observado na FIGURA 4.20 (a), a magnitude do sinal analítico do PAR em 850 mV aumentou significativamente com o aumento do tempo de aplicação dos pulsos de potencial até 200 ms e, em tempos superiores, ocorreu uma diminuição do sinal analítico. Na sequência, como pode ser notado na FIGURA 4.20 (b), a magnitude do sinal analítico para o TRA (1600 mV) diminuiu esporadicamente para valores do tempo de aplicação dos pulsos de

potencial superiores a 100 ms. Desta forma, selecionou-se 200 ms para o PAR e 100 ms para o TRA, por apresentarem maior magnitudes de sinal analítico (corrente de pico).

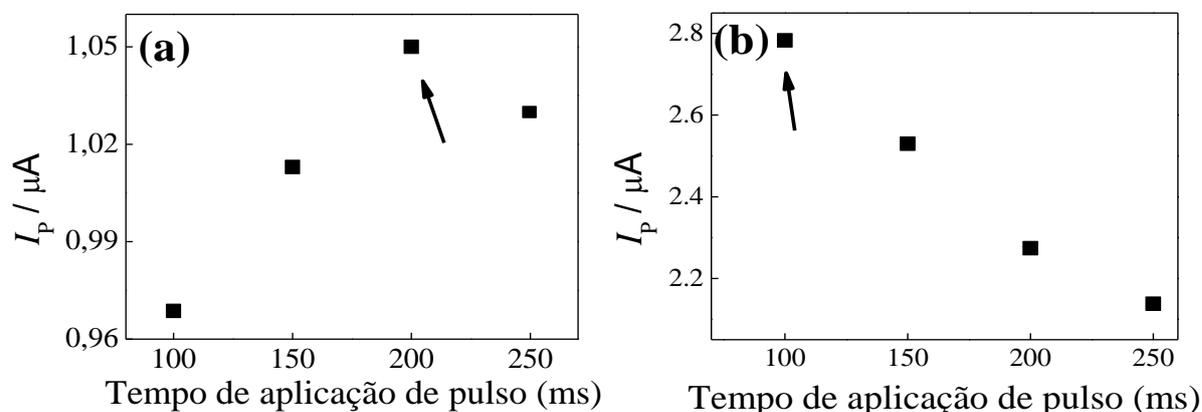


FIGURA 4.20 - Magnitude dos sinais de corrente de pico em função do tempo de aplicação de pulsos de potencial (100 a 250 ms), (a) PAR  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; pulso de potencial: 850 mV e (b) TRA  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial: 1600 mV. Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### 4.5.3.2 - Estudo da otimização dos parâmetros do sistema FIA

Por se tratar de um sistema em fluxo, um dos estudos realizados foi a influência da vazão da solução transportadora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) na faixa de vazão de  $1,1$  a  $5,5 \text{ mL min}^{-1}$ , sendo aplicados dois pulsos de potencial (850 e 1600 mV) no BDDE-PTC para uma solução contendo PAR e TRA ambos na concentração de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados deste estudo podem ser observados na FIGURA 4.21 (a). Para os dois analgésicos o comportamento foi praticamente o mesmo, ou seja, houve um aumento do sinal analítico ao aumentar a vazão da solução transportadora, porém em vazões superiores a  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ , observou-se que a corrente de pico se manteve praticamente constante. Assim, a vazão de  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$  foi selecionada como vazão ótima e utilizada nos experimentos subsequentes. Este comportamento já era esperado,

pois como não ocorre reação durante o percurso analítico, a influência da vazão no sinal analítico está relacionada com a dispersão da zona de amostra.

Na sequência, o efeito do volume da amostra inserida no sistema FIA foi investigado na faixa de 50 a 500  $\mu\text{L}$  utilizando uma solução de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR e TRA simultaneamente. Nota-se pela FIGURA 4.21 (b) que o sinal de corrente aumentou para volumes da amostra injetada até 350  $\mu\text{L}$  para os dois analitos, permanecendo o sinal analítico praticamente constante para volumes superiores. Assim, o volume de 350  $\mu\text{L}$  da amostra injetada foi selecionado para os estudos subsequentes por consumir menor volume de amostra sem perda significativa do sinal analítico.

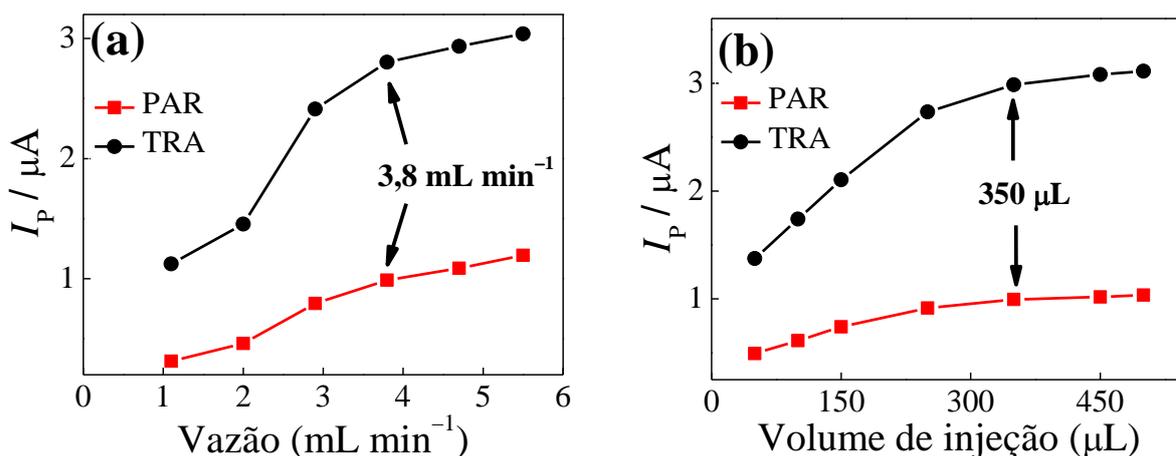


FIGURA 4.21 - Magnitude dos sinais da corrente de pico do PAR e do TRA a  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função da (a) vazão (intervalo: 1,1 – 5,5  $\text{mL min}^{-1}$ ) e do (b) volume da amostra injetada (intervalo: 50 – 500  $\mu\text{L}$ ). Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .

Na FIGURA 4.22 são mostrados os amperogramas obtidos com a aplicação de dois pulsos de potencial (850 mV (200 ms) e 1600 mV (100 ms)) para injeções em triplicata da solução transportadora contendo  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR,  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRA ou uma mistura de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR e  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRA. Como pode ser observado, a 850 mV apenas o PAR foi oxidado, no entanto, no potencial de 1600 mV ambos os analitos (PAR e TRA)

foram oxidados. Além disso, é possível notar que a corrente de oxidação para detecção do PAR a 850 mV foi idêntica na presença ou na ausência do TRA (sem interferência) e que a corrente de oxidação do PAR + TRA a 1600 mV é a soma do sinal analítico de ambos os analitos neste potencial, indicando assim, que não há qualquer interferência entre os analitos estudados.

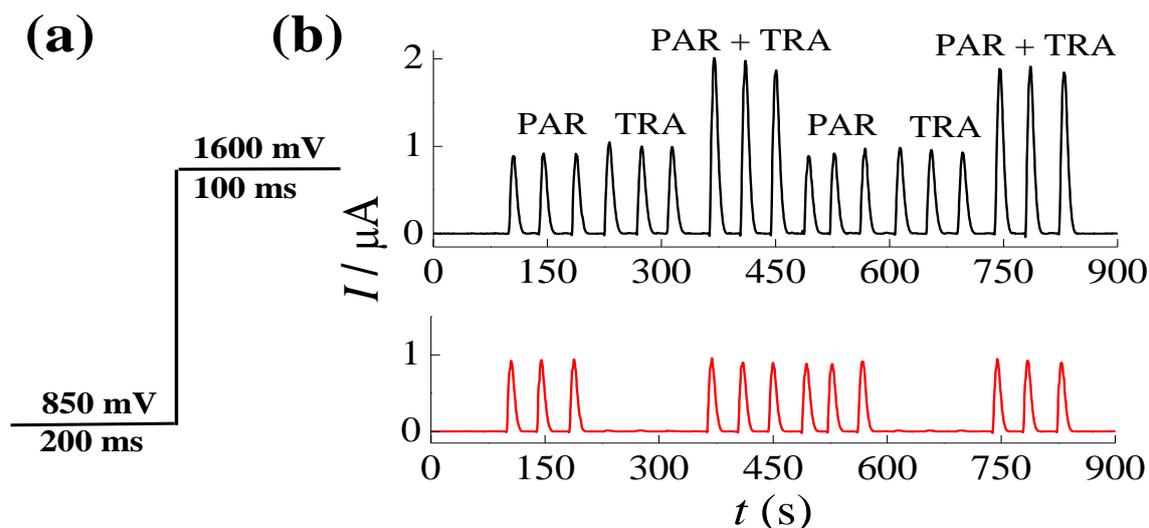


FIGURA 4.22 - (a) Sequência de aplicação dos pulsos de potencial em função do tempo. (b) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se FIA-MPA para soluções eletrolíticas contendo apenas PAR ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), apenas TRA ( $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou PAR ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) + TRA ( $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $350,0 \mu\text{L}$  e vazão:  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ .

No entanto, as correntes de oxidação do PAR não foram as mesmas para os dois pulsos de potencial (850 mV e 1600 mV) e, assim, foi necessário a utilização de um FC a fim de se obter o valor exato da corrente de oxidação do PAR no potencial de 1600 mV. O FC foi obtido aplicando-se os dois pulsos de potencial (em 850 mV e 1600 mV) por meio de sucessivas inserções de soluções contendo diferentes concentrações do PAR. O cálculo deste foi executado como descrito na Eq. 5, utilizando o sinal de corrente de pico do PAR obtido em 1600 mV dividido pelo sinal de corrente do pico obtido em 850 mV. Como pode ser

avaliado na TABELA 4.13, a faixa linear do PAR foi de 0,20 a 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , no entanto, devido à grande variação do FC obtido na região de 0,20 a 0,80  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , optou-se por não trabalhar nesta faixa, evitando assim possíveis erros decorrentes da grande variação do FC. Assim, o valor do FC foi praticamente constante na faixa de 1,0 a 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\text{FC} = 1,19 \pm 0,04$ ), sendo então este intervalo selecionado para o restante dos estudos.

Desta forma, a fim de se obter a corrente de oxidação real do TRA na determinação simultânea, necessitou-se subtrair do valor total do sinal de corrente de oxidação no potencial de 1600 mV (PAR + TRA), a corrente de oxidação do PAR no potencial de  $850 \text{ mV} \times \text{FC}$ , encontrando-se assim o valor exato da corrente de oxidação do TRA (Eq. 6). Com isso, foi possível quantificar ambos os analitos simultaneamente, sem interferência.

TABELA 4.13 - Valores do fator de correção em função de cada concentração do PAR

Concentração de PAR ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Fator de Correção (FC) <sup>a</sup>	Média do Fator de Correção
0,20	3,51	
0,40	2,60	—
0,80	1,95	
1,00	1,26	
2,00	1,19	
4,00	1,15	
8,00	1,25	
20,0	1,18	$1,19 \pm 0,04$
40,0	1,16	
80,0	1,18	
100,0	1,23	

<sup>a</sup>  $n = 3$ .

$$FC = \frac{I_{PAR(1600\text{ mV})}}{I_{PAR(850\text{ mV})}} \quad \text{Eq. 5}$$

$$I_{TRA} = I_{total(1600\text{ mV})} - (FC \times I_{PAR(850\text{ mV})}) \quad \text{Eq. 6}$$

Na sequência, após a otimização de todos os parâmetros, o procedimento proposto utilizando-se FIA-MPA para a determinação simultânea de PAR e TRA, construiu-se as respectivas curvas analíticas. Na FIGURA 4.23 (a) são apresentados os amperogramas para duas concentrações diferentes de PAR (A e B), utilizadas para o cálculo do FC, e oito adições de soluções padrão contendo PAR e TRA (C – J: 1,0 – 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e de 0,08 – 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o PAR e TRA, respectivamente), bem como das amostras biológicas (K – N). Na FIGURA 4.23 (b) e (c) estão representadas as curvas analíticas obtidas para a determinação simultânea de PAR e TRA. Como pode ser observado, a corrente de oxidação dos analgésicos aumentou linearmente de 1,0 – 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o PAR e de 0,08 – 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o TRA, seguindo as equações de regressão linear:

$$\Delta I_p (\mu\text{A}) = 0,086 + 7,656 \times 10^5 C_{PAR} (\text{mol L}^{-1}); (r = 0,999)$$

$$\Delta I_p (\mu\text{A}) = -0,019 + 2,991 \times 10^5 C_{TRA} (\text{mol L}^{-1}); (r = 0,999)$$

Os LDs obtidos foram de 0,03  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o PAR e de 0,04  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o TRA. O LD para o PAR foi calculado utilizando-se três vezes o sinal/ruído no potencial de 850 mV ( $3S / N_{850\text{mV}}$ ) e para o TRA foi determinado levando em conta a soma dos ruídos a 850 mV e 1600 mV ( $3S / (N_{850\text{mV}} + N_{1600\text{mV}})$ ).

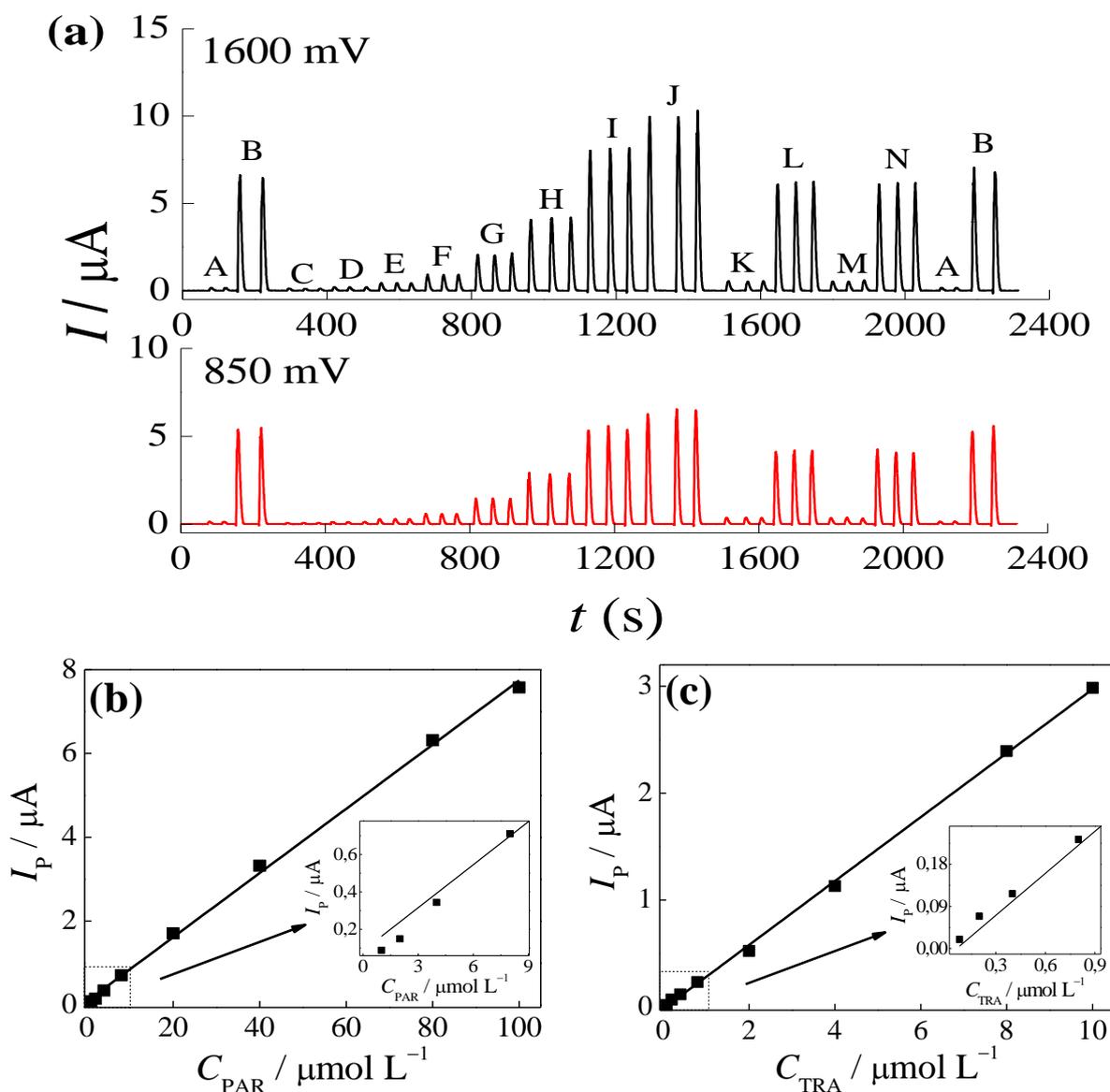


FIGURA 4.23 - (a) Amperogramas obtidos utilizando-se FIA-MPA após sucessivas injeções de soluções eletrolíticas contendo apenas o PAR (A – B: 2,0 e 80,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e de forma simultânea contendo PAR (C – J: 1,00; 2,00; 4,00; 8,00; 20,00; 40,00; 80,00 e 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e TRA (C – J: 0,08; 0,20; 0,40; 0,80; 2,00; 4,00; 8,00 e 10,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e soluções de quatro amostras de fluidos biológicos adequadamente preparadas (K – N). Curvas analíticas obtidas para o (b) PAR e para o (c) TRA. Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ ; volume de injeção: 350,0  $\mu\text{L}$  e vazão: 3,8  $\text{mL min}^{-1}$ .

Na TABELA 4.14 é apresentada uma comparação do desempenho analítico do procedimento proposto empregando-se FIA-MPA e o BDDE-PTC

com outros procedimentos descritos na literatura para a determinação simultânea de PAR e TRA.

TABELA 4.14 - Comparação entre vários métodos eletroanalíticos propostos para a detecção simultânea de PAR e TRA.

Eletrodo	Método	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Ref.
		PAR	TRA	PAR	TRA	
NP/GCE	DPV	0,1 – 100	10 – 1000	0,05	5	[51]
MWCNTs/GCE	DPV	0,5 – 210	2 – 300	0,085	0,361	[50]
D50wx2/GNP/GPE	SWV	0,03 – 46	0,03 – 46	0,004	0,01	[55]
NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -Grph/CPE	SWV	0,01 – 9	0,03 – 9	0,004	0,003	[52]
BDDE-PTC	MPA	1,0 – 100	0,08 – 10	0,030	0,040	Este trab.

NP/GCE – carbono vítreo modificado com nanopartículas de carbono; MWCNTs/GCE - carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas; D50wx2/GNP /CPE - pasta de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e D50wx2; NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Grph/CPE - pasta de carbono modificado com nanocompósitos de óxido-grafeno e NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

No procedimento proposto foi possível obter um LD menor do que os relatados por Babaei *et al.*<sup>50</sup> e Ghorbani-Bidkorbbeh *et al.*<sup>51</sup> e maior do que os apresentados por Afkhami *et al.*<sup>52</sup> e Sanghavi *et al.*<sup>55</sup>. No entanto, estes autores utilizaram eletrodo modificado com nanocompósito, enquanto o procedimento aqui proposto não envolveu o uso de eletrodo modificado, além disso foi possível obter um tempo curto de análise (aproximadamente 85 injeções h<sup>-1</sup>), ou seja, muito menores do que de técnicas como SWV e DPV, não necessitou de

tempo de agitação ou de pré-concentração do analito na superfície do eletrodo, além do baixo consumo de amostras e elevada repetibilidade.

#### 4.5.4 - Estudo de repetibilidade e de possíveis interferentes

A precisão do procedimento utilizando FIA–MPA proposto foi avaliada por meio de estudos de repetibilidade intra-dia e inter-dias. Sendo que, para os estudos de repetibilidade intra-dia foram realizadas 10 medidas amperométricas ( $n = 10$ ) em um mesmo dia para três soluções de PAR ( $2,0$ ,  $20,0$  e  $100,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) e TRA ( $0,2$ ,  $2,0$  e  $10,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) de forma simultânea utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $0,05$  mol L<sup>-1</sup> como solução transportadora, como pode ser observado na FIGURA 4.24. Deste modo, os valores de RSD obtidos para as correntes de pico anódica coletadas para as três medidas realizadas foram iguais a 1,28%, 1,03% e 2,62% para o PAR e de 1,20%, 0,87% e 1,40% para o TRA, respectivamente.

Para os estudos de repetibilidade inter-dias ( $n = 3$ ) comparou-se as correntes de pico registradas para as medidas amperométricas realizadas durante três dias empregando-se as mesmas três soluções do estudo de repetibilidade intra-dia. Desta forma, os valores de RSD encontrados neste estudo foram de 1,45%, 2,47% e 3,04% para o PAR e de 2,50%, 4,62% e 3,94% para o TRA, respectivamente. Os valores de RSD obtidos para os estudos de repetibilidade intra-dia e inter-dias demonstraram, mais uma vez, a boa estabilidade de resposta do BDDE–PTC acoplado ao sistema FIA–MPA.

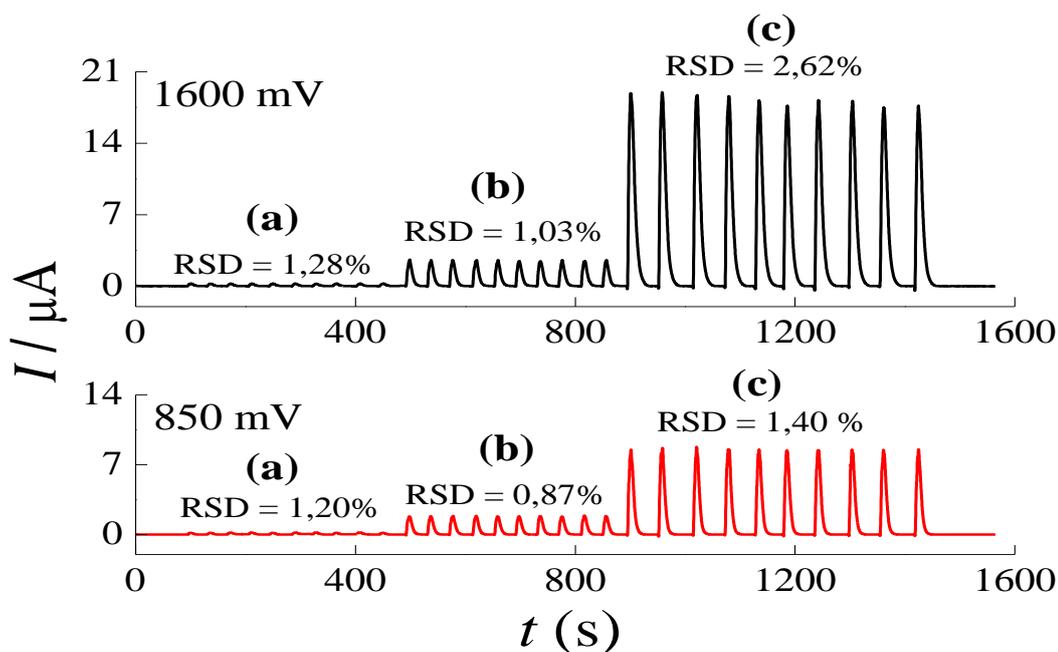


FIGURA 4.24 - Amperogramas obtidos usando-se FIA-MPA e um BDDE-PTC para sucessivas injeções da solução do eletrólito suporte contendo PAR (2,0; 20,0 ou 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e TRA (0,2; 2,0 ou 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Solução transportadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ ; volume de injeção: 350,0  $\mu\text{L}$  e vazão: 3,8  $\text{mL min}^{-1}$ .

A fim de avaliar a seletividade do procedimento para a determinação simultânea de PAR e TRA em formulações farmacêuticas, os possíveis efeitos de interferência de alguns dos excipientes normalmente encontrados nestas amostras foram estudados. Os estudos foram realizados para uma solução padrão de PAR e TRA na presença destes concomitantes em duas razões de concentrações distintas de 1:1 e 1:10 (solução padrão: excipiente) como pode ser observado na TABELA 4.15. Os sinais de corrente destas soluções foram comparados com os obtidos para a solução padrão na ausência de qualquer excipiente.

Como pode ser observado, apenas a povidona K30 na razão de concentração de 1:10 apresentou um RSD significativo ( $> 10\%$ ). No entanto, considerando que a concentração de povidona K30 em amostras farmacêuticas é muito menor do que aquelas aqui investigadas, a sua interferência não deverá ser

significativa durante a análise de amostras farmacêuticas<sup>111</sup>. Ao se realizar uma análise dos valores de RSD obtidos na razão de concentração de 1:1 (TABELA 4.15), pode-se concluir que o método proposto foi seletivo para a determinação de PAR e TRA em uma matriz contendo os excipientes investigados, uma vez, que os valores de RSD foram menores do que 5,0% em todos os casos.

TABELA 4.15 - Efeito de possíveis interferentes na determinação amperométrica de PAR e TRA em formulações farmacêuticas

Excipiente	PAR (%) <sup>a</sup>		TRA (%) <sup>a</sup>	
	1:1	1:10	1:1	1:10
Amido	-0,3	-1,3	-1,3	2,7
Celulose microcristalina	0,3	-1,5	-2,5	0,9
Estearato de magnésio	-0,8	-3,7	0,6	-0,5
Dióxido de silício coloidal	-1,0	-2,3	-2,2	-1,0
Croscarmelose sódica	-0,3	-0,3	-1,7	-0,3
Pigmento de óxido de ferro amarelo	-1,3	-1,9	-3,3	-3,6
Glicolato de amido sódico	-0,2	-3,1	-1,3	-2,0
Dióxido de titânio	-1,6	-6,2	-4,7	-9,4
Povidona K30	-1,1	-12,9	-2,8	-11,3

<sup>a</sup>  $n = 3$ .

#### 4.5.5 - Determinação simultânea de PAR e TRA em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos

O procedimento desenvolvido utilizando-se FIA-MPA e um BDDE-PTC foi empregado para a determinação simultânea de PAR e TRA em amostras farmacêuticas comerciais. As amostras também foram analisadas por HPLC como método comparativo, sendo os erros determinados comparando-se os conjuntos de teores destes fármacos obtidos empregando-se os dois métodos

analíticos menores que 5%. Os resultados de ambos os procedimentos, proposto e comparativo, são mostrados na TABELA 4.16. Além disso, ambos os métodos foram comparados estatisticamente aplicando-se o teste *t*-pareado para um nível de confiança de 95%. Os valores calculados para o  $t_{\text{exp}}$  de ambos os analgésicos PAR (0,68) e TRA (1,00) foram menores do que o valor obtido para o valor do  $t_{\text{crítico}}$  (12,71), e, por conseguinte, pode-se concluir que não houve diferenças estatísticas entre os resultados obtidos usando-se os dois procedimentos analíticos, indicando assim a exatidão do procedimento proposto utilizando-se FIA-MPA e a sua eficácia na quantificação de PAR e TRA em amostras farmacêuticas comerciais.

TABELA 4.16 - Resultados obtidos para a determinação simultânea de PAR e TRA em amostras farmacêuticas comerciais

Amostra	PAR (mg)			TRA (mg)		
	HPLC <sup>a</sup>	FIA-MPA <sup>a</sup>	Erro (%) <sup>b</sup>	HPLC <sup>a</sup>	FIA-MPA <sup>a</sup>	Erro (%) <sup>b</sup>
I	323 ± 6	339 ± 7	5	34 ± 1	35 ± 3	3
II	352 ± 5	349 ± 4	-1	37 ± 0	37 ± 2	0

<sup>a</sup>  $n = 3$ ; <sup>b</sup> Erro (%) = [(valor FIA-AMP - valor HPLC) / valor HPLC] × 100.

Finalmente, dois tipos de amostras biológicas sintéticas (urina e soro humano) fortificadas com duas concentrações conhecidas de PAR ( $5,0 \times 10^{-6}$  e  $6,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) e TRA ( $5,0 \times 10^{-7}$  e  $6,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) foram analisadas simultaneamente empregando-se o método amperométrico proposto. Na Tabela 4.17 estão apresentados os resultados obtidos para a quantificação simultânea de PAR e TRA em amostras sintéticas de urina e de soro humano em diferentes concentrações de PAR e TRA empregando-se a técnica de adição e recuperação. Desta forma, foi possível avaliar o efeito de matriz deste tipo de amostra, no qual, encontrou-se um valor médio de recuperação para ambos os analitos, na

faixa de 90,8% a 105% (PAR) e de 93,3% a 106% (TRA), mostrando a potencialidade do método amperométrico desenvolvido para a determinação simultânea de PAR e TRA em amostras biológicas.

TABELA 4.17 - Determinação simultânea de PAR e COD em amostras de fluidos biológicos

Amostra	PAR			TRA		
	Adic. ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Encont. <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Rec. (%)	Adic. ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Encont. <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Rec. (%)
Urina	5,00	4,54 $\pm$ 0,02	90,8	0,50	0,53 $\pm$ 0,01	106
Urina	60,0	62,8 $\pm$ 0,2	105	6,0	5,6 $\pm$ 0,1	93,3
S.H.	5,00	4,64 $\pm$ 0,03	92,8	0,50	0,48 $\pm$ 0,01	96,0
S.H.	60,0	62,4 $\pm$ 0,4	104	6,0	5,7 $\pm$ 0,1	95,0

<sup>a</sup>  $n = 3$ , Adic. = Adicionado; Determ. = Determinado; Rec. = Recuperado; S.H. = Soro humano.

## 5 - CONCLUSÕES

Analisando-se os resultados obtidos foi possível selecionar algumas considerações referentes ao BDDE e sua aplicação no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação simultânea de alguns analgésicos. O PTC realizado na superfície do BDDE proporcionou uma melhora na atividade eletroquímica dos analitos, possibilitando assim adquirir melhores condições analíticas do procedimento desenvolvido, como LD, sensibilidade e também diminuição do potencial de trabalho.

Com a determinação da área eletroativa do BDDE diante dos diferentes pré-tratamentos (catódico ou anódico) concluiu-se que as áreas eletroativas foram menores que a área geométrica, isso provavelmente porque estes eletrodos possuem uma superfície predominantemente semicondutora, ou seja, a área eletroativa varia conforme a quantidade de boro no BDDE. Foi possível concluir também que a melhora da atividade eletroquímica do BDDE para alguns analitos, não está relacionada apenas com a área eletroativa, mas também com os diferentes grupos funcionais presentes na superfície do BDDE após os diferentes pré-tratamentos eletroquímicos e as interações eletrostáticas destes grupos funcionais com o analito em estudo.

Utilizando a SWV e o BDDE-PTC para a determinação da COD ou simultaneamente de PAR e COD se mostraram altamente sensíveis com LDs relativamente baixos: 1,19 nmol L<sup>-1</sup> para a COD ou 18 e 14 nmol L<sup>-1</sup> para o PAR e COD, respectivamente. Esses valores encontrados neste trabalho estão entre os mais baixos obtidos empregando-se um método eletroquímico verificado até então na literatura. Além disso, o método foi aplicado com sucesso para a determinação simultânea em amostras de formulações farmacêuticas comerciais, com resultados semelhantes (a um nível de confiança de 98%) aos obtidos utilizando um método de referência (HPLC). Também, foram obtidos resultados precisos e exatos das concentrações de PAR e COD em

amostras de urina e soro humano. Conclui-se assim, que o procedimento proposto (SWV) foi uma excelente opção para a determinação exclusiva de COD ou PAR e COD simultaneamente.

A técnica de FIA-MPA combinado com um BDDE-PTC, levou ao desenvolvimento de um procedimento de alto desempenho analítico para a determinação simultânea de PAR e COD, com excelente detectabilidade, sensibilidade e seletividade. A otimização dos parâmetros experimentais resultou em LDs relativamente baixos: 0,030  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o PAR e de 0,035  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para a COD, respectivamente. Além disso, foi obtida uma frequência analítica de 90 determinações  $\text{h}^{-1}$ . A aplicabilidade do procedimento proposto foi avaliada na determinação simultânea de PAR e COD em amostras farmacêuticas e fluidos biológicos. Os resultados obtidos para as análises de formulações farmacêuticas foram semelhantes aos obtidos utilizando o método cromatográfico (a um nível de confiança de 95%). O procedimento desenvolvido é uma alternativa em potencial para a determinação simultânea de PAR e COD em amostras de diferentes matrizes.

O procedimento analítico desenvolvido empregando FIA-MPA juntamente com um BDDE-PTC para a determinação simultânea de PAR e TRA se mostrou bastante simples, rápido e eficiente, apresentando resultados concordantes com aqueles obtidos empregando-se o método cromatográfico (método comparativo) a um nível de confiança de 95%. Além disso, este procedimento apresentou alta frequência analítica (aproximadamente 85 determinações  $\text{h}^{-1}$ ). Ademais, o procedimento proposto apresentou excelentes LDs: 0,030  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o PAR e de 0,040  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o TRA, respectivamente.

Todos os procedimentos analíticos desenvolvidos neste trabalho de mestrado apresentaram condições analíticas bastantes satisfatórias para a detecção e quantificação simultânea dos analgésicos em amostras farmacêuticas e fluidos biológicos. Além do que, apresentaram vantagens de não haver a

necessidade de uma separação prévia e apenas uma simples diluição como preparação das amostras. Assim, todos estes procedimentos foram simples, rápidos, precisos e não necessitaram de reagentes de alta toxicidade e ainda foi empregada instrumentação de custo relativamente baixo.

## 6 - REFERÊNCIAS

1. HAAS, H. "History of anti-pyretic analgesic therapy". *Am. J. Med.*, **75** (5A): 1, 1983.
2. BROWNSTEIN, M.J. "A brief-history of opiates, opioid-peptides, and opioid receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90** (12): 5391, 1993.
3. BRUNTON, L.L., *Goodman e Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* 2007, McGraw-Hill: Rio de Janeiro. 1984 p.
4. MATTIA, C. & FERRARI, A. "Paracetamol-codeine, an always actual choice for the treatment of pain". *Minerva Med.*, **105** (6): 501, 2014.
5. RAFFA, R.B. "Pharmacology of oral combination analgesics: rational therapy for pain". *J. Clin. Pharm. Ther.*, **26** (4): 257, 2001.
6. BERGMAN, K.; MULLER, L. & TEIGEN, S.W. "Current issues in mutagenesis and carcinogenesis .65. The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: A regulatory". *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **349** (2): 263, 1996.
7. CLISSOLD, S.P. "Paracetamol and phenacetin". *Drugs*, **32**: 46, 1986.
8. BOYER, T.D. & ROUFF, S.L. "Acetaminophen-induced hepatic necrosis and renal failure". *JAMA-J. Am. Med. Assoc.*, **218** (3): 440, 1971.
9. MCJUNKIN, B.; BARWICK, K.W.; LITTLE, W.C. & WINFIELD, J.B. "Fatal massive hepatic necrosis following acetaminophen overdose". *JAMA-J. Am. Med. Assoc.*, **236** (16): 1874, 1976.
10. FILIK, H.; SENER, I.; CEKIC, S.D.; KILIC, E. & APAK, R. "Spectrophotometric determination of paracetamol in urine with tetrahydroxycalix 4 arene as a coupling reagent and preconcentration with triton X-114 using cloud point extraction". *Chem. Pharm. Bull.*, **54** (6): 891, 2006.
11. THORN, C.F.; KLEIN, T.E. & ALTMAN, R.B. "Codeine and morphine pathway". *Pharmacogenet. Genomics*, **19** (7): 556, 2009.
12. MCDONALD, J. & LAMBERT, D. "Opioid receptors". *CEACCP*, **5** (1): 22, 2005.
13. POPA, D.S.; OPREAN, R.; CUREA, E. & PREDA, N. "TLC-UV densitometric and GC-MSD methods for simultaneous quantification of morphine and codeine in poppy capsules". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18** (4-5): 645, 1998.
14. SRINIVASAN, V.; WIELBO, D.; SIMPKINS, J.; KARLIX, J.; SLOAN, K. & TEBBETT, I. "Analgesic and immunomodulatory effects of codeine and codeine 6-glucuronide". *Pharm. Res.*, **13** (2): 296, 1996.
15. BJUNE, K.; STUBHAUG, B.A.; DODGSON, M.S. & BREIVIK, H. "Additive analgesic effect of codeine and paracetamol can be detected in strong, but not moderate, pain after Caesarean section - Baseline pain-intensity is a determinant of assay-sensitivity in a postoperative analgesic trial". *Acta Anaesthesiol. Scand.*, **40** (4): 399, 1996.

16. IRWIN, R.S.; CURLEY, F.J. & BENNETT, F.M. "Appropriate use of antitussives and protussives - a practical review". *Drugs*, **46** (1): 80, 1993.
17. CONE, E.J.; WELCH, P.; PAUL, B.D. & MITCHELL, J.M. "Forensic drug-testing for opiates .3. urinary-excretion rates of morphine and codeine following codeine administration". *J. Anal. Toxicol.*, **15** (4): 161, 1991.
18. FISCHER, W.; BERNHAGEN, J.; NEUBERT, R.H.H. & BRANDSCH, M. "Uptake of codeine into intestinal epithelial (Caco-2) and brain endothelial (RBE4) cells". *Eur. J. Pharm. Sci.*, **41** (1): 31, 2010.
19. WASELS, R. & BELLEVILLE, F. "Gas-chromatographic mass-spectrometric procedures used for the identification and determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine". *J. Chromatogr. A*, **674** (1-2): 225, 1994.
20. SPROULE, B.A.; BUSTO, U.E.; SOMER, G.; ROMACH, M.K. & SELLERS, E.M. "Characteristics of dependent and nondependent regular users of codeine". *J. Clin. Psychopharmacol.*, **19** (4): 367, 1999.
21. SEYMOUR, A.; BLACK, M.; JAY, J. & OLIVER, J.S. "The role of dihydrocodeine in causing death among drug users in the west of Scotland". *Scott. Med. J.*, **46** (5): 143, 2001.
22. BACKMUND, M.; MEYER, K.; EICHENLAUB, D. & SCHUTZ, C.G. "Predictors for completing an inpatient detoxification program among intravenous heroin users, methadone substituted and codeine substituted patients". *Drug Alcohol Depend.*, **64** (2): 173, 2001.
23. HAU, V.S.; HUBER, J.D.; CAMPOS, C.R.; DAVIS, R.T. & DAVIS, T.P. "Effect of lambda-carrageenan-induced inflammatory pain on brain uptake of codeine and antinociception". *Brain Res.*, **1018** (2): 257, 2004.
24. KLINDER, K.; SKOPP, G.; MATTERN, R. & ADERJAN, R. "The detection of dihydrocodeine and its main metabolites in cases of fatal overdose". *Int. J. Legal Med.*, **112** (3): 155, 1999.
25. KUCUK, A.; KADIOGLU, Y. & CELEBI, F. "Investigation of the pharmacokinetics and determination of tramadol in rabbit plasma by a high-performance liquid chromatograph-diode array detector method using liquid-liquid extraction". *J. Chromatogr. B*, **816** (1-2): 203, 2005.
26. ROUINI, M.R.; GHAZI-KHANSARI, M.; ARDAKANI, Y.H.; DASIAN, Z. & LAVASANI, H. "A disposition kinetic study of tramadol in rat perfused liver". *Biopharm. Drug Dispos.*, **29** (4): 231, 2008.
27. MALANA, M.A. & ZOHRA, R. "The release behavior and kinetic evaluation of tramadol HCl from chemically cross linked Ter polymeric hydrogels". *Daru*, **21** 2013.
28. LEE, C.R.; MCTAVISH, D. & SORKIN, E.M. "Tramadol - a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states". *Drugs*, **46** (2): 313, 1993.
29. JAVANBAKHT, M.; ATTARAN, A.M.; NAMJUMANESH, M.H.; ESFANDYARI-MANESH, M. & AKBARI-ADERGANI, B. "Solid-phase extraction of tramadol from plasma and urine samples using a novel water-

- compatible molecularly imprinted polymer". *J. Chromatogr. B*, **878** (20): 1700, 2010.
30. LINTZ, W.; BARTH, H.; BECKER, R.; FRANKUS, E. & SCHMIDT-BOTHELT, E. "Pharmacokinetics of tramadol and bioavailability of enteral tramadol formulations - 2nd communication: Drops with ethanol". *Arzneimittelforschung*, **48** (5): 436, 1998.
31. PATEL, B.N.; SHARMA, N.; SANYAL, M. & SHRIVASTAV, P.S. "An accurate, rapid and sensitive determination of tramadol and its active metabolite O-desmethyltramadol in human plasma by LC-MS/MS". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49** (2): 354, 2009.
32. GHOLAMI, M.; SABOORY, E.; MEHRABAN, S.; NIAKANI, A.; BANIHABIB, N.; AZAD, M.R. & FEREDONI, J. "Time Dependent Antinociceptive Effects of Morphine and Tramadol in the Hot Plate Test: Using Different Methods of Drug Administration in Female Rats". *Iran. J. Pharm. Res.*, **14** (1): 303, 2015.
33. SOUSA, A.M.; FRANCO, P.A.B.; ASHMAWI, H.A. & POSSO, I.D.P. "Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos". *Revista Brasileira de Anestesiologia*, **58** (4): 371, 2008.
34. MCCLELLAN, K. & SCOTT, L. "Tramadol/Paracetamol". *Drugs*, **63** (11): 1079, 2003.
35. BEAVER, W.T. "Combination analgesics". *Am. J. Med.*, **77** (3A): 38, 1984.
36. ZHANG, W.Y. & PO, A.L.W. "Analgesic efficacy of paracetamol and its combination with codeine and caffeine in surgical pain - A meta-analysis". *J. Clin. Pharm. Ther.*, **21** (4): 261, 1996.
37. STRAUBE, C.; DERRY, S.; JACKSON, K.C.; WIFFEN, P.J.; BELL, R.F.; STRASSELS, S. & STRAUBE, S. "Codeine, alone and with paracetamol (acetaminophen), for cancer pain". *Cochrane Database Syst Rev.*, (9) 2014.
38. HAKKINEN, M.; LAUNIAINEN, T.; VUORI, E. & OJANPERA, I. "Comparison of fatal poisonings by prescription opioids". *Forensic Sci.Int.*, **222** (1-3): 327, 2012.
39. ZHU, T.; DING, L.; GUO, X.F.; YANG, L. & WEN, A.D. "Simultaneous determination of tramadol and acetaminophen in human plasma by LC-ESI-MS". *Chromatographia*, **66** (3-4): 171, 2007.
40. BELAL, T.; AWAD, T. & CLARK, C.R. "Determination of Paracetamol and Tramadol Hydrochloride in Pharmaceutical Mixture Using HPLC and GC-MS". *J. Chromatogr. Sci.*, **47** (10): 849, 2009.
41. BADEA, I.A.; VITAN, I.; VLADESCU, L. & ABOUL-ENEIN, H.Y. "Simultaneous Determination of Some Analgesic Drugs Using Mixed Mode Stationary Phase". *Chromatographia*, **76** (21-22): 1459, 2013.
42. SCHMIDT, A.H. "Validated HPLC method for the determination of residues of acetaminophen, caffeine, and codeine phosphate on swabs collected from pharmaceutical manufacturing equipment in support of cleaning validation". *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **29** (11): 1663, 2006.

43. RAMOS-MARTOS, N.; AGUIRRE-GOMEZ, F.; MOLINZ-DIAZ, A. & CAPITAN-VALLVEY, L.F. "Application of liquid chromatography to the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, caffeine, codeine, paracetamol, pyridoxine, and thiamine in pharmaceutical preparations". *J. AOAC Int.*, **84** (3): 676, 2001.
44. SILVA, T.A.; ZANIN, H.; VICENTINI, F.C.; CORAT, E.J. & FATIBELLO-FILHO, O. "Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of nanomolar levels of atorvastatin calcium in pharmaceutical and biological samples using a vertically aligned carbon nanotube/graphene oxide electrode". *Analyst*, **139** (11): 2832, 2014.
45. FIGUEIREDO-FILHO, L.C.S.; SILVA, T.A.; VICENTINI, F.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous voltammetric determination of dopamine and epinephrine in human body fluid samples using a glassy carbon electrode modified with nickel oxide nanoparticles and carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film". *Analyst*, **139** (11): 2842, 2014.
46. DEROCO, P.B.; VICENTINI, F.C.; OLIVEIRA, G.G.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetric determination of hydroxychloroquine in pharmaceutical and synthetic urine samples using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *J. Electroanal. Chem.*, **719**: 19, 2014.
47. POURNAGHI-AZAR, M.H. & SAADATIRAD, A. "Simultaneous Determination of Paracetamol, Ascorbic Acid and Codeine by Differential Pulse Voltammetry on the Aluminum Electrode Modified by Thin Layer of Palladium". *Electroanalysis*, **22** (14): 1592, 2010.
48. BABAEI, A.; DEHDASHTI, A.; AFRASIABI, M.; BABAZADEH, M.; FARSHBAF, M. & BAMDAD, F. "A Sensor for Simultaneous Determination of Acetaminophen and Codeine at Glassy Carbon Electrode Modified with Multi-Walled Carbon Nanotubes". *Sens. Lett.*, **10** (3-4): 1039, 2012.
49. AFKHAMI, A.; KHOSHSAFAR, H.; BAGHERI, H. & MADRAKIAN, T. "Facile simultaneous electrochemical determination of codeine and acetaminophen in pharmaceutical samples and biological fluids by graphene CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite modified carbon paste electrode". *Sens. Actuator B-Chem.*, **203**: 909, 2014.
50. BABAEI, A.; TAHERI, A.R. & AFRASIABI, M. "A multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode as a new sensor for the sensitive simultaneous determination of paracetamol and tramadol in pharmaceutical preparations and biological fluids". *J. Braz. Chem. Soc.*, **22**: 1549, 2011.
51. GHORBANI-BIDKORBEH, F.; SHAHROKHIAN, S.; MOHAMMADI, A. & DINARVAND, R. "Simultaneous voltammetric determination of tramadol and acetaminophen using carbon nanoparticles modified glassy carbon electrode". *Electrochim. Acta*, **55** (8): 2752, 2010.
52. AFKHAMI, A.; KHOSHSAFAR, H.; BAGHERI, H. & MADRAKIAN, T. "Preparation of NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/graphene nanocomposite and its application as a modifier for the fabrication of an electrochemical sensor for the simultaneous

- determination of tramadol and acetaminophen". *Anal. Chim. Acta*, **831**: 50, 2014.
53. MASHHADIZADEH, M.H. & RASOULI, F. "Design of a New Carbon Paste Electrode Modified with TiO<sub>2</sub> Nanoparticles to Use in an Electrochemical Study of Codeine and Simultaneous Determination of Codeine and Acetaminophen in Human Plasma Serum Samples". *Electroanalysis*, **26** (9): 2033, 2014.
54. ENSAFI, A.A.; AHMADI, N.; REZAEI, B. & ABARGHOUI, M.M. "A new electrochemical sensor for the simultaneous determination of acetaminophen and codeine based on porous silicon/palladium nanostructure". *Talanta*, **134**: 745, 2015.
55. SANGHAVI, B.J. & SRIVASTAVA, A.K. "Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen and tramadol using Dowex50wx2 and gold nanoparticles modified glassy carbon paste electrode". *Anal. Chim. Acta*, **706** (2): 246, 2011.
56. USLU, B. & OZKAN, S.A. "Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals". *Anal. Lett.*, **40** (5): 817, 2007.
57. MCCREERY, R.L. "Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry". *Chem. Rev.*, **108** (7): 2646, 2008.
58. WANG, J., *Analytical Electrochemistry*. John Wiley & Sons Inc ed. 2006, New Jersey. p.
59. BRETT, A.M.O. & BRETT, C.M.A., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* 1994, O.U. Press: Oxford. p.
60. USLU, B. & OZKAN, S.A. "Solid electrodes in electroanalytical chemistry: Present applications and prospects for high throughput screening of drug compounds". *Comb. Chem. High Throughput Screen*, **10** (7): 495, 2007.
61. KAKHKI, S.; SHAMS, E. & BARSAN, M.M. "Fabrication of carbon paste electrode containing a new inorganic-organic hybrid based on SiW<sub>12</sub>O<sub>40</sub> (4-) polyoxoanion and Nile blue and its electrocatalytic activity toward nitrite reduction". *J. Electroanal. Chem.*, **704**: 80, 2013.
62. KARIMI-MALEH, H.; BIPARVA, P. & HATAMI, M. "A novel modified carbon paste electrode based on NiO/CNTs nanocomposite and (9, 10-dihydro-9, 10-ethanoanthracene-11, 12-dicarboximido)-4-ethylbenzene-1, 2-diol as a mediator for simultaneous determination of cysteamine, nicotinamide adenine dinucleotide and folic acid". *Biosens. Bioelectron.*, **48**: 270, 2013.
63. BA, X.; LUO, L.Q.; DING, Y.P. & LIU, X. "Determination of L-tryptophan in the presence of ascorbic acid and dopamine using poly(sulfosalicylic acid) modified glassy carbon electrode". *Sens. Actuator B-Chem.*, **187**: 27, 2013.
64. BARANOWSKA, I. & BIJAK, K. "Voltammetric determination of disinfectants at multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode". *J. Anal. Chem.*, **68** (10): 891, 2013.
65. SABERI, R.S. & SHAHROKHIAN, S. "Highly sensitive voltammetric determination of lamotrigine at highly oriented pyrolytic graphite electrode". *Bioelectrochemistry*, **84**: 38, 2012.

66. WANG, J.H.; SUN, H. & ZHAO, X.S. "Electrochemical catalysis and stability of tetraamido macrocyclic ligands iron immobilized on modified pyrolytic graphite electrode". *Catal. Today*, **158** (3-4): 263, 2010.
67. LOURENCAO, B.C.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C.; MAZO, L.H. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **78** (3): 748, 2009.
68. MEDEIROS, R.A.; DE CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **76** (3): 685, 2008.
69. NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; ROSTAMI, S. & JAHROMI, F.Z. "Ytterbium fluoride nanoparticles on carbon nanotubes: preparation, characterization and application for simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid". *J. Iran Chem. Soc.*, **10** (5): 1025, 2013.
70. SUSSMANN, R.S., *CVD diamond for electronic devices and sensor*. New York, John Wiley, 2009, p. 571.
71. REIVHARD, J.A.D.K., *Diamond films handbook*. New York, Marcel Dekker, 2002. p. 686.
72. PLESKOV, Y.V. "Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis". *J. Anal. Chem.*, **55** (11): 1045, 2000.
73. PLESKOV, Y.V. "Electrochemistry of diamond: A review". *Russ. J. Electrochem.*, **38** (12): 1275, 2002.
74. PANIZZA, M. & CERISOLA, G. "Application of diamond electrodes to electrochemical processes". *Electrochim. Acta*, **51** (2): 191, 2005.
75. ANDRADE, L.S.; ROCHA-FILHO, R.C.; CASS, Q.B. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim on a Boron-Doped Diamond Electrode". *Electroanalysis*, **21** (13): 1475, 2009.
76. BABYAK, C. & SMART, R.R. "Electrochemical detection of trace concentrations of cadmium and lead with a boron-doped diamond electrode: Effect of KCl and KNO<sub>3</sub> electrolytes, interferences and measurement in river water". *Electroanalysis*, **16** (3): 175, 2004.
77. SONG, Y. & SWAIN, G.M. "Development of a method for total inorganic arsenic analysis using anodic stripping voltammetry and a Au-coated, diamond thin-film electrode". *Anal. Chem.*, **79** (6): 2412, 2007.
78. SALAZAR-BANDA, G.R.; ANDRADE, L.S.; NASCENTE, P.A.P.; PIZANI, P.S.; ROCHA-FILHO, R.C. & AVACA, L.A. "On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments". *Electrochim. Acta*, **51** (22): 4612, 2006.
79. YAGI, I.; NOTSU, H.; KONDO, T.; TRYK, D.A. & FUJISHIMA, A. "Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes". *J. Electroanal. Chem.*, **473** (1-2): 173, 1999.

80. SUFFREDINI, H.B.; PEDROSA, V.A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S.A.S.; ROCHA-FILHO, R.C. & AVACA, L.A. "Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment". *Electrochim. Acta*, **49** (22-23): 4021, 2004.
81. GIRARD, H.; SIMON, N.; BALLUTAUD, D.; HERLERN, M. & ETCHEBERRY, A. "Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes". *Diam. Relat. Mater.*, **16** (2): 316, 2007.
82. ANDRADE, L.S.; SALAZAR-BANDA, G.R.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O., *Cathodic Pretreatment of Boron-Doped Diamond Electrodes and their Use in Electroanalysis*, in *Synthetic Diamond Films*. 2011, John Wiley & Sons, Inc. p. 181.
83. LOURENCAO, B.C.; BACCARIN, M.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Differential pulse voltammetric determination of albendazole in pharmaceutical tablets using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *J. Electroanal. Chem.*, **707**: 15, 2013.
84. PIRES EISELE, A.P.; MANSANO, G.R.; DE OLIVEIRA, F.M.; CASARIN, J.; TEIXEIRA TARLEY, C.R. & SARTORI, E.R. "Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and valsartan in combined dosage forms: Electroanalytical performance of cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *J. Electroanal. Chem.*, **732**: 46, 2014.
85. SALAZAR-BANDA, G.R.; ANDRADE, L.S.; NASCENTE, P.A.P.; PIZANI, P.S.; ROCHA-FILHO, R.C. & AVACA, L.A. "On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments". *Electrochim. Acta*, **51** (22): 4612, 2006.
86. KISSINGER, P.T. & HEINEMAN, W.R. "Cyclic voltammetry". *J. Chem. Educ.*, **60** (9): 702, 1983.
87. SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. & CROUCH, S.R., *Fundamentos de química analítica*. Thomson: São Paulo. 2007, p. 999.
88. WANG, J., *Analytical Electrochemistry*. John Wiley: New York, 2006, p. 250.
89. MEDEIROS, R.A.; LOURENCAO, B.C.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simple Flow Injection Analysis System for Simultaneous Determination of Phenolic Antioxidants with Multiple Pulse Amperometric Detection at a Boron-Doped Diamond Electrode". *Anal. Chem.*, **82** (20): 8658, 2010.
90. MEDEIROS, R.A.; LOURENCAO, B.C.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **99**: 883, 2012.
91. GIMENES, D.T.; DOS SANTOS, W.T.P.; TORMIN, T.F.; MUNOZ, R.A.A. & RICHTER, E.M. "Flow-Injection Amperometric Method for Indirect

- Determination of Dopamine in the Presence of a Large Excess of Ascorbic Acid". *Electroanalysis*, **22** (1): 74, 2010.
92. SILVA, W.C.; PEREIRA, P.F.; MARRA, M.C.; GIMENES, D.T.; CUNHA, R.R.; DA SILVA, R.A.B.; MUNOZ, R.A.A. & RICHTER, E.M. "A Simple Strategy for Simultaneous Determination of Paracetamol and Caffeine Using Flow Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection". *Electroanalysis*, **23** (12): 2764, 2011.
93. DOS SANTOS, W.T.P.; GIMENES, D.T.; RICHTER, E.M. & ANGNES, L. "Flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection: potentialities and applications". *Quim. Nova*, **34** (10): 1753, 2011.
94. ROCHA, F.R.P.; MARTELLI, P.B. & DOS REIS, B.F. "Didactic experiments employing a flow injection system". *Quim. Nova*, **23** (1): 119, 2000.
95. SURAREUNGCHAI, W.; DEEPUNYA, W. & TASAKORN, P. "Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose". *Anal. Chim. Acta*, **448** (1-2): 215, 2001.
96. DE MIRANDA, J.A.T.; CUNHA, R.R.; GIMENES, D.T.; MUNOZ, R.A.A. & RICHTER, E.M. "Simultaneous determination of ascorbic acid and acetylsalicylic acid using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection". *Quim. Nova*, **35** (7): 1459, 2012.
97. GIMENES, D.T.; DE FREITAS, J.M.; MUNOZ, R.A.A. & RICHTER, E.M. "Flow-Injection Amperometric Method for Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode". *Electroanalysis*, **23** (11): 2521, 2011.
98. LAUBE, N.; MOHR, B. & HESSE, A. "Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines". *J. Cryst. Growth*, **233** (1-2): 367, 2001.
99. PARHAM, H. & ZARGAR, B. "Determination of isosorbide dinitrate in arterial plasma, synthetic serum and pharmaceutical formulations by linear sweep voltammetry on a gold electrode". *Talanta*, **55** (2): 255, 2001.
100. GANDINI, D.; MICHAUD, P.A.; DUO, I.; MAHE, E.; HAENNI, W.; PERRET, A. & COMNINELLIS, C. "Electrochemical behavior of synthetic boron-doped diamond thin film anodes". *New Diam. Front. Carbon Technol.*, **9** (5): 303, 1999.
101. RICHTER, E.M.; JESUS, D.P.D.; NEVES, C.A.; LAGO, C.L.D. & ANGNES, L. "Aplicações eletroanalíticas com eletrodos de prata confeccionados a partir de CDs graváveis". *Quim. Nova*, **26**: 839, 2003.
102. R.E. BRUNS; I.S. SCARMINIO & B.B. NETO, *Statistical Design – Chemometrics*. New York, 2006 p. 521.
103. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. & MELO, L.F.C. "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos". *Quim. Nova*, **27**: 771, 2004.
104. RIBEIRO, F.A.D.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.D. & SCHNEIDER, R.P. "Planilha de validação: uma nova ferramenta para

estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados".

*Quim. Nova*, **31**: 164, 2008.

105. KARUNAKARAN, K.; NAVANEETHAN, G. & ELANGO, K.P.

"Development and Validation of a Stability-Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Paracetamol, Tramadol HCl and Domperidone in a Combined Dosage Form". *Trop. J. Pharm. Res.*, **11** (1): 99, 2012.

106. BARD, A.J. & FAULKNER, L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* 2001, John Wiley & Sons Inc: New York. p.

107. HOLT, K.B.; BARD, A.J.; SHOW, Y. & SWAIN, G.M. "Scanning electrochemical microscopy and conductive probe atomic force microscopy studies of hydrogen-terminated boron-doped diamond electrodes with different doping levels". *J. Phys. Chem. B*, **108** (39): 15117, 2004.

108. DEROCO, P.B.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous voltammetric determination of aspartame and acesulfame-K in food products using an anodically pretreated boron-doped diamond electrode". *Anal. Methods*, **7** (5): 2135, 2015.

109. MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode". *Food Chem.*, **123** (3): 886, 2010.

110. ANVISA, "Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003". 2003.

[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).

111. ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J. & QUINN, M.E., *Handbook of pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical press: London, 2009, p. 888.