BIBLIOTECA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**SISTEMAS AMPEROMÉTRICOS
EMPREGANDO MATRIZES DE
MICROELETRODOS E ANÁLISES
SIMULTÂNEAS**

Renato Camargo Matos

Tese de Doutorado

Prof. Dr. Lúcio Angnes

Orientador

São Paulo

17/08/2001

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004047

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Matos, Renato Camargo
M433s Sistemas amperométricos empregando matrizes de
 microeletrodos e análises simultâneas / Renato Camargo
 Matos. -- São Paulo, 2001.
 155p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Angnes, Lúcio

1. Amperometria : Química analítica 2. Química ambiental
3. Quimiometria I. T. II. Angnes, Lúcio, orientador.

543.0872 CDD

***“Sistemas Amperométricos Empregando
Matrizes de Microeletrodos e Análises
Simultâneas”***

RENATO CAMARGO MATOS

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Química Analítica.*

Aprovada por:

Prof. Dr. LÚCIO ANGNES
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. JORGE CESAR MASINI
IQ – USP

Prof. Dr. SÉRGIO ANTÔNIO SPÍNOLA MACHADO
IQSC – USP

Prof. Dr. SÉRGIO LUIS COSTA FERREIRA
UFBa

Profa. Dra. DENISE ALVES FUNGARO
IPEN – SP

SÃO PAULO
17 DE AGOSTO 2001.

*Dedico a Dora, Mateus
e meus pais Carlos e Lourdes*

*"Quando escolhi a selva,
para aprender a ser,
folha por folha,
estendi as minhas lições
e aprendi a ser raiz,
barro profundo,
terra calada,
noite cristalina,
e pouco a pouco mais,
toda selva. "*

PABLO NERUDA

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Lúcio Angnes pela orientação e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.
- Aos Prof. Drs. Claudimir Lucio do Lago, Ivano G. R. Gutz e Mauro Bertotti e demais professores da Química Analítica pelo apoio.
- Aos Profs. Drs. Mário César Ugulino de Araújo e Teresa Cristina Bezerra Saldanha pelo auxílio na interpretação dos dados.
- Aos Profs. Drs. Sérgio L. C. Ferreira e Antônio Celso S. Costa pela iniciação na vida científica.
- Aos Profs. Drs. Jairo José Pedrotti, Antônio William O. Lima, Valberes B. do Nascimento, Carla Maria N. Azevedo e Márcio Augelli pelo incentivo.
- Aos meus irmãos Carlos Jr., Marcos e Andréa e sobrinhos Thauan e Nathalie.
- Aos meus amigos e irmãos de coração Márcio e Neide Borges pelo apoio, amizade e incentivo no decorrer deste trabalho.
- Aos amigos Eduardo e Maria Carolina pela amizade durante todos esses anos de pós-graduação.
- Ao Rodrigo A. Muñoz pelo trabalho de iniciação científica desenvolvido com a minha parceria.
- Aos colegas da USP Alexandre, Dosil, Daniela, Flávio, Margareth, José Geraldo, Carlos, Alberto, Giza, Heron, Vânia, Pillar, Fabiano, Victor, Luciana, Humberto, Lucildes, Cristiane, Patrícia, Silvia e demais integrantes da Química Analítica.
- Ao pessoal da CPG, Milton, Cibele, Maria Inês e Emiliano.
- As secretárias da Química Analítica, Célia e Marlena pela ajuda com as atividades burocráticas.
- Aos colegas e amigos de graduação do Instituto de Química da UFBA.
- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e apoio financeiro ao projeto.
- Ao PADCT/CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

LISTAS DE ABREVIACÕES	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1. Sensores Eletroquímicos.....	2
1.2. Métodos de Calibração Multivariada.....	5
1.2.1. Regressão Linear Múltipla.....	9
1.2.2. Regressão em Componentes Principais.....	10
1.2.3. Mínimos Quadrados Parciais.....	10
1.3. Análise Simultânea Usando Detecção Eletroquímica Multicanal e Calibração Multivariada.....	11
1.4. Microeletrodos.....	15
1.5. Eletrodos Modificados.....	18
1.6. Sensores Eletroquímicos em Química Ambiental.....	20
Capítulo 2 – OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	24
Capítulo 3 – MICROELETRODOS MODIFICADOS E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA SIMULTÂNEA EM FLUXO DE ÁCIDO ASCÓRBICO, DOPAMINA, EPINEFRINA E DIPIRONA	27
3.1. Introdução.....	28
3.1.1. Ácido Ascórbico.....	29
3.1.2. Dopamina.....	31
3.1.3. Epinefrina.....	32
3.1.4. Dipirona.....	34
3.2. Materiais e Métodos.....	35
3.2.1. Reagentes e Soluções.....	35
3.2.2. Eletrodos e Células em Fluxo.....	36

3.2.3. Instrumentação.....	39
3.2.4. Planejamento da Calibração.....	41
3.2.4.1. Misturas de Calibração	41
3.2.4.2. Misturas de Teste.....	41
3.3. Ajuste e Validação dos Modelos Estatísticos.....	43
3.3.1. Análises Voltamétricas.....	43
3.3.2. Estudo Fatorial das Possíveis Interações entre os Analitos.....	45
3.3.3. Calibração.....	53
3.3.3.1. Seleção de Potencial.....	53
3.3.3.2. Validação do Modelo Estatístico.....	56
3.3.4. Aplicação do Modelo Estatístico na Análise de Ácido Ascórbico e Dipirona em Preparações Farmacêuticas.....	64
3.4. Conclusões.....	68
 Capítulo 4 – SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO COM DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DIFERENCIAL DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM ÁGUA DE CHUVA USANDO CATALASE IMOBILIZADA EM REATOR TUBULAR	70
4.1. Introdução.....	71
4.2. Materiais e Métodos.....	74
4.2.1. Imobilização Enzimática.....	74
4.2.2. Reagentes e Soluções.....	75
4.2.3. Procedimentos de Amostragem.....	77
4.2.4. Eletrodos e Célula Eletroquímica.....	77
4.2.5. Instrumentação.....	77
4.2.5.1. Propulsor Pneumático Versátil e Isento de Pulsção Usando para Impulsionar Soluções em Sistemas de Análise em Fluxo.....	78
4.3. Resultados e Discussões.....	89
4.3.1. Catalase x Peroxidase.....	89
4.3.2. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo.....	90
4.3.3. Calibração e Determinação de Peróxido de Hidrogênio em Amostras de Água de Chuva.....	93

4.4. Conclusões.....	97
 Capítulo 5 – ANÁLISE AMPEROMÉTRICA SIMULTÂNEA DE GLICOSE E ÁCIDO ÚRICO USANDO MICROELETRODOS DE OURO MODIFICADOS ENZIMATICAMENTE	 98
5.1. Introdução.....	99
5.2. Materiais e Métodos.....	102
5.2.1 Reagentes e Soluções.....	102
5.2.2. Eletrodos e Célula Eletroquímica.....	102
5.2.3. Instrumentação.....	103
5.2.4. Construção do Biossensor.....	103
5.3. Resultados e Discussões.....	105
5.3.1. Caracterização do Biossensor.....	105
5.3.2. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo.....	106
5.3.3. Análise Simultânea de Glicose e Ácido Úrico.....	110
5.4. Conclusões.....	116
 Capítulo 6 – CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS	 117
6.1. Considerações Finais.....	118
6.2. Perspectivas de Trabalhos Futuros.....	119
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 121
 CURRICULUM VITAE	 130

LISTA DE ABREVIATÖES

AA – Ácido ascórbico

A/D – Conversor analógico/digital

AMS – DE - Análise multicomponente simultânea com detecção eletroquímica

CD-Rs – Discos compactos graváveis

DA – Dopamina

DI – Dipirona

D/A – Conversor digital/analógico

EMA – Erro médio absoluto

EMR – Erro médio relativo

ENZ – Enzima

EP – Epinefrina

FIA – Análise por injeção em fluxo (*flow injection analysis*)

GOD – Glicose oxidase

GU – Glutaraldeído

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IRA – Resina de troca iônica Amberlite IRA – 743

MLR – Regressão linear múltipla (*multiple linear regression*)

PCR – Regressão em componentes principais (*principal linear regression*)

PLS – Regressão por mínimos quadrados parciais (*partial least square regression*)

POD – Peroxidase

RMSEP – Erro médio quadrático de previsão (*root mean square error of prediction*)

RMSP – Região metropolitana de São Paulo

Sat. – Saturado

SCE – Eletrodo de calomelano saturado

UCP – Unidade de controle de potencial

µeletrodo – Microeletrodo

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pg.
Figura 1. Evolução do número de artigos usando sensores químicos entre os anos de 1987 e 1995.	3
Figura 2. Diagrama esquemático de um sensor eletroquímico.	4
Figura 3. Matriz de dados para calibração multivariada.	8
Figura 4. Organização dos dados de análise por injeção em fluxo em calibração multivariada.	8
Figura 5. Principais tipos de geometria empregada para microeletrodos.	17
Figura 6. Modelo de funcionamento de um eletrodo com superfície modificada.	19
Figura 7. Microeletrodos de ouro.	38
Figura 8. Célula eletroquímica usada para os testes amperométricos.	38
Figura 9. Esquema simplificado do multipotenciostato.	39
Figura 10. Diagrama esquemático mostrando o arranjo experimental dos estudos baseados em FIA.	40
Figura 11. Voltamogramas cíclicos de ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona em microeletrodo de ouro limpo e modificado pela eletrodeposição de Pd, Pt e Pd + Pt.	45
Figura 12. Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{\text{trab.}} = 200 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.	47
Figura 13. Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{\text{trab.}} = 300 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.	48
Figura 14. Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{\text{trab.}} = 400 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.	49

Figura 15. Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{\text{trab.}} = 500 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.	50
Figura 16. Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{\text{trab.}} = 700 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.	51
Figura 17. Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de 100 μL de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{\text{trab.}} = 800 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.	52
Figura 18. Gráficos dos RMSEPs do modelo MLR <i>versus</i> o potencial aplicado pelo eletrodo de trabalho.	55
Figura 19. Gráficos dos RMSEPs do modelo PLS <i>versus</i> o potencial aplicado pelo eletrodo de trabalho.	55
Figura 20. Comparação entre os valores de concentração previstos pelo modelo MLR a 500 mV e os verdadeiros para o conjunto de teste.	58
Figura 21. Comparação entre os valores de concentração previstos pelo modelo PLS a 400 mV e os verdadeiros para o conjunto de teste.	59
Figura 22. Gráficos dos erros absolutos nas previsões para o conjunto de teste contra os valores verdadeiros das concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) usando a modelagem MLR a 500 mV.	60
Figura 23. Gráficos dos erros absolutos nas previsões para o conjunto de teste contra os valores verdadeiros das concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) usando a modelagem PLS a 400 mV.	61
Figura 24. Respostas amperométricas em fluxo de microeletrodo de ouro limpo e um modificado com paládio para injeções consecutivas de 100 μL de misturas de calibração e amostras de medicamentos a 400 mV vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.	64
Figura 25. Respostas amperométricas em fluxo de microeletrodo de ouro limpo e um modificado com paládio para injeções consecutivas de 100 μL de misturas de calibração e amostras de medicamentos a 500 mV vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.	65
Figura 26. Diagrama esquemático da imobilização enzimática.	76
Figura 27. Diagrama esquemático do sistema FIA empregado para a análise de peróxido de hidrogênio.	78

Figura 28. Representação esquemática do sistema de análise em fluxo utilizando bomba de aquário para a propulsão de líquidos.	81
Figura 29. Sinais amperométricos registrados em estudo comparativo de diferentes formas de propulsão.	86
Figura 30. Análise por injeção em fluxo de ácido ascórbico utilizando eletrodo de gota de mercúrio utilizando bomba peristáltica e um mini-compressor de ar.	88
Figura 31. Ensaio amperométrico para H_2O_2 $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ usando o sistema em fluxo sem reator e com reator tubular empacotado com catalase e peroxidase.	90
Figura 32. Variação do sinal analítico do H_2O_2 $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre microeletrodo de ouro modificado com platina em função da vazão do sistema FIA.	91
Figura 33. Variação do sinal analítico do H_2O_2 $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre microeletrodo de ouro modificado com platina em função do volume de mostra injetada no sistema FIA.	92
Figura 34. Testes de recuperação para o H_2O_2 $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em amostra de água de chuva.	94
Figura 35. Curva analítica para o H_2O_2 .	95
Figura 36. Comparação dos resultados obtidos entre amperometria diferencial usando microeletrodo de ouro modificado pela eletrodeposição de paládio, amperometria diferencial usando microeletrodo de mercúrio e espectrofotometria para análise de peróxido de hidrogênio em água de chuva.	97
Figura 37. Diagrama esquemático do biossensor para determinação de glicose.	104
Figura 38. Variação do sinal analítico da glicose no biossensor amperométrico em diferentes potenciais de trabalho.	106
Figura 39. Variação do sinal analítico da glicose no biossensor amperométrico com a vazão do sistema FIA.	107
Figura 40. Curva analítica para a glicose.	108
Figura 41. Injeções repetitivas de 100 μL de amostra de glicose na faixa de $1,0$ a $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ no biossensor amperométrico.	109
Figura 42. Determinação simultânea de ácido úrico e glicose usando microeletrodo de ouro modificado com platina e biossensor.	110

Figura 43. Espectro de absorção e curva analítica para a determinação espectrofotométrica de glicose.	112
Figura 44. Espectro de absorção e curva analítica para a determinação espectrofotométrica de ácido úrico.	114
Figura 45. Comparação dos resultados obtidos entre amperometria e espectrofotometria para a determinação de glicose e ácido úrico.	116

LISTA DE TABELAS

TABELA	Pg.
Tabela 1. Faixa de aplicabilidade dos métodos analíticos mais comuns usados em análise ambiental.	22
Tabela 2. Concentração de ácido ascórbico e dipirona na amostras de medicamentos em $\mu\text{g g}^{-1}$.	36
Tabela 3. Intervalo em que as correntes de oxidação variam linearmente com a concentração dos analitos.	41
Tabela 4. Matriz de calibração para misturas de AA, DA, EP e DI.	42
Tabela 5. Matriz de teste para avaliação da calibração.	43
Tabela 6. Determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona em amostras sintética para microeletrodos de ouro modificados com diferentes metais nobres usando o modelo MLR.	56
Tabela 7. Determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona em amostras sintética para microeletrodos de ouro modificados com diferentes metais nobres usando o modelo PLS.	57
Tabela 8. Erros médios absolutos (EMA) e relativos (EMR) nas previsões das concentrações das amostras do conjunto de teste na calibração MLR a 500 mV.	63
Tabela 9. Erros médios absolutos (EMA) e relativos (EMR) nas previsões das concentrações das amostras do conjunto de teste na calibração PLS a 400 mV.	63
Tabela 10. Determinação simultânea de ácido ascórbico e dipirona em amostras de medicamentos usando amperometria e a modelagem MLR.	66
Tabela 11. Determinação simultânea de ácido ascórbico e dipirona em amostras de medicamentos usado iodometria.	67
Tabela 12. Comparação dos resultados obtidos por MLR e I_2 para a determinação simultânea de ácido ascórbico e dipirona em amostras de medicamentos.	68
Tabela 13. Vazões máximas obtidas com o mini-compressor de ar usando reator de diferentes tamanhos.	84

Tabela 14. Resultados obtidos na análise de peróxido de hidrogênio em água de chuva.	96
--	----

Tabela 15. Resultados obtidos na análise de ácido úrico e glicose em amostras sintéticas.	115
---	-----

RESUMO

Título: “Sistemas Amperométricos Empregando Matrizes de Microeletrodos e Análises Simultâneas.”

Doutorando: Renato Camargo Matos

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

No presente trabalho são descritos métodos versáteis para determinações simultâneas multicomponentes. Estes são baseados num sistema de detecção multicanal acoplado a célula em fluxo contendo um conjunto de microeletrodos modificados.

O primeiro método mostra a quantificação amperométrica em fluxo de ácido ascórbico (AA), dopamina (DA), epinefrina (EP) e dipirona (DI) em misturas (na faixa de $\mu\text{g g}^{-1}$). Neste trabalho foi utilizado um conjunto de microeletrodos de ouro limpos e modificados, independentemente, com diferentes metais nobres (Pt, Pd e uma mistura equimolar de Pd e Pt), associados com métodos de calibração multivariada. As análises de amostras sintéticas e formulações farmacêuticas contendo AA e DI apresentaram valores muito similares aos encontrados com a iodometria clássica. O método apresentou um erro médio absoluto (em $\mu\text{g g}^{-1}$) de 0,3, 0,1, 0,4 e 0,3 para AA, DA, EP e DI, respectivamente, para a regressão linear múltipla e 0,3, 0,4, 0,4 e 0,2 para AA, DA, EP e DI, respectivamente, para a regressão por mínimos quadrados parciais.

O segundo trabalho apresenta um método para determinação amperométrica diferencial de peróxido de hidrogênio em águas de chuvas em associação com análise por injeção em fluxo e imobilização de catalase em reator tubular usando glutaraldeído e resina amberlite IRA – 743 como suporte. A curva de calibração para o peróxido de hidrogênio foi linear na faixa de concentração de 1 a $10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com um desvio relativo padrão (RSD) < 1%. O limite de detecção do método foi calculado em $2,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. As análises de águas de chuvas foram comparadas com amperometria usando microeletrodo de mercúrio e espectrofotometria, sendo que os resultados mostraram uma boa correlação.

O terceiro método descreve a determinação amperométrica simultânea em fluxo de glicose e ácido úrico, usando dois microeletrodos com diferentes composições (Pt e Pt+glicose oxidase+acetato de celulose) e detecção multicanal. A curva de calibração para a glicose foi linear na faixa de concentração de 1 a $10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com um desvio relativo padrão (RSD) < 1%. O limite de detecção do método foi calculado em $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As análises de amostras sintéticas foram comparadas com o método espectrofotométrico, mostrando uma boa concordância entre os resultados obtidos.

ABSTRACT

Título: "Amperometric System Using Array of Microelectrode and Simultaneous Determinations."

Doutorando: Renato Camargo Matos

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

In the present work, versatile methods for simultaneous amperometric multicomponent analysis are described. They are based on a multi-channel detection system, coupled to a flow cell containing an array of modified microelectrodes.

The first method shows the flow injection amperometric quantification of ascorbic acid (AA), dopamine (DA), epinephrine (EP) and dipyrone (DI) in mixtures (in the $\mu\text{g g}^{-1}$ range). This work was successfully performed by using an array of microelectrodes bare and with units modified by the electrodeposition of different noble metals (platinum, palladium or a mixture of platinum+palladium), together with multivariate calibration analysis. The analysis of synthetic samples and pharmaceutical compounds containing AA and DI led to very similar values to those obtained by the classical iodometric analysis. The average absolute errors (in $\mu\text{g g}^{-1}$) calculated for each analyte were 0.3, 0.1, 0.4 and 0.3 for AA, DA, EP and DI, respectively, for multiple linear regression and 0.3, 0.4, 0.4 e 0.2 for AA, DA, EP and DI, respectively, for partial least square regression.

The second study presents a method for differential amperometric determination of hydrogen peroxide in rainwater in association with flow injection analysis and immobilized catalase enzymes in a tubular reactor using glutaraldehyde and amberlite IRA – 743 which support. The calibration curves for hydrogen peroxide standards was linear in the concentration range from 1 to $10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ with a relative standard deviation (RSD) < 1 %. The detection limit was calculated as $2.9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. The rainwater samples analyses were compared with the amperometric using mercury microelectrode and spectrophotometric methods, showing very good correlation between all the methods.

The third method describes the flow injection amperometric determination of glucose and uric acid simultaneously, using two microelectrodes with different composition (platinum and platinum+glucose oxidase+cellulose acetate) and a multi-channel detection system. The calibration curves for glucose standards was linear in the concentration range from 1 to $10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ with a relative standard deviation (RSD) < 1 %. The detection limit was calculated as $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. The analyses of synthetic samples were compared with the spectrophotometric method, showing very good correlation between the methods.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A análise eletroquímica tem sido de grande importância no controle de processos industriais, no monitoramento ambiental e em diferentes aplicações na medicina e na biotecnologia. O desenvolvimento de metodologias rápidas, confiáveis e de baixo custo para o monitoramento de espécies químicas tem evoluído de maneira muito acentuada. Atualmente, a associação de microeletrodos, de eletrodos modificados, de detecção multicanal e de análise quimiométrica vem recebendo crescente atenção, devido as suas vantagens com relação a análises simultâneas.

A química eletroanalítica engloba um grupo de métodos analíticos quantitativos e qualitativos que são baseados no sinal gerado pela presença de um analito em solução. O potencial, a corrente, a concentração e o tempo são as principais variáveis nesses métodos [1]. Dentre estas técnicas pode-se destacar as voltamétricas por apresentarem numerosas vantagens, dentre as quais, seletividade, rapidez de resposta, alta sensibilidade, facilidade de miniaturização e baixo custo.

Um dos grandes problemas encontrados por diversos pesquisadores, está no fato de que mais de uma espécie eletroativa pode responder a certas condições estabelecidas. Assim, o uso de microeletrodos, eletrodos modificados e de biossensores associados a métodos de automação de análises constitui-se em uma poderosa ferramenta para a resolução rápida e confiável de análises de amostras complexas.

Este capítulo tem como objetivo fornecer alguns fundamentos teóricos dos diferentes assuntos relacionados neste trabalho. Serão abordados aspectos relacionados com os trabalhos desenvolvidos, procurando dar subsídios para facilitar o entendimento dos capítulos posteriores.

1.1. Sensores Eletroquímicos

Nas últimas décadas, poucos temas geraram tanto interesse e agregaram tantas áreas distintas como o desenvolvimento de sensores químicos. Tamanho interesse talvez possa ser atribuído à condição ímpar destes transdutores, capazes de fornecer informações sobre a composição de um sistema em tempo real (ou quase). A Figura 1 mostra a evolução do número de artigos publicados na área dos sensores químicos, evidenciando um

crescimento de cerca de 210 % entre os anos de 1987 e 1995, sendo que nos últimos anos (1995 a 2001) esse número foi ainda maior [2].

Figura 1. Evolução do número de artigos usando sensores químicos entre os anos de 1987 e 1995. Fonte: *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 179R – 208R [2].

Diversas definições podem ser encontradas para um sensor químico, entretanto podemos defini-lo como um transdutor que responde a um analito através de uma reação química, podendo ser usado para determinações qualitativas e quantitativas [3]. Seu uso se faz necessário para o monitoramento de espécies químicas de nosso ambiente em tempo real, levado por crescentes necessidades em áreas como meio ambiente, saúde, segurança, etc e também pela necessidade de se determinar contaminantes e analitos em níveis cada vez menores, levando a baixos limites de detecção, bem como melhorar a precisão e exatidão de métodos analíticos. Os sensores químicos são divididos em sensores eletroquímicos, sensores ópticos (fibras ópticas, fotometria, fluorescência, etc), sensores de massa (cristais piezoelétricos), sensores de calor e biossensores de acordo com o tipo de transdutor usado [3].

Os sensores eletroquímicos são baseados nas propriedades elétricas de um analito em solução, eles são divididos em potenciométricos, condutométricos e voltamétricos/amperométricos [3]. Medidas eletroquímicas para fins analíticos podem ser efetuadas sob condição de equilíbrio (corrente nula) com sensores potenciométricos ou fora do equilíbrio (passagem de

corrente) com sensores amperométricos ou voltamétricos. Os sensores potenciométricos fazem uso da medida do potencial elétrico gerado sobre a superfície de um material sólido quando este é colocado em uma solução contendo íons de interesse. A magnitude do sinal de potencial pode ser relacionada com o número de íons em solução, sendo, portanto, considerado um sensor estático. Os sensores condutométricos baseiam-se no fenômeno da difusão das espécies iônicas que ocorre no seio da solução de interesse, estes sensores medem a condutância dos íons presentes em uma solução de interesse. Os sensores voltamétricos/amperométricos levam em consideração o fenômeno da interface entre o eletrodo e a solução, estes sensores operam na presença de corrente, e com potencial controlado, sendo considerados sensores dinâmicos.

A Figura 2 esquematiza a atuação de um sensor eletroquímico, o qual é composto de um analito, o transdutor, a parte eletrônica do sistema e a emissão do sinal elétrico, podendo ainda possuir uma membrana e um sítio de reconhecimento (o qual dá uma certa seletividade ao transdutor).

Figura 2. Diagrama esquemático de um sensor eletroquímico.

Os sensores voltamétricos são talvez os mais sensíveis dentre os eletroquímicos para o estudo de espécies eletroativas. Nestes sensores o potencial de trabalho aplicado varia linearmente com o tempo, de um potencial inicial, E_i , até o potencial final, E_f . Como resposta do sistema, tem-se uma variação de corrente em função dos potenciais aplicados [4]. Já os sensores

amperométricos apresentam o mesmo princípio dos voltamétricos, com a diferença que neste caso o potencial de trabalho aplicado permanece constante durante todo o experimento, sendo monitoradas as variações de corrente correspondente às concentrações das espécies eletroativas.

O parâmetro de seletividade mais importante dos eletrodos para sensores voltamétricos é o potencial aplicado. Idealmente, os potenciais de eletrodo dos pares redox deveriam ser suficientemente afastados uns dos outros para não haver interferência entre diferentes espécies. Infelizmente não é esse o caso, o que faz necessário à busca de uma maior seletividade. Pode-se, entretanto, discriminar as diferentes espécies presentes em solução através de uma escolha correta das condições para o estudo da reação no eletrodo: o material do eletrodo; o meio de reação; o pH; o uso de eletrodos hidrodinâmicos; a voltametria de corrente alternada; o uso de eletrodos modificados com diferentes materiais, etc [5].

Desenvolvimentos recentes de sensores amperométricos e voltamétricos têm incidido no melhoramento da seletividade, aumento da sensibilidade, e diminuição dos limites de quantificação. Os eletrodos hidrodinâmicos, além de terem maior sensibilidade, também permitem maior reprodutibilidade e a possibilidade de serem usados em sistemas de fluxo para controle de processos, controle de qualidade e como detectores para cromatografia. O uso de técnicas de pulso, particularmente voltametria de pulso diferencial, e mais recentemente voltametria de onda quadrada, tem permitido alcançar limites de detecção cada vez mais baixos. Ao mesmo tempo, tem havido muitos progressos na automação da instrumentação eletroanalítica, não só para controlar experiências, mas também para analisar os dados obtidos [5].

1.2. Métodos de Calibração Multivariada

Na década passada muitos químicos “redescobriram” o poder dos métodos de estatística multivariada, estudando suas aplicações na resolução de problemas químicos. Estatística multivariada pode ser entendida como um conjunto de técnicas matemáticas que podem ser aplicadas à análise de dados, quando várias medidas são realizadas para uma mesma amostra. Estes estudos levaram ao desenvolvimento da QUIMIOMETRIA [6].

A análise multicomponente por técnicas eletroanalíticas é tradicionalmente realizada utilizando-se um sensor específico para cada analito ou separando-se o analito de interesse dos seus interferentes. Porém, nem sempre se dispõe de um eletrodo específico para cada analito, tornando-se a análise, em geral, difícil e demorada. Assim, a análise simultânea de misturas normalmente se limita à análise parcial de apenas um ou dois componentes usando potenciais característicos, quando esses aparecem isolados. Os sistemas com mais de dois analitos são usualmente analisados por etapas, determinando-se um componente de cada vez. A análise multicomponente simultânea com detecção eletroquímica (AMS – DE) desenvolveu-se associada a técnicas de separação, sendo a mais utilizada a HPLC, o que tornou os métodos mais rápidos, mas conseqüentemente elevou o custo das análises. Recentemente, alguns pesquisadores estão desenvolvendo metodologias no sentido de evitar a exaustiva (cara e demorada) tarefa de separação de interferentes e de permitir a determinação simultânea de um número cada vez maior de componentes, favorecendo, conseqüentemente, a redução do tempo e do custo das análises.

Atualmente, existem algumas tentativas de se realizar AMS – DE usando diferentes métodos de estatística multivariada. Esses métodos levam à construção de modelos matemáticos que se ajustam aos dados obtidos experimentalmente e incluem métodos de classificação, de otimização, e também métodos de análise qualitativa e/ou quantitativa, que são de especial interesse para os químicos analíticos.

A respeito da importância da identificação dos componentes de uma amostra, os métodos multivariados utilizados com maior freqüência são os de calibração, aplicados à análise quantitativa [7-9]. Os mais conhecidos são a regressão linear múltipla (MLR – *multiple linear regression*), a regressão em componentes principais (PCR – *principal component regression*) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – *partial least square*) [9]. Todos esses modelos são métodos lineares, porque os modelos resultantes descrevem uma relação linear entre as respostas e as concentrações dos componentes das amostras. Estes métodos constituem uma poderosa ferramenta para a análise fatorial e tem sido sucessivamente aplicada para a análise multicomponente simultânea de misturas por espectrofotometria [10].

Métodos de calibração multivariada empregam dados derivativos para análise quantitativa de sistemas multicomponentes, fornecendo subsídio para a escolha da faixa de trabalho mais informativa para o sistema químico em questão.

Um aspecto a ser ressaltado ao discutir modelos de calibração é a sua robustez, isto é, a sua capacidade de não ser afetado por anomalias. Modelos de calibração construídos a partir de dados resultantes de medidas químicas quase sempre estão sujeitos à presença de anomalias, e por isso vem crescendo muito o interesse por métodos robustos de análise multivariada. Esses métodos são capazes de reduzir, automaticamente, a influência das anomalias sobre o conjunto de dados [9].

A calibração multivariada consiste basicamente em duas etapas: a calibração e a previsão. Os dados químicos multivariados são arranjados na forma de tabela de dados, onde objetos são dispostos em linhas e variáveis em colunas, conforme mostrado na Figura 3 [11]. Os objetos freqüentemente são os compostos químicos, e as variáveis são muitas vezes derivadas dos constituintes químicos, como, por exemplo, medidas de concentração, pH, condutividade, dados espectrais ou como neste trabalho valores de corrente de oxidação. Na fase de calibração, tomando como exemplo a amperometria, é montada uma matriz de dados das respostas instrumentais (X), para um conjunto de amostras com composição conhecida (Y), como descrito na Figura 4 [12]. Os dados utilizados nesta etapa constituem o *conjunto de treinamento*. O modelo matemático desenvolvido na etapa de calibração é então utilizado na fase de previsão para estimar as concentrações dos constituintes de novas amostras, a partir de seus valores de corrente. Os dados utilizados nesta fase formam o *conjunto teste* [12].

Tanto na agricultura como na indústria de alimentos, os métodos de calibração multivariada são usados com dados espectrais para determinar proteínas em trigo [13], em carnes [14] e gordura de peixe [14]. Na indústria manufatureira, estes métodos são freqüentemente usados no monitoramento de processos, incluindo a produção de dispositivos semicondutores [15]. Na área médica, significativo desenvolvimento tem sido alcançado no intuito de produzir reagentes pouco agressivos e instrumentos não invasivos, além do desenvolvimento de metodologias de análises dos componentes do sangue

[16-18]. Muitos outros exemplos podem ser encontrados na revisão bibliográfica feita por Brown et al. [19].

Figura 3. Matriz de dados para calibração multivariada.

Figura 4. Organização dos dados de análise por injeção em fluxo em calibração multivariada.

Geladi et al. [20] fizeram um tratado sobre o PLS, fazendo uma comparação entre a MLR, a PCR e o PLS. Sjöström et al. [21] mostraram a resolução de problemas de calibração multivariada em química analítica, usando o PLS. Pimentel et al. [22] apresentaram um método versátil para análise simultânea multielementar usando detecção com arranjo de fotodiodos e técnicas de calibração multivariadas (PLS e PCR), cujo método foi usado para a determinação de manganês, molibdênio, níquel, crômio e ferro. Saldanha et al. [23] apresentaram uma metodologia para análise multicomponente simultânea por espectrofotometria de absorção molecular ultravioleta-visível que emprega um reagente espectrofotométrico não-seletivo, um espectrofotômetro com arranjo de fotodiodos e calibração multivariada para a determinação simultânea de cinco cátions metálicos (cobalto (II), cobre (II), manganês (II), níquel (II) e zinco (II)).

1.2.1. Regressão Linear Múltipla

Neste método de calibração multivariada assume-se que a concentração do analito é função das respostas instrumentais (variáveis independentes), sendo conhecida como calibração indireta ou inversa. Também existe a calibração clássica, na qual a resposta instrumental é colocada como função da concentração. Uma desvantagem deste método é que o número de variáveis independentes não pode ser maior que o número de misturas de calibração usadas para a análise. Se isso acontecer resultará em um número infinito de soluções, e somente será possível encontrar uma solução reduzindo-se o número de variáveis independentes [11]. Nesse caso a Regressão Linear Múltipla por Passos [24] é uma boa alternativa.

O número de medidas que pode ser usada com MLR é freqüentemente restrito, está normalmente na faixa de 2 – 10, dependendo da complexidade do material a ser analisado. Uma forte correlação nas medidas instrumentais pode introduzir instabilidade nas estimativas do modelo resultante. Em muitos casos é necessário um conhecimento específico de como o analito e os interferentes presentes na amostra afetam as medidas instrumentais. Na ausência de tais informações específicas, há a necessidade de utilizar métodos de seleção empírica [25].

1.2.2. Regressão em Componentes Principais

A PCR é um método de calibração indireto, uma vez que não necessita de um conhecimento individual prévio do comportamento eletroquímico dos constituintes, nem dos interferentes. Este método requer uma análise de uma série de misturas de calibração, cuja composição seja conhecida. Essa calibração deve levar em consideração todos os fenômenos físicos e químicos que podem afetar as características eletroquímicas das amostras cujas concentrações deverão ser previstas. A PCR é baseada na decomposição das matrizes originais em dois conjuntos de fatores lineares denominados de escores e pesos, portanto ele é chamado de um método bilinear [11].

1.2.3. Mínimo Quadrado Parciais

O método dos Mínimos Quadrados Parciais, conhecido como PLS, foi proposto por H. Wold e tem sido utilizado na química para a resolução de problemas de Calibração Multivariada. Assim como a PCR o PLS é um método de calibração indireta e requer a análise de uma série de misturas de calibração com composição conhecida, sendo também considerado um método bilinear. Essa calibração leva em consideração todos os fenômenos físicos e químicos que podem afetar as respostas, além de ser capaz de reduzir a influência das anomalias sobre o conjunto de dados. A regressão PLS difere da PCR por incluir, na determinação das variáveis latentes, informação da matriz das concentrações, e não apenas da matriz dos dados experimentais.

O PLS é considerado por muitos como um método padrão de calibração multivariada, principalmente por causa da qualidade dos modelos de calibração produzidos e pela facilidade de sua implementação devido à disponibilidade de *softwares*. Este método tem sido bastante usado na modelagem de dados em várias técnicas analíticas, tais como: cromatografia, espectroscopia e análises titulométricas.

Diante da variedade dos métodos multivariados disponíveis, não é fácil decidir na prática qual o mais adequado para uma aplicação particular. Entretanto, como em química analítica o objetivo principal da construção de um modelo de calibração é prever propriedades de amostras desconhecidas, o método ótimo pode ser escolhido calculando-se a previsão estatística de cada um deles e optando-se por aquele com menor erro médio de previsão. Um

método estatístico alternativo, largamente utilizado na determinação do número de componentes a incluir no modelo, é a validação cruzada (crossvalidation) [26-28].

1.3. Análise Simultânea Usando Detecção Eletroquímica Multicanal e Calibração Multivariada

Atualmente, o desenvolvimento de sistemas de detecção eletroquímica multicanal tem recebido grande destaque [29-53]. Esta instrumentação apresenta como vantagem sobre os instrumentos com um único detector, o fato de apresentar uma maior seletividade. O potenciostato multicanal está baseado na tecnologia convencional onde cada eletrodo de trabalho possui um eletrodo de referência e um auxiliar resultando numa instrumentação mais complexa [35].

Apesar de pouco comuns, existem descrições na literatura de instrumentos destinados a realizar medições voltamétricas com vários eletrodos (onde cada unidade é operada individualmente) empregados simultaneamente em uma única célula voltamétrica [30, 32, 36-41]. Normalmente, este tipo de instrumento se caracteriza por apresentar um conversor corrente/tensão para cada eletrodo de trabalho e alguns dispositivos eletrônicos, como chaves analógicas, multiplexadores ou conversores analógicos/digitais com entradas multiplexadas, que permitam a leitura individual de corrente proveniente de cada eletrodo. Evidentemente, cada eletrodo de trabalho opera a potenciais diferentes e isto é tradicionalmente obtido com auxílio de um divisor de tensão.

A detecção eletroquímica multicanal está baseada, normalmente, em técnicas amperométricas e coulométricas. Entretanto, os detectores coulométricos estão associados à cromatografia líquida, utilizando o sistema convencional, onde para cada eletrodo de trabalho existe um eletrodo de referência e um auxiliar, o que gera uma instrumentação bastante complexa [34].

Algumas configurações de potenciostatos multicanais têm sido propostas para os estudos eletroquímicos de corrosão [42] e de processos envolvendo transferência de massa [43]. Sistemas de detecção eletroquímica

multicanal para aplicações em análise por injeção em fluxo e HPLC são descritos em um número ainda restrito de publicações [29, 31, 32, 40, 41, 44-47].

Aoki et al. [41] estudaram um arranjo de 16 e 80 canais de detecção, onde cada eletrodo tem seu potencial de operação controlado, independentemente, por meio de um multipotenciostato. O sistema foi aplicado para a análise dos ácidos ascórbico e úrico em amostras de sangue e urina.

Wang e colaboradores [47] desenvolveram um sistema com 4 eletrodos modificados quimicamente para serem usados em fluxo. Entretanto, os eletrodos eram controlados sequencialmente, o que gerava um tempo muito grande de análise.

Fang et al. [32] desenvolveram um potenciostato com 4 canais apresentando um sistema de interface para aquisição e tratamento de dados e uma melhor resolução, quando comparados com os sistemas que já tinham sido estudados. Esse equipamento foi aplicado na determinação de uma mistura de íons metálicos (Cu(II), Pb(II) e Fe(III)) usando FIA, demonstrando as vantagens da detecção multicanal.

Matsue e colaboradores [30, 41] desenvolveram um potenciostato multicanal para se trabalhar simultaneamente com 16 eletrodos de trabalho, entretanto com 80 canais, onde cada eletrodo aplicava cinco potenciais diferentes e independentes. Neste instrumento, para cada eletrodo de trabalho existe um conversor corrente/voltagem. Este sistema produz voltamogramas 3-D (potencial-corrente-tempo). Dentre as aplicações realizadas com este instrumento, vale ressaltar a determinação dos ácidos ascórbico e úrico em urina e sangue usando HPLC com detecção voltamétrica.

Fielden e colaboradores [31] mostraram a possibilidade de se trabalhar com um arranjo de oito microeletrodos de forma independente utilizando um potenciostato multicanal. Este sistema foi utilizado para o monitoramento voltamétrico de misturas de íons metálicos.

Hoogvliet e colaboradores [29] descreveram um sistema de detecção amperométrica multicanal em análise em fluxo, usando um conjunto de 16 eletrodos de trabalho e apenas um par de eletrodos de referência e auxiliar. Entretanto, cada eletrodo de trabalho é controlado por dois canais de

conversão digital/analógico, sendo um dedicado à polarização do eletrodo de trabalho e o outro destinado para controle da corrente de “offsetting”. Para este sistema foi obtida uma resposta linear para epinefrina na faixa de concentração de 10^{-5} a 10^{-9} mol L⁻¹.

Fang e colaboradores [32] desenvolveram um potenciostato de 4 canais para ser usado em detecção amperométrica para sistemas em fluxo. Neste modelo é usado apenas um par de eletrodos auxiliar e referência para todos os canais. Novamente, dois conversores digital/analógico são usados para a polarização do eletrodo de trabalho e o outro destinado para controle da corrente de “offsetting”. O uso de um array de eletrodos facilita a obtenção de informações eletroquímicas tridimensionais em tempo real (corrente-potencial-tempo). Este potenciostato foi posteriormente aplicado para análise de íons metálicos em análise por injeção em fluxo, obtendo respostas lineares para a determinação de íons cobre (II) na faixa de concentração de 100 ppb a 500 ppm [37].

Paeschke e colaboradores [40] idealizaram um sistema de detecção voltamétrica multicanal para análises em fluxo, no qual dois multipotenciostatos foram construídos, um com potenciais fixos e o outro com potenciais ajustáveis. Ambos foram desenvolvidos para trabalhar com 16 eletrodos de trabalho independentes, permitindo ainda realizar, simultaneamente, pulso diferencial e voltametria cíclica. Dois conversores digital/analógico são usados, um para a polarização do eletrodo de trabalho e o outro para controle da corrente de “offsetting”.

Rohwedder et al. [45, 46] construíram um sistema voltamétrico multicanal capaz de monitorar até 31 ultramicroeletrodos, operando em uma célula eletroquímica construída com base no modelo de dois eletrodos, tendo como característica principal a utilização de um único conversor corrente/tensão ligado diretamente ao contra-eletrodo.

O equipamento proposto por Matsue e colaboradores não possui nenhuma flexibilidade para o controle de cada eletrodo de trabalho individualmente. Por outro lado, os potenciostatos multicanais desenvolvidos por Hoogvliet e colaboradores e por Fang e colaboradores são muito complexos, necessitando de dois conversores digital/analógicos de 12 bits para cada eletrodo. Fielden e colaboradores propuseram um equipamento similar ao

proposto por Hoogvliet, no qual o eletrodo de referência foi colocado em terra virtual, resultando em um potenciostato mais simplificado. Neste caso nenhum conversor digital/analógico é necessário para compensar a corrente de “offsetting”.

Devido a uma necessidade cada vez maior de se realizar análises mais sensíveis e rápidas, a capacidade de separar o sinal de interesse do ruído é uma propriedade requerida nos instrumentos de análise. Basicamente, o aumento da razão sinal/ruído tem sido alcançado utilizando dispositivos eletrônicos, tais como filtros analógicos ou através de algoritmos computacionais, muitas vezes denominados de filtros digitais. Outros métodos, envolvendo o tratamento matemático após a obtenção dos dados, também são largamente empregados.

Para amostras envolvendo múltiplos componentes, a utilização de um multipotenciostato pode ser essencial, especialmente nos casos onde processos de oxidação ou redução de duas ou mais espécies se dá em potenciais muito próximos. A associação de diferentes sensores com características distintas é a forma de realizar diretamente a análise, sem a execução de uma separação prévia. Estes diferentes sensores requerem uma calibração com tais constituintes. Como seria de se esperar, quanto maior o número de constituintes maior é o número de ensaios, portanto mais complexa é a resolução do sistema.

O uso de métodos de calibração multivariada para análises simultâneas usando sensores eletroquímicos ainda é muito pequeno, mas já é possível encontrar na literatura dezenas de trabalho que utilizam o método dos mínimos quadrado parciais na resolução de problemas analíticos com esse tipo de sensores, principalmente nas técnicas de voltametria de *stripping* anódico [48-51] e na polarografia de pulso diferencial (PPD) [52-55]. Usualmente, estes métodos de calibração multivariada são aplicados na análise de dados espectrais, onde um número muito grande de trabalhos tem sido publicados, além de algumas revisões bibliográficas.

Martín et al. [52] desenvolveram um método analítico usando PPD e PLS para determinação simultânea de drogas em misturas sintéticas e em preparações farmacêuticas, seus resultados foram comparados com

cromatografia líquida de alta eficiência, onde os erros encontrados estavam abaixo de 10 %.

Herrero et al. [48] apresentam um trabalho no qual a calibração multivariada foi aplicada aos dados de voltametria de *stripping* anódico na determinação de cobre na presença de altas concentrações de ferro. Lindberg et al. [56] demonstraram que esses métodos de calibração também podem ser usados com sensores potenciométricos, na resolução de curvas de titulação ácido-base.

1.4. Microeletrodos

Há duas décadas, Wightman [57] publicou um artigo descrevendo minuciosamente as características peculiares dos eletrodos em escala micrométrica. O conhecimento de tais características ofereceu a oportunidade, dentre outras, do uso da voltametria em meios de alta resistência [58], ou seja, sem a presença de eletrólito suporte em meios orgânicos, de células eletroquímicas com apenas dois eletrodos (onde o eletrodo de referência convencional passou a atuar também como eletrodo auxiliar) [59] e do uso da técnica da voltametria ultra-rápida [60].

Microeletrodos [5] ou ultramicroeletrodos, são definidos como eletrodos que têm pelo menos uma dimensão que é uma função do seu tamanho, o que na prática significa entre 0,1 e 50 μm . A Figura 5 mostra as configurações mais usuais de microeletrodos.

As características dos microeletrodos resultam em propriedades vantajosas frente aos eletrodos convencionais, tais como; (i) alta velocidade no transporte de massa devido à forma esférica da camada de difusão criada ao seu redor, (ii) baixa sensibilidade à queda ôhmica, possibilitando o estudo eletroquímico de sistemas redox em solvente com elevada resistência ou na ausência de eletrólito suporte, (iii) elevada relação corrente faradaica/corrente capacitiva, possibilitando o emprego de microeletrodos em velocidades de varredura maiores que 10 KV.s^{-1} , sem ocorrer significativa distorção na resposta obtida [61].

Diversos trabalhos podem ser encontrados na literatura sobre a aplicação de microeletrodos, entretanto alguns destes trabalhos serão citados no decorrer desta tese. Bond, em uma de suas revisões bibliográficas [62],

apresenta um grande número de aplicações de microeletrodos em técnicas voltamétricas, não só para soluções, mas também em fase gasosa e em estado sólido.

O fato dos microeletrodos apresentarem uma menor queda ôhmica propicia o seu uso em meio orgânico e como detectores em cromatografia [58, 62, 63]. Um exemplo do uso de microeletrodos em meio orgânico é a análise de cobre em água, o qual é determinado voltametricamente após a formação do complexo ditiocarbamato de cobre, o qual é concentrado por extração em tolueno [64].

As reduzidas dimensões dos microeletrodos propiciaram um grande número de aplicações inéditas, dentre as quais a determinação de neurotransmissores a nível cerebral em cobaias [65-69]. Atualmente, a literatura sobre o uso de microeletrodos tem se expandido de maneira significativa, envolvendo principalmente áreas como a bioeletroquímica, o monitoramento de poluentes em sistemas naturais e a eletroquímica de superfícies [61]. Assim, as técnicas mais comumente usadas com microeletrodos são: voltametria cíclica, de redissolução anódica, de pulso normal e diferencial, potenciometria, coulometria e espectroeletroquímica [61].

White et al. [70] e Hsueh et al. [71] realizaram trabalhos onde os eletrodos de escalas micrométricas são usados para fazer voltametria ultrarrápida. Augelli et al. [72] desenvolveram um sistema em fluxo para a determinação de íons cobre (II) em aguardentes de cana usando *arrays* de microeletrodos de ouro associados à técnica de amperometria de pulso reverso.

Devido à alta difusão e aos mínimos efeitos convectivos, alguns autores têm demonstrado que o uso de microeletrodos é vantajoso nos experimentos em estados estacionários [73], no estudo de mecanismos de reações [74], na obtenção de dados de coeficientes de difusão [75], e como detectores em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [76]. Como apresentam uma relação sinal/ruído muito mais favorável que os eletrodos de tamanho convencional [73], os microeletrodos se apresentam como ótimos detectores em sistemas de análise em fluxo.

Figura 5. Principais tipos de geometria empregada para microeletrodos.

A corrente faradaica medida nos microeletrodos depende da maneira pela qual o transporte de massa ocorre. De forma geral, para tempos longos de análise, a resposta de corrente para um microeletrodo é dada pela equação 1.

$$i = n F D A_{\text{microeletrodo}} C_0^{\infty} / r_e \quad (1)$$

onde:

- i = corrente faradaica do microeletrodo (A)
- n = número de elétrons transferidos
- F = constante de Faraday (C mol^{-1})
- D = coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
- $A_{\text{microeletrodo}}$ = área superficial do microeletrodo (cm^2)
- C_0^∞ = concentração do analito no seio da solução (mol cm^{-3})
- r_e = raio de curvatura da superfície do microeletrodo onde a geometria de difusão esférica ideal é assumida (cm)

Assim para um microeletrodo de disco planar, o qual foi utilizado no desenvolvimento deste trabalho, temos $A_{\text{microeletrodo}}$ é dada por πr^2 e r_e é dado por $\pi r/4$. A corrente para este microeletrodo é descrita na equação 2 [77].

$$i = 4 n F D r C_0^\infty \quad (2)$$

onde: r = raio do microeletrodo (cm)

1.5. Eletrodos Modificados

Até início da década de 70, somente eletrodos inertes, tais como Hg, Pt, Au e Carbono eram utilizados em química eletroanalítica. Nesta época se percebeu que a modificação da superfície inerte do eletrodo poderia conduzir à elaboração de vários sensores, para as mais diversas aplicações. Assim, a associação das vantajosas características dos microeletrodos com os processos de modificação de superfícies passou a ser explorada. As mais variadas metodologias bem conhecidas para eletrodos de tamanho convencional, passaram a ser utilizadas, tais como, a modificação eletroquímica de sua superfície por deposição de metais nobres [78-81] (Pd, Pt, Os, Ir, Rh e outros) ou pela utilização de espécies catalíticas como as enzimas e as porfirinas [82-85] ou ainda pela utilização de filmes poliméricos [86].

Modificar um eletrodo consiste em atribuir e controlar novas propriedades físico-químicas de um eletrodo, através do acoplamento de

espécies químicas ativas (ou não) à sua superfície. Num eletrodo modificado, a sua superfície é propositadamente alterada por adsorção, por recobrimento físico, ou pela ligação de espécies específicas. O resultado consiste em bloquear o acesso ao eletrodo, inibindo alguns processos e promovendo outros na sua superfície. A modificação pode, portanto, ser uma ajuda importante na obtenção de maior seletividade. Esta modificação pode ser feita em um conjunto de microeletrodos para produzir sensores químicos com características diferentes. Normalmente, o modificador é eletroativo, agindo como mediador entre a solução e o eletrodo (substrato) na transferência de elétrons [5] (Figura 6).

Figura 6. Modelo de funcionamento de um eletrodo com superfície modificada. Neste caso a redução da espécie O_2 a R_2 ficou inibida pelo modificador.

Há diferentes métodos para a preparação dos diferentes eletrodos modificados: a) Modificação química, quando uma espécie é imobilizada na superfície do eletrodo por uma reação química; b) Adsorção, quando uma solução da espécie modificadora é colocada sobre o eletrodo e deixa-se o solvente evaporar; c) Eletroadsorção, quando se aplica um potencial ao eletrodo por um determinado tempo ocasionando-se a adsorção de espécies de interesse na superfície do eletrodo, a quantidade depositada é função do tempo de deposição, sendo possível à formação de multicamadas [5].

A caracterização de eletrodos modificados pode ser efetuada por métodos eletroquímicos, espectroscópicos e microscópicos. Dos métodos eletroquímicos realça-se a voltametria cíclica, a cronocoulometria e a impedância, que juntos permitem determinar o número de centros redox, a condutividade do filme, a cinética dos processos de eletrodo, etc [5].

Os eletrodos modificados freqüentemente dão origem a correntes que são mais elevadas do que na ausência do modificador. Às vezes, ao colocar o eletrodo modificado numa solução contendo apenas eletrólito suporte, observam-se às características voltamétricas das espécies imobilizadas [5]. Este fato é extremamente útil para diversas aplicações como, por exemplo, em eletrocatalise [87].

Em alguns casos, pode ser feita a modificação do interior em vez da superfície do eletrodo, como nos eletrodos de pasta de carbono. O modificador, uma substância que reage preferencialmente com uma espécie a ser determinada, é misturado diretamente com a pasta de carbono. O modo de reação é por catálise da reação do analito ou por pré-concentração do analito na superfície antes da determinação [88].

1.6. Sensores Eletroquímicos em Química Ambiental

Atualmente, os métodos analíticos usados em laboratórios para análise ambiental envolvem uma grande variedade de métodos ópticos (espectrofotometria e absorção atômica), os diversos tipos de cromatografia (líquida, gasosa e iônica), métodos radiométricos e especialmente métodos eletroanalíticos, dentre eles, a voltametria e a potenciometria com eletrodos de íons seletivos, os quais apresentam grande vantagem no ponto de vista de baixo investimento e custo operacional. Entretanto, nenhum destes métodos é considerado universal, uma vez que alguns são usados na análise de compostos orgânicos e outros na determinação de compostos inorgânicos nas amostras ambientais. Muitas das determinações analíticas na área ambiental envolvem a determinação de substâncias ao nível de traços, freqüentemente, ppb (parte por bilhão). Portanto, um método analítico para ser aplicado na área ambiental deve apresentar como características; elevada sensibilidade, precisão, exatidão e seletividade [89].

Os sensores eletroquímicos geralmente satisfazem completamente os critérios citados no parágrafo anterior além de possuírem a vantagem de baixo custo, sendo extensamente usados na análise de águas, substâncias presentes na atmosfera, no solo, etc. Alguns outros métodos apresentam maior sensibilidade, entretanto o elevado custo instrumental e de análise fazem com que os mesmos não sejam usados freqüentemente. Virtualmente, todos os métodos eletroanalíticos podem ser usados na análise ambiental, dependendo da natureza da substância determinante e da matriz. Os principais métodos usados são polarografia, potenciometria, coulometria e condutometria [89].

A Tabela 1 apresenta, resumidamente, algumas técnicas usadas na análise ambiental, com suas respectivas sensibilidades. A cromatografia gasosa não foi incluída, por depender da técnica de detecção usada [89].

Dos métodos polarográficos, a polarografia de pulso diferencial (DPP) é o mais usual em Química Ambiental, principalmente por causa da sua alta sensibilidade e por este método permitir a análise das mesmas substâncias determinadas pela polarografia convencional. Um outro método polarográfico para determinação de traços é a polarografia de onda-quadrada, sendo usado principalmente na determinação de íons de metais pesados.

Para a determinação de metais pesados em amostras ambientais, a voltametria por redissolução anódica ou *stripping* pode ser usada. Esta técnica é muito sensível e capaz de quantificar espécies em níveis de ppt (partes por trilhão), podendo ser combinada com sistemas em fluxo [90]. A análise por *stripping* envolve duas etapas. Durante a primeira etapa, o analito é eletroliticamente depositado sobre a superfície do eletrodo, num potencial de trabalho constante. A segunda etapa consiste na redissolução das espécies depositadas na superfície do eletrodo e o sinal de corrente gerado é usado para determinar a concentração do analito na amostra. A instrumentação é relativamente simples e permite determinar um grande número de cátions metálicos e alguns ânions. Diversos artigos podem ser encontrados na literatura usando esta técnica na análise de íons em diferentes tipos de amostras ambientais, tais como; água de chuva, rios, lagos, oceanos, solos, etc.

Tabela 1. Faixa de aplicabilidade dos métodos analíticos mais comuns [89].

Método	Faixa de Aplicabilidade (mol L^{-1})
Titrimetria	$10^{-2} - 10^{-6}$
Espectrometria de Absorção Molecular	$10^{-5} - 10^{-6}$
Fluorescência	$10^{-7} - 10^{-8}$
Espectrometria de Absorção Atômica	$10^{-6} - 10^{-7}$
Potenciometria com Eletrodo de Íon Seletivo	$10^{-2} - 10^{-7}$
Polarografia	$10^{-5} - 10^{-6}$
Voltametria de Pulso Diferencial e de Onda Quadrada	$10^{-7} - 10^{-8}$
Voltametria de <i>Stripping</i> Anódico com Eletrodo de Gota de Mercúrio	$10^{-7} - 10^{-9}$
Voltametria de <i>Stripping</i> Anódico com Eletrodo Sólido ou Eletrodo de Filme de Mercúrio	$10^{-9} - 10^{-10}$

A voltametria com potencial constante também é uma técnica que está sendo bastante usada na análise ambiental, principalmente, no monitoramento de SO_2 , H_2S , CO e NO_x . Sendo que, em alguns casos existe a necessidade de fazer modificações na superfície dos eletrodos, deixando-os sensíveis às espécies de interesse [89].

Com relação aos sensores potenciométricos, do ponto de vista ambiental, apresentam como grande vantagem os eletrodos de íons seletivos, com os quais é possível o monitoramento da atividade de íons em solução (água). Uma das mais importantes medidas destes sensores na análise ambiental são as medidas de pH, as quais são realizadas com eletrodos de vidro. Várias substâncias podem ser monitoradas usando eletrodo de íon seletivo, dentre elas; F^- , I^- , Br^- , Cl^- , CN^- , SCN^- , NO_3^- , NO_2^- , ClO_4^- , S^{2-} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} . Estes eletrodos podem ser usados para quantificar estes íons na faixa de 10^{-2} a 10^{-7} mol L^{-1} . Na literatura também são encontrados eletrodos de íon seletivo para análise de compostos orgânicos. As medidas usando estes eletrodos são consideradas rápidas, simples e de grande

aplicabilidade para monitoramento contínuo. Estes sensores também podem ser usados para determinar potencial redox de águas [89].

Os sensores condutométricos são baseados na medida de condutância dos íons presentes em solução. Exemplos típicos do uso deste sensor na análise ambiental são: análise de detergentes em águas, determinação de fertilizantes sintéticos em água de irrigação, na medição da qualidade da água, etc. A análise condutométrica também tem sido usada no monitoramento de poluentes atmosféricos, como por exemplo, SO_2 e H_2SO_4 . Uma outra aplicação destes sensores é como detector em cromatografia líquida e eletroforese capilar [89].

Os processos eletroquímicos também podem ser usados no tratamento de águas e efluentes industriais [5]. Sendo que o procedimento mais óbvio envolve a remoção de componentes iônicos de águas por aplicação de um potencial apropriado. Esta metodologia é usada para remover metais de efluentes industriais e freqüentemente conduzir à sua recuperação, podendo os mesmos serem reutilizados. Entretanto, se faz necessário o uso de células que favoreçam a elevada relação área superficial do eletrodo/volume de solução. Já na etapa de remoção dos poluentes orgânicos dos efluentes industriais e dos esgotos, dois procedimentos podem ser utilizados. No primeiro, oxidantes são gerados eletroquimicamente *in situ*, como; peróxido de hidrogênio, ozônio e hipoclorito ou cloro. No segundo, pode ser usada a produção de bolhas de gás no fundo de tanques através dos quais o efluente entra lentamente, as bolhas de gás levam a matéria suspensa com elas para a superfície onde é feito o processo de remoção mecânica, também conhecido como eletroflotação, existe também a possibilidade do uso de agentes floclulantes adicionados por dissolução controlada do ânodo, para isso são utilizados ânodos como o alumínio ou o ferro, sendo este processo chamado de eletrofloculação [5].

Capítulo 2

OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

A crescente demanda de análises químicas e a necessidade de monitoramento contínuo de numerosos processos tem direcionado estudos no sentido de buscar sensores que reúnam características tais como: alta sensibilidade, rapidez de resposta, seletividade, baixo custo, entre outras.

A busca de novos sensores eletroquímicos é uma das áreas de grande atividade, e os avanços alcançados têm sido muito significativos. O desenvolvimento de diversos aspectos dos microeletrodos, eletrodos modificados e de biossensores (e a utilização simultânea de mais de uma destas propriedades) tem possibilitado a resolução rápida, simples e com baixo custo de numerosos problemas analíticos.

A grande maioria dos sensores até aqui desenvolvidos destinam-se a análise de um analito apenas. A obtenção de matrizes (*arrays*) de microeletrodos capazes de detectar simultaneamente diversas espécies em uma mesma amostra é altamente desejável.

Com base nos comentários anteriores surgiu a necessidade do desenvolvimento deste trabalho que apresenta como principais objetivos:

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto foi estudar a potencialidade dos microeletrodos de ouro modificados por diferentes materiais e sua utilização em novas metodologias para análises simultâneas de amostras complexas envolvendo sistemas mecanizados. As principais matrizes exploradas foram: águas de chuvas, onde é de grande importância o monitoramento temporal de espécies reativas, em especial peróxido de hidrogênio e preparações farmacêuticas, onde se pretendeu analisar até quatro analitos simultaneamente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar a modificação de microeletrodos de ouro com material enzimático e com metais nobres, individualmente e simultaneamente.
2. Obtenção de matrizes de microeletrodos com características capazes de realizar multi-especificação em amostras complexas.
3. Desenvolvimento de metodologias analíticas usando os microeletrodos modificados individualmente associados a métodos de análise por injeção em fluxo.

No presente trabalho foi dada ênfase ao desenvolvimento de metodologias analíticas empregando calibração multivariada, microeletrodos de ouro modificados por diferentes materiais, biossensores, análise ambiental e análises simultâneas. Este trabalho será apresentado nos próximos capítulos e está dividido em três etapas com objetivos e aplicações diferenciadas.

Na primeira etapa será apresentada uma metodologia desenvolvida para a análise de multicomponentes empregando quatro microeletrodos de composições diferentes e detecção multicanal, sendo usada para determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina, dipirona e epinefrina. Foi explorada a região de potencial de 200 a 800 mV com o uso de um multipotenciostato desenvolvido durante o mestrado sob a orientação do Prof. Dr. Claudimir L. do Lago [34], onde os analitos apresentam suas ondas de oxidação. Como parte desta metodologia, foi proposto um critério para a seleção do melhor potencial de trabalho para a determinação simultânea dos analitos em misturas, sendo utilizada a regressão linear múltipla e a regressão por mínimos quadrados parciais como métodos de calibração multivariada [91].

Na segunda etapa deste trabalho procurou-se buscar uma aplicação destes sensores eletroquímicos na área da Química Ambiental. Para isso foi proposta a determinação de peróxido de hidrogênio em amostras de águas de chuvas na região metropolitana de São Paulo, usando microeletrodo de ouro modificado com platina e detecção amperométrica em fluxo, a partir de uma nova forma de imobilização enzimática sobre resinas (Amberlite IRA – 743) [92].

A terceira etapa apresentará um método para determinação simultânea de glicose e ácido úrico, usando biossensores amperométricos a partir da modificação de microeletrodos de ouro com platina / glicose oxidase e detecção multicanal.

Outros trabalhos foram desenvolvidos na forma de co-orientação, entretanto empregando agora eletrodos de ouro obtidos a partir de *compact discs* (CDs - graváveis) para análise de compostos de interesse farmacêutico, tais como: ácido ascórbico e dipirona [93-94].

Capítulo 3

MICROELETRODOS MODIFICADOS E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA SIMULTÂNEA EM FLUXO DE ÁCIDO ASCÓRBICO, DOPAMINA, EPINEFRINA E DAPIRONA

3.1. Introdução

A maioria dos potenciostatos comerciais utilizam um sistema dotado de um único eletrodo de trabalho e uma variável que é o potencial aplicado. Assim quando se deseja determinar um analito numa amostra complexa faz-se necessário o uso de uma etapa preliminar de separação. Esta desvantagem, como já foi citada no capítulo 1, pode ser contornada com o uso de eletrodos modificados, permitindo ao analista um controle da reatividade na interface eletrodo/solução. Este controle pode ser feito de dois modos distintos, pelo uso de membranas seletivas ou pela imobilização de catalisadores quimicamente ativos (eletrodeposição, adsorção ou por reações químicas), os quais são capazes de antecipar e/ou melhorar o sinal analítico [95].

Os usos de modificadores alteram algumas propriedades do eletrodo, tais como, área superficial [96], carga [97], ou polaridade [98], o que tem gerado um significativo desenvolvimento em áreas como: monitoramento *in vivo* de neurotransmissores [99], detecção amperométrica para cromatografia líquida ou sistemas de análise em fluxo [96, 97], sensores enzimáticos e não enzimáticos [100], e na detecção de traços de metais por *stripping* [101]. Um número notável de catalisadores quimicamente ativos tem sido usado (virtualmente qualquer par redox pode ser explorado) e pesquisas nesta área estão crescendo de forma acentuada nos últimos anos. O tamanho e a complexidade destes catalisadores podem variar de um único átomo eletrodepositado (ou seu óxido) [78], moléculas grandes (porfirinas) [85] ou macromoléculas (enzimas) [102]. Em alguns casos, a combinação de dois ou mais tipos de catalisadores ou até mesmo a associação de um catalisador e uma membrana com propriedades discriminativas podem ser vantajosas. A estabilidade e a facilidade de preparação de eletrodos (especialmente microeletrodos) modificados por eletrodeposição de metais nobres faz deste modo de modificação uma atraente forma de desenvolvimento de sensores.

A associação da detecção amperométrica e eletrodos modificados com métodos de calibração multivariada eliminam a necessidade de separações prévias. Como já citados anteriormente, os métodos de calibração multivariada mais usados são MLR, PCR e PLS [9]. Estes métodos constituem numa poderosa ferramenta estatística na análise simultânea de múltiplos componentes em misturas complexas.

A calibração multivariada envolve vários passos para a preparação das misturas e sua implementação é muito demorada quando executadas por procedimentos manuais. A análise de injeção em fluxo é uma excelente ferramenta para superar esta desvantagem. Usando registros multivariados dos sinais analíticos e aplicando a calibração multivariada, a utilidade da técnica de injeção em fluxo pode ser expandida para oferecer possibilidades de determinações de multicomponentes, eliminação de interferentes e a descoberta de amostras anômalas.

No presente capítulo, um método versátil para determinação amperométrica simultânea de múltiplos componentes será descrito. Esta metodologia é baseada num sistema de detecção multicanal acoplada a uma célula de injeção em fluxo contendo um conjunto de microeletrodos modificados. As técnicas de calibração multivariada MLR e PLS foram utilizadas na análise dos resultados experimentais. Uma matriz de 16 diferentes soluções, todas contendo ácido ascórbico (AA), dopamina (DA), epinefrina (EP) e dipirona (DI) foram usadas para a calibração dos eletrodos e na análise de misturas sintéticas. A análise amperométrica de preparações farmacêuticas contendo ácido ascórbico e dipirona foi executada e os resultados comparados com os obtidos pelo método iodométrico clássico [103].

3.1.1. Ácido Ascórbico

Ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C é encontrado em diversas fontes naturais. Sua determinação recebeu grande atenção na química analítica devido ao seu uso em refrigerantes, alimentação e drogas [104]. Também é importante a sua determinação clinicamente em sangue, urina [105] e tecidos.

O ácido ascórbico é um ácido com valores de pK_a de 4,17 e 11,5. Em soluções biológicas com pH neutro ele está presente sobre a forma do ânion ascorbato monohidrogênio. O ácido ascórbico/ascorbato é um componente vital na dieta dos seres humanos, fazendo parte de várias reações biológicas. O ascorbato é um antioxidante no plasma sanguíneo e está presente no cérebro dos mamíferos na presença de vários neurotransmissores, incluindo a dopamina. O ácido ascórbico é encontrado em altas concentrações em frutas e alimentos [106].

Para a determinação de ácido ascórbico vários métodos analíticos têm sido propostos como: polarografia [107], voltametria [108], fluorimetria [109], métodos enzimáticos [110], cromatografia [111], titrimetria [112] e espectrofotometria [113]. Cada um com suas vantagens e desvantagens. Nos últimos anos a determinação de ácido ascórbico usando sistemas de análise por injeção em fluxo tem sido proposto com detecção espectrofotométrica [114] e amperométrica [104, 105]. Recentemente, um método eletroanalítico indireto para determinação simultânea dos ácidos ascórbico e dehidroascórbico com baixos limites de detecção foi descrito [115]. Os métodos eletroanalíticos apresentam uma boa sensibilidade e podem ser aplicados na determinação de ácido ascórbico em matrizes coloridas. A oxidação eletroquímica do ácido ascórbico (I) gera o ácido dehidroascórbico (II), com a perda de dois elétrons e conseqüentemente íons hidrogênio, como pode ser evidenciado no Esquema 1.

Esquema 1. Reação de oxidação do ácido ascórbico.

O método titrimétrico, ainda utilizado e recomendado pela Farmacopéia Brasileira como método oficial para a quantificação de vitamina C em formulações farmacêuticas usa iodo como agente titulante [103]. As principais fontes de erros e limitações dos métodos convencionais estão principalmente no uso de indicadores, na localização do ponto final e complexidade das reações envolvidas. Deste modo, a procura por métodos alternativos para o ensaio desta droga se tornou de grande importância.

Atualmente, existe uma necessidade de um método rápido, barato e seletivo, especialmente para análise de controle de qualidade de produtos farmacêuticos contendo ácido ascórbico. Uma maneira de resolver este

problema é recorrer à análise eletroquímica de ácido ascórbico, associada à utilização de eletrodos modificados, que favoreçam a eletrocatalise e antecipem o potencial de oxidação do analito [104, 116, 117]. Matos e colaboradores [104] desenvolveram um método amperométrico diferencial para a determinação de ácido ascórbico em sucos e medicamentos usando microeletrodos de ouro modificados com paládio.

3.1.2. Dopamina

A dopamina é um dos principais neurotransmissores, possuindo várias atividades eletroquímicas, sendo de grande interesse na química eletroanalítica dos neurotransmissores. Sua determinação por técnicas eletroquímicas tem despertado grande atenção da comunidade científica [118-122].

O maior problema encontrado para a quantificação da dopamina a nível celular é a interferência do ácido ascórbico, cujo potencial de oxidação é similar, e encontra-se em proporção 100 a 1000 vezes maior que a dopamina. Assim, o desenvolvimento de técnicas de monitoramento seletivo deste neurotransmissor tem sido o foco de muitas pesquisas. Pré-tratamento eletroquímico [123], reações enzimáticas [120, 124], eletrodos modificados quimicamente [125], voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, etc, tem sido mencionadas na literatura como possíveis técnicas a serem utilizadas para contornar a interferência do ácido ascórbico. A separação dos picos de corrente referentes à oxidação da dopamina e do ácido ascórbico é usualmente menor que 200 mV. O emprego de técnicas de calibração multivariada se constitui em poderosa ferramenta para auxiliar a resolução deste problema.

Alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura que descrevem a determinação da dopamina em presença de ácido ascórbico [120, 123-125]. Gonon et al. [126] desenvolveram um método para determinação de dopamina em tecido cerebral pelo tratamento eletroquímico de eletrodos de carbono pirolítico. Nagy et al. [127] demonstraram o uso de microeletrodos de grafite revestido por Náfon para determinação de dopamina, nor-epinefrina e do 5-hidroxitriptamina. Malem e Mandler [128] descreveram o uso de eletrodos de ouro modificados com mercaptanas para determinar dopamina em presença de altas concentrações de ácido ascórbico. Pournaghi-Azar et al. [106]

investigaram a utilização de derivados do ferroceno como mediadores na catálise oxidativa do ácido ascórbico em presença de dopamina.

A dopamina (I) ($pK_b = 8,87$) é rapidamente oxidada a dopaminoquinona (II) em uma reação de transferência de elétrons quase-reversível, conforme Esquema 2. Sendo esta corrente de oxidação limitada pelo processo de difusão do soluto na solução. Quando a concentração do eletrólito suporte é 50 vezes maior que a concentração do analito em questão podemos afirmar que o processo de migração é praticamente inexistente. De acordo com a reação abaixo, podemos concluir que em meio ácido a oxidação da dopamina apresenta características de não-reversibilidade, enquanto que em pH próximo de 7, ou seja, meio neutro, a reação de transferência de elétrons se apresenta quase-reversível. Neste meio a dopaminoquinona é transformada no correspondente aminocromo (III), o qual pode reagir rapidamente com a dopaminoquinona produzindo a dopamina [129].

Esquema 2. Reações de oxidação da dopamina.

3.1.3. Epinefrina

A epinefrina ou adrenalina é um hormônio da família das catecolaminas, a qual é excretada pelas glândulas supra-renais juntamente com a nor-epinefrina. Ela foi primeiramente isolada em 1901 por Takamine e Aldrich, e foi sintetizada em 1904 por Stolz e Dalkin. Ela é sintetizada naturalmente no

sangue pela L-tyrosina através da ação de diferentes enzimas. Cerca de 50 % deste hormônio é eliminado pela urina [130].

A epinefrina é um importante composto no sistema nervoso central dos mamíferos, existindo como um cátion orgânico nos tecidos e fluídos biológicos. Muitas doenças estão relacionadas com a variação de sua concentração e, deste modo, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias quantitativas para a análise de traços de EP estudando-se a sua função fisiológica e no diagnóstico de algumas doenças na área da medicina clínica. Usualmente, a determinação de EP é realizada por cromatografia líquida [131], espectrofotometria [132], eletroforese capilar [133] e fluorescência [134]. A epinefrina é uma molécula eletroativa e suas propriedades eletroquímicas têm sido estudadas e alguns métodos têm sido propostos com base em métodos voltamétricos [130, 135]. Um grande problema é a sua determinação em amostras onde coexistam espécies eletroativas, tais como, ácido ascórbico e ácido úrico. Como o ácido ascórbico, em fluídos biológicos, encontra-se em concentrações muito altas, ele apresenta um problema muito sério de interferência na determinação quantitativa da epinefrina.

Alguns trabalhos da literatura descrevem a utilização de eletrodos modificados para contornar as interferências [91, 135]. Uma das modificações mais exploradas é com Nafion, o qual repele o AA e outras espécies carregadas negativamente. Entretanto, estes métodos apresentam desvantagens como baixa sensibilidade e estreita faixa linear de trabalho. Assim, o desenvolvimento de outros eletrodos modificados com diferentes materiais para a determinação de epinefrina se faz necessário.

A epinefrina (I) é facilmente oxidada, segundo mecanismo proposto por alguns autores, à sua respectiva quinona (II), com a perda de dois elétrons e conseqüentemente íons hidrogênio, de acordo com Esquema 3 [130].

Esquema 3. Reação de oxidação da epinefrina.

3.1.4. Dipirona

Desde a sua síntese, a dipirona (1-fenil-2,3-dimetil-4-metilaminometano sulfonato-5-pirazolone) vem sendo freqüentemente usada como analgésico e antipirético. Ao lado de interessantes propriedades terapêuticas, apresenta algumas reações indesejáveis. A Organização Mundial da saúde alerta para os riscos do emprego deste produto, já que pode causar graves efeitos colaterais, principalmente agranulocitose e outras discrasias sangüíneas. Esta droga é freqüentemente usada em alguns países, entretanto em outros (Estados Unidos e Suécia) seu uso tem sido banido ou restringido devido aos riscos de efeitos colaterais [136].

Na terapêutica, a dipirona é empregada em dose usual de 500 mg, administrada oralmente três ou quatro vezes ao dia. Pode ser administrada por via subcutânea ou intramuscular em doses de 0,5 a 2,0 mL de solução a 50 % [136].

A dipirona devido a seu uso difundido mundialmente é conhecida por pelo menos vinte diferentes nomes, entre comerciais e químicos (novalgina, metamizol, etc). É prática comum a associação da dipirona com outras substâncias, tais como, aminofenazona, salicilamida, fenilbutazona, papaverina, cafeína, fenobarbital, anti-histamínicos, ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico.

No Brasil, a dipirona é muito utilizada, sendo componente de um número considerável de preparações farmacêuticas sob diversas formas, tais como, injetáveis, gotas e comprimidos. Medicamentos contendo dipirona como único princípio ativo ou associado a outros fármacos atingem cerca de setenta produtos.

As presenças de várias substâncias a ela associada provocam a necessidade de métodos cada vez mais específicos, para que as interferências não prejudiquem na sua quantificação.

Devido a sua importância, vários trabalhos têm sido realizados para sua detecção e quantificação. Diversas outras técnicas podem ser encontradas na literatura para a determinação de dipirona, dentre elas; polarografia [137], coulometria [138], cromatografia líquida [139], e espectrofotometria [140].

O método mais empregado para a análise de dipirona é o iodométrico, que se apóia na capacidade de todos os derivados da pirazolona de reagirem

com o iodo. O primeiro trabalho sobre a utilização do método iodométrico data de 1898, quando Bougault [141] o descreveu para a fenazona, explicando que esta absorve uma molécula de iodo, quando em solução alcóolica e na presença de cloreto de mercúrio.

São vários os trabalhos em que o doseamento iodométrico é utilizado para a determinação da dipirona pura ou em formulações farmacêuticas. Entre eles, o de Rapaport e Shvartsburd [142], que dissolveram a dipirona em água, titulando-a com iodo e usando o azul de metileno como indicador. A Farmacopéia Brasileira [103] propõe o método que foi utilizado como método de comparação dos resultados obtidos no decorrer deste trabalho, no qual a dipirona é dissolvida em água e titulada com o iodo em meio de ácido clorídrico $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, usando como indicador o amido. O Esquema 4 mostra a fórmula estrutural da dipirona (I).

(I)

Esquema 4. Fórmula estrutural da dipirona.

3.2. Materiais e Métodos

Este item tem o objetivo de fornecer informações quanto aos materiais e a instrumentação usada para o desenvolvimento deste trabalho.

3.2.1. Reagentes e Soluções

Todas as soluções utilizadas nos experimentos foram preparadas com água deionizada obtida do sistema Nanopure da Barnsted e os reagentes usados foram de grau analítico. Ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). O ácido monocloroacético $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,8) usado como eletrólito suporte foi obtido

da Merck (Darmstadt, Germany). Todas as soluções foram preparadas momentos antes das análises.

As amostras de formulações farmacêuticas usadas neste trabalho (Apracur, Magnopyrol, Benegrip e Anador) foram adquiridas em drogarias da cidade de São Paulo. As amostras em forma de tablete foram finamente pulverizadas com o auxílio de um almofariz e uma porção foi dissolvida em eletrólito suporte.

As amostras de medicamentos analisadas foram dissolvidas em 100 mL de eletrólito e depois foram diluídas adequadamente para a análise amperométrica de ácido ascórbico e dipirona em quatro medicamentos diferentes, de acordo com a Tabela 2. Para as análises por volumetria de oxi-redução não foi feito nenhum tipo de diluição da amostra.

Tabela 2. Concentração de ácido ascórbico e dipirona nas amostras de medicamentos em $\mu\text{g g}^{-1}$.

Amostras	Concentração / $\mu\text{g g}^{-1}$		Fator de diluição
	Ácido Ascórbico	Dipirona	
Apracur	1,75	3,50	285
Magnopyrol	-	6,67	750
Benegrip	3,98	-	750
Anador	-	6.67	750

A solução de iodo usada na volumetria de oxi-redução foi preparada dissolvendo-se 36 g de iodeto de potássio puro em 100 mL de água e adicionando 12,7 g de iodo puro e diluindo-se com água deionizada para 1 litro. A padronização da solução de iodo foi feita com óxido de arsênio usando como indicador uma solução de amido ($1 \text{ mL de As}_2\text{O}_3 \text{ } 0,05 \text{ mol L}^{-1} = 12,7 \text{ mg de Iodo}$) [103].

3.2.2. Eletrodos e Célula em Fluxo

Durante todo esse trabalho foi usado um sistema convencional de três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar.

O eletrodo de trabalho consistiu de um *array* de microeletrodos de ouro constituídos de 24 unidades obtidas pela remoção do material polimérico do topo de um circuito integrado convencional (chip). O contato entre os pinos do circuito integrado e a pastilha de silício é feito por micro-fios de ouro com diâmetros na faixa de 20 a 30 μm . Ao lixar a parte superior até o afloramento e ruptura dos filamentos de ouro, conforme Figura 7A e 7B, obtém-se o *array* de microeletrodos. Esses micro-fios de ouro apresentam pureza de 99,99 %, contendo pequenas quantidade de prata e cobre. O microeletrodo resultante apresenta uma geometria elíptica, tipicamente com 25 μm para o menor diâmetro e 30 - 80 μm para o maior diâmetro [143].

Os microeletrodos foram modificados pela eletrodeposição de paládio, platina e uma mistura equimolar de paládio e platina presentes numa solução de Na_2PdCl_4 e K_2PtCl_6 (2 mmol L^{-1} e pH 4,8), num potencial de -1,00 V por um tempo de 15 minutos [104]. Estes microeletrodos após a modificação se mostraram estáveis por pelo menos 8 dias de uso intenso. Como eletrodo de referência foi usado um eletrodo miniaturizado de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat.})}$ construído em nosso laboratório [144] e como eletrodo auxiliar foi usado uma agulha de aço inoxidável, posicionada na saída da célula. Momentos antes de realizar a modificação da superfície, os microeletrodos foram polidos com alumina de 3 e de 0,05 μm e, após cada polimento, os microeletrodos foram submetidos a tratamento com ultrassom por 5 minutos.

A célula eletroquímica utilizada para análises amperométricas em fluxo é constituída pelos componentes mostrados na Figura 8A. Na Figura 8B observa-se a célula montada e pronta para ser colocada no sistema FIA, onde a solução flui por um canal no bloco de acrílico e entra em contato com os microeletrodos passando, posteriormente, pelos eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente.

Figura 7. Microeletrodos de ouro (A) antes e (B) após rompimento dos fios.

Figura 8. (A) Célula eletroquímica desmontada para os testes amperométricos, (a) tampa de acrílico, (b) eletrodo auxiliar, (c) eletrodo de referência, (d) espaçador de polietileno, (e) microeletrodos de ouro, (f) soquete, (g) suporte inferior de acrílico. (B) Célula eletroquímica fixada com grampo sargento.

3.2.3. Instrumentação

Os estudos amperométricos foram realizados com um multipotenciostato que foi construído para o controle independente de quatro eletrodos de trabalho, com um par de eletrodos referência e auxiliar, envolvendo somente um conversor digital/analógico. Ele é composto de 4 potenciostatos interconectados como mostrado na Figura 9. No amplificador operacional "A" estão ligados os eletrodos auxiliar e referência, sendo que este último é colocado em terra virtual. O potencial que é aplicado pelo eletrodo de trabalho (V_W), bem como suas correntes (I_W) são monitoradas por um conversor analógico/digital com 8 canais de entrada. Foi usada uma placa de interface PCL-711B para o controle dos conversores analógico/digital e digital/analógico de 12 bits. O potencial aplicado pelo eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência é controlado pela Unidade de Controle de Potencial (UCP), circuito este construído paralelamente ao multipotenciostato, possibilitando o controle destes potenciais via *software* [34].

O *software* foi desenvolvido em Turbo Pascal 6.0 para a aquisição de dados do sistema FIA. O potencial, a corrente e o tempo para cada eletrodo de trabalho é armazenado num arquivo de dados.

Figura 9. Esquema simplificado do multipotenciostato [34].

No sistema FIA a alça de amostragem com capacidade de 100 μ L foi preenchida com auxílio de uma bomba peristáltica da Ismatec (MS REGLO). O eletrólito foi carregado por gravidade evitando a pulsação da bomba no fluído carreador. Tubos de Teflon de 0,5 mm de diâmetro interno foram utilizados. O direcionamento dos diversos fluxos foi feito com o auxílio de válvulas solenóides de 3 vias (COLE – PARMER) controlado por microcomputador. Todas as medidas foram feitas em temperatura ambiente de 25 °C. Uma representação esquemática do sistema FIA pode ser visto na Figura 10.

Figura 10. Diagrama esquemático mostrando o arranjo experimental dos estudos baseados em FIA: A, eletrólito; B, alça de amostragem; C, célula eletroquímica; D, descarte; E, multipotenciostato; F, microcomputador; G, bomba peristáltica; H, descarte.

3.2.4. Planejamento da Calibração

3.2.4.1. Misturas de Calibração

Para definir a composição das misturas a serem usadas na calibração utilizou-se um planejamento fatorial de 2^4 , cujo algoritmo especifica dezesseis combinações diferentes de concentrações dos níveis extremos. Desse modo, dezesseis misturas compõem a série de calibração ou de treinamento.

As faixas lineares de concentração adotadas, baseadas em estudos anteriores, para os quatro analitos são apresentadas na Tabela 3. Alguns ajustes das concentrações calculadas foram ainda necessários para simplificar a preparação das misturas de calibração. A Tabela 4 apresenta a composição das matrizes de calibração. As soluções foram preparadas por pesagem direta das quantidades requeridas de cada componente para cada mistura.

Tabela 3. Intervalo em que as correntes de oxidação variam linearmente com a concentração dos analitos, individualmente.

Analito	Faixa de Concentração / $\mu\text{g g}^{-1}$
Ácido Ascórbico	0,88 a 8,80
Dopamina	0,95 a 9,50
Epinefrina	1,09 a 10,9
Dipirona	1,67 a 16,7

3.2.4.2. Misturas de Teste

O conjunto de misturas de teste usado para a validação dos modelos foi construído aleatoriamente, dentro das faixas de concentração do conjunto de calibração, de acordo com o seguinte procedimento:

1. Para cada um dos quatro analitos de interesse, tomou-se a respectiva faixa de concentração da série de calibração e dividiu-se pelo número de sete, obtendo-se para cada analito sete valores igualmente espaçados.
2. Para cada analito, os dois pontos extremos obtidos na etapa 1 foram desprezados, restando assim cinco concentrações de trabalho.

3. Cinco misturas de teste foram definidas escolhendo-se, aleatoriamente, para cada analito, uma das cinco concentrações intermediárias obtidas nas etapas anteriores. As cinco combinações resultantes são mostradas na Tabela 5. As misturas F e G são repetições autênticas da mistura C.

Tabela 4. Matriz de calibração. As concentrações são expressas em $\mu\text{g g}^{-1}$.

Mistura	Ácido Ascórbico	Dopamina	Epinefrina	Dipirona
1	0,93	1,03	1,15	1,73
2	0,93	1,01	1,13	16,9
3	0,86	1,02	11,1	1,71
4	0,92	9,93	1,18	1,72
5	9,29	1,01	1,15	1,76
6	0,93	0,83	11,1	17,2
7	0,96	10,1	1,15	17,4
8	9,39	1,02	1,11	17,0
9	0,93	10,1	11,1	1,75
10	9,25	1,04	11,2	1,68
11	9,33	10,0	1,15	1,65
12	0,89	9,99	11,2	17,5
13	9,28	1,05	11,4	17,1
14	9,25	9,84	1,23	17,0
15	9,22	10,2	11,2	1,76
16	9,18	10,0	10,8	17,4

Tabela 5. Matriz de teste. As concentrações são expressas em $\mu\text{g g}^{-1}$. As misturas F e G são repetições autênticas da mistura C. Os valores entre parênteses referem-se a uma outra matriz teste. As análises destas matrizes foram realizadas em dias diferentes.

Mistura	Ácido Ascórbico	Dopamina	Epinefrina	Dipirona
A	6,0 (5,7)	2,8 (3,0)	8,7 (7,8)	9,4 (8,6)
B	4,0 (3,9)	2,9 (3,0)	7,3 (6,7)	11 (12)
C	6,0 (5,5)	6,6 (7,0)	9,7 (8,9)	3,4 (3,4)
D	4,9 (4,6)	3,8 (4,0)	11 (10)	3,3 (3,4)
E	4,9 (4,6)	7,5 (7,9)	2,5 (2,4)	10 (10)
F	6,0 (5,5)	6,5 (6,9)	9,7 (8,9)	3,4 (3,5)
G	5,9 (5,5)	6,6 (6,9)	9,8 (8,9)	3,4 (3,4)

3.3. Ajuste e Validação dos Modelos Estatísticos

Neste item são apresentados os métodos de ajuste e validação dos modelos empregados. O ajuste compreende o pré-tratamento dos dados e a calibração propriamente dita, que resulta no modelo final a ser adotado. A validação compara os resultados estimados pelo modelo com os respectivos valores considerados verdadeiros. Na etapa de pré-tratamento, foram selecionados os potenciais de trabalho mais informativos para a modelagem e foram estudados os efeitos de interação entre os analitos, já na etapa de validação dos modelos foram estimadas as concentrações dos constituintes das misturas que compõem a série de teste.

3.3.1. Análises Voltamétricas

Eletrodos de ouro geralmente sofrem oxidação em potenciais anódicos superiores a + 0,75 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$). A deposição de metais nobres sobre microeletrodos de ouro se constitui em uma forma simples e prática de ampliar a faixa de trabalho destes sensores, bem como de catalisar a oxidação de diversas espécies.

A Figura 11 compara os voltamogramas cíclicos obtidos com um microeletrodo de ouro limpo (a) e modificado com paládio (b), platina (c) e paládio+platina (d). Pode ser observado um aumento no sinal de corrente e um decréscimo no valor de potencial de oxidação quando os microeletrodos são

modificados. Todos os voltamogramas foram realizados com os analitos na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Parte do incremento na corrente de oxidação das espécies estudadas pode ser atribuída ao aumento considerável de área dos eletrodos quando modificados. Observações com microscópio eletrônico mostraram a formação de vários poros na superfície do microeletrodo após a modificação.

Na Figura 11 também é mostrado o resultado dos estudos voltamétricos para o ácido ascórbico, evidenciando o bom comportamento deste analito frente a estes microeletrodos modificados quando comparados ao microeletrodo de ouro limpo.

Com relação ao comportamento eletroquímico da dopamina frente aos microeletrodos modificados e não modificados, os voltamogramas evidenciam que a corrente de oxidação da dopamina dobra ao se modificar o microeletrodo de ouro com uma mistura equimolar de paládio e platina quando comparado ao microeletrodo sem modificação.

No estudo do comportamento eletroquímico da epinefrina frente aos microeletrodos estudados os resultados mostraram que para os microeletrodos de ouro modificados com a mistura paládio+platina a onda de oxidação foi mais bem definida frente aos outros microeletrodos modificados, onde a corrente de oxidação foi da ordem de 15 nA.

O comportamento eletroquímico da dipirona pode ser evidenciado pelos voltamogramas mostrados, onde este analito responde de forma satisfatória para todos os microeletrodos modificados assim como para o microeletrodo limpo.

Figura 11. Voltamogramas cíclicos de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona em microeletrodo de ouro limpo (a) e modificado pela eletrodeposição de Pd (b), Pt (c) e Pd + Pt (d). Condições: velocidade de varredura, 100 mV s^{-1} ; eletrodo de referência, Ag/AgCl_(sat); meio de ácido monocloroacético, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 1,8).

3.3.2. Estudo Fatorial das Possíveis Interações Entre os Analitos

Com base nos estudos voltamétricos se procurou analisar quimiometricamente as possíveis interações entre o ácido ascórbico, a dopamina, a epinefrina e a dipirona. Estes estudos foram realizados com a colaboração dos Profs Drs. Mário César Ugulino de Araújo e Teresa Cristina Bezerra Saldanha do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba. Inicialmente, foi realizado um planejamento fatorial como mostrado na Tabela 4. Foi utilizado o programa interativo FATORIAL, que realiza todos os cálculos necessários para a análise de um planejamento fatorial completo. Além de calcular a média global e todos os efeitos principais e de interação, o fatorial produz gráficos normais e seminormais, que são úteis para se identificar

os efeitos estatisticamente significativos e para avaliar a qualidade do ajuste de modelos aproximados [145].

Serão mostrados os resultados nas Figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17 para o microeletrodo de ouro modificado com platina nos potenciais de 200, 300, 400, 500, 700 e 800 mV, respectivamente. As Figuras 12a, 13a, 14a, 15a, 16a e 17a mostram os diagramas obtidos para injeções em triplicatas das 16 misturas padrões e 7 misturas de teste (amostras). De acordo com as Figuras 12b, 13b, 14b, 15b, 16b e 17b quatro efeitos foram mais significativos que são os correspondentes efeitos principais, ou seja, os das substâncias individuais, certificando a não existência de interações entre estes analitos. Os demais efeitos se ajustam muito bem a uma reta cuja interseção com a probabilidade acumulada de 50% ocorre praticamente sobre o ponto zero do eixo das abscissas, confirmando que realmente faz sentido considerar esses pontos como vindos de uma população normal de média zero. Com relação aos gráficos dos resíduos, para que o modelo aproximado seja considerado satisfatório, este gráfico deve ter uma aparência aleatória, o que pode ser evidenciado pelas Figuras 12c, 13b, 14c, 15c, 16c e 17c. Estes experimentos foram realizados para todos os eletrodos nos mesmos potenciais e os resultados foram análogos aos apresentados pelos microeletrodos de ouro modificados com platina.

Figura 12. (a) Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de 100 μL de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{\text{trab.}} = 200 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. (b) Gráfico normal das estimativas e (c) Gráfico dos resíduos contra as respostas previstas pela modelagem segundo o programa FATORIAL.

Figura 13. (a) Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de 100 μ L de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{\text{trab.}} = 300$ mV vs Ag/AgCl_(sat). (b) Gráfico normal das estimativas e (c) Gráfico dos resíduos contra as respostas previstas pela modelagem segundo o programa FATORIAL.

Figura 14. (a) Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de 100 μL de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{\text{trab.}} = 400 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. (b) Gráfico normal das estimativas e (c) Gráfico dos resíduos contra as respostas previstas pela modelagem segundo o programa FATORIAL.

Figura 15. (a) Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de 100 μL de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{\text{trab.}} = 500 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. (b) Gráfico normal das estimativas e (c) Gráfico dos resíduos contra as respostas previstas pela modelagem segundo o programa FATORIAL.

Figura 16. (a) Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de 100 μ L de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{trab.} = 700$ mV vs Ag/AgCl_(sat). (b) Gráfico normal das estimativas e (c) Gráfico dos resíduos contra as respostas previstas pela modelagem segundo o programa FATORIAL.

Figura 17. (a) Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções consecutivas de 100 μL de misturas calibração e teste, contendo AA, DA, EP e DI, $E_{\text{trab.}} = 800 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. (b) Gráfico normal das estimativas e (c) Gráfico dos resíduos contra as respostas previstas pela modelagem segundo o programa FATORIAL.

3.3.3. Calibração

Os modelos de calibração relacionando às matrizes X (das correntes) e Y (das concentrações) foram construídos empregando-se o planejamento fatorial. Os cálculos foram realizados com o programa UNSCRAMBLER 6.0 [146].

Ao se construir um modelo de calibração é importante decidir que número de variáveis latentes ou fatores deve ser incluído na modelagem. O número de fatores define o grau de complexidade do modelo, que deve ser ajustado de modo a se obter a melhor previsão possível das concentrações do conjunto de teste. À medida que se aumenta o número de fatores corre-se o risco de transferir para o modelo o ruído proveniente do conjunto de calibração, resultando em previsões errôneas da composição das medições efetuadas com a série de teste. Por outro lado, um modelo muito simples, com um número reduzido de componentes, pode deixar de incluir informações relevantes, apresentando, por conseguinte uma baixa capacidade preditiva. Portanto, o número ótimo de fatores deve conciliar simplicidade com a melhor previsão da série de teste.

3.3.3.1. Seleção de Potencial

Utilizando-se o planejamento fatorial mostrado na Tabela 4, procuramos analisar os dados por MLR e posteriormente com PLS, a fim de optarmos pelo método que apresentasse menor erro, estes modelos de calibração foram aplicados na faixa de potencial de 200 a 800 mV com intervalos de 100 mV. Foi utilizada uma validação externa do modelo, a qual compara as previsões feitas pelo modelo com os valores verdadeiros de um conjunto de teste que não participa da modelagem, sendo usado apenas para testar a capacidade do modelo de fornecer estimativas confiáveis de amostras a serem analisadas futuramente. A validação externa é a mais recomendada quando se dispõe de muitas misturas (objetos), pois, neste método, o conjunto das misturas é dividido em duas partes distintas, uma para calibração e outra para teste, e ambas devem ser numerosas e representativas.

Em ambos os métodos aqui empregados foi usado como critério de validação o do erro médio quadrático de previsão RMSEP (do inglês, *root mean square error of prediction*) expresso matematicamente por:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{ip} - Y_{iv})^2}{n}}$$

Onde, Y_{ip} é o valor estimado pelo modelo para a concentração da mistura i , Y_{iv} é o seu valor verdadeiro e n é o número total de misturas de teste.

Para os modelos de calibração, uma curva de RMSEP *versus* potencial aplicado foi plotado para cada analito, como mostrado nas Figuras 18 e 19. Para o MLR, o menor RMSEP para o ácido ascórbico foi encontrado em 400 mV, enquanto que para a DA, EP e DI o melhor potencial foi 500 mV. Isto pode ser facilmente explicado pelos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 11, onde é claro que a corrente resultante em 400 mV é principalmente decorrente da oxidação do AA. Já em 500 mV a oxidação das demais espécies é controlada por difusão. Assim, podemos observar que as contribuições dos quatro analitos em 500 mV são similares. Com base nessas observações, o potencial de trabalho escolhido para aplicar a calibração MLR foi 500 mV, valor este definido como potencial ótimo de trabalho para ser aplicado nas análises.

Para o PLS, a Figura 19 mostra o comportamento dos RMSEPs para cada analito em todos os potenciais estudados, podendo-se perceber que o potencial de trabalho de 400 mV apresentou menores valores de RMSEP para o ácido ascórbico, a dopamina, a epinefrina e a dipirona. Assim, como se deseja trabalhar com o menor número de potenciais possíveis (o menos catódico possível), podemos concluir que o melhor potencial de trabalho para a análise destas misturas é 400 mV.

Figura 18. Gráficos dos RMSEPs do modelo MLR *versus* o potencial aplicado pelo eletrodo de trabalho.

Figura 19. Gráficos dos RMSEPs do modelo PLS *versus* o potencial aplicado pelo eletrodo de trabalho.

3.3.3.2. Validação do Modelo Estatístico

Foram construídos modelos MLR e PLS, o primeiro no potencial de 500 mV e o segundo em 400 mV. Como já mencionado anteriormente, a validação dos modelos é feita comparando-se os valores das concentrações previstas pelo modelo com seus respectivos valores verdadeiros. As Tabelas 5 e 6 mostram os resultados obtidos para o conjunto de teste usando MLR e PLS, respectivamente.

Uma outra maneira de se apresentar as Tabelas 6 e 7 é através dos gráficos de valor verdadeiro contra valor previsto, mostrados nas Figuras 20 e 21. A reta representa a bissetriz do quadrante onde a ordenada e a abscissa são idênticas. Assim, quanto mais próximos dessa reta estiverem os pontos, maior será a semelhança entre o valor verdadeiro da concentração e o valor previsto pelo modelo. As Figuras 22 e 23 apresentam os gráficos dos erros absolutos (diferença entre os valores verdadeiro e o previsto pelo modelo matemático) nas previsões MLR e PLS dos quatro analitos em cada objeto do conjunto de teste, contra os valores verdadeiros das concentrações.

Tabela 6. Determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona em amostras sintética para microeletrodos de ouro modificados com diferentes metais nobres usando o modelo MLR.

Amostras	Concentração / $\mu\text{g g}^{-1}$							
	AA		DA		EP		DI	
	MLR	Real	MLR	Real	MLR	Real	MLR	Real
A	5,0	6,0	3,0	2,8	7,8	8,7	10	9,4
B	4,9	4,0	2,8	2,9	8,0	7,3	10	11
C	6,0	6,0	6,6	6,6	9,8	9,7	3,4	3,4
D	4,9	4,9	3,8	3,8	11	11	3,5	3,3
E	4,9	4,9	7,4	7,5	2,7	2,5	9,9	10
F	5,8	6,0	6,8	6,5	9,2	9,7	3,3	3,4
G	6,1	5,9	6,4	6,6	10	9,8	3,3	3,4

Tabela 7. Determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona em amostras sintética para microeletrodos de ouro modificados com diferentes metais nobres usando o modelo PLS.

Amostras	Concentração / $\mu\text{g g}^{-1}$							
	AA		DA		EP		DI	
	MLR	Real	MLR	Real	MLR	Real	MLR	Real
A	5,6	5,7	3,3	3,0	8,1	7,8	8,7	8,6
B	4,0	3,9	2,8	3,0	7,0	6,7	12	12
C	6,1	5,5	6,6	7,0	8,4	8,9	3,9	3,4
D	5,2	4,6	4,4	4,0	10	10	3,2	3,4
E	4,0	4,6	8,1	7,9	3,0	2,4	9,6	10
F	5,3	5,5	6,1	6,9	7,9	8,9	3,7	3,5
G	5,5	5,5	6,1	6,9	8,1	8,9	3,6	3,4

Figura 20. Comparação entre os valores de concentração previstos pelo modelo MLR a 500 mV e os verdadeiros para o conjunto de teste. (a) ácido ascórbico; (b) dopamina; (c) epinefrina; (d) dipirona.

Figura 21. Comparação entre os valores de concentração previstos pelo modelo PLS a 400 mV e os verdadeiros para o conjunto de teste. (a) ácido ascórbico; (b) dopamina; (c) epinefrina; (d) dipirona.

Figura 22. Gráficos dos erros absolutos nas previsões para o conjunto de teste contra os valores verdadeiros das concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) usando a modelagem MLR a 500 mV. (a) ácido ascórbico, (b) dopamina, (c) epinefrina e (d) dipirona.

Figura 23. Gráficos dos erros absolutos nas previsões para o conjunto de teste contra os valores verdadeiros das concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) usando a modelagem PLS a 400 mV. (a) ácido ascórbico, (b) dopamina, (c) epinefrina e (d) dipirona.

Analisando-se as Figuras 20 e 21 verifica-se uma boa concordância entre o valor previsto pelo modelo e o valor verdadeiro de concentração para os quatro analitos. Observando-se as Figuras 22 e 23 verifica-se que os erros correspondentes são pequenos e não apresentam tendências, ou seja, os erros variam de maneira aleatória como deve ocorrer com modelos bem ajustados.

Na Tabela 8 são dados os valores médios dos erros absolutos (EMA) e relativos (EMR) para as previsões das concentrações das misturas do conjunto de teste na calibração MLR. A Tabela 9 apresenta os dados análogos resultantes da calibração PCR. Para o cálculo dessas médias foram usados os módulos dos erros de acordo com as equações abaixo [23].

$$EMA_j = \frac{\sum_{i=1}^n |yp_{ij} - yv_{ij}|}{n}$$

$$EMR_j = \frac{\sum_{i=1}^n \left| \frac{yp_{ij} - yv_{ij}}{yv_{ij}} \right|}{n} \times 100$$

Onde yp_{ij} é o valor previsto pelo modelo para a concentração do analito j na mistura i , yv_{ij} o seu valor verdadeiro e n é o número de amostras do conjunto de teste.

Tabela 8. Erros médios absolutos (EMA) e relativos (EMR) nas previsões das concentrações das amostras do conjunto de teste na calibração MLR a 500 mV.

ANALITO	MLR	
	EAM ($\mu\text{g g}^{-1}$)	ERM (%)
Ácido Ascórbico	0,33	6
Dopamina	0,13	3
Epinefrina	0,37	5
Dipirona	0,30	4

Tabela 9. Erros médios absolutos (EMA) e relativos (EMR) nas previsões das concentrações das amostras do conjunto de teste na calibração PLS a 400 mV.

ANALITO	PLS	
	EAM ($\mu\text{g g}^{-1}$)	ERM (%)
Ácido Ascórbico	0,31	6
Dopamina	0,44	8
Epinefrina	0,50	8
Dipirona	0,23	5

As Tabelas 8 e 9 mostram que os modelos PLS e MLR apresentam resultados diferentes, mas ambos os modelos podem ser considerados eficientes para a análise simultânea dos quatro analitos. Para se obter resultados mais eficientes usando PLS seria necessário um número maior de variáveis, o que para essa metodologia acarretaria num aumento de potenciais aplicados ou eletrodos de trabalho, gerando uma metodologia cada vez mais complexa. Assim, podemos concluir que tanto o MLR quanto o PLS foram equivalentes para a quantificação de ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona.

3.3.4. Aplicação do Modelo Estatístico na Análise de Ácido Ascórbico e Dipirona em Preparações Farmacêuticas

De acordo com os resultados encontrados para a determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona, passou-se a tentar determinar simultaneamente ácido ascórbico e dipirona em amostras reais, neste caso formulações farmacêuticas. Os medicamentos selecionados para o estudo foram escolhidos de acordo com a sua composição.

As Figuras 24 e 25 mostram os diagramas encontrados para as misturas de calibração e amostras nos diferentes potenciais para o mesmo microeletrodo, neste caso, microeletrodo de ouro limpo e microeletrodo de ouro modificado com paládio, respectivamente.

Figura 24. Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro limpo e um modificado com paládio para injeções consecutivas de 100 μL de misturas de calibração e amostras de medicamentos, contendo AA e DI, $E_{\text{trab.}} = 400 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

Figura 25. Respostas amperométricas em fluxo de um microeletrodo de ouro limpo e um modificado com paládio para injeções consecutivas de 100 μL de misturas de calibração e amostras de medicamentos, contendo AA e DI, $E_{\text{trab.}} = 500 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

A Tabela 10 resume os valores encontrados para o ácido ascórbico e a dipirona nos medicamentos analisados por amperometria. Estes resultados posteriormente foram comparados com os encontrados usando métodos volumétricos. Pôde-se constatar uma boa concordância entre a regressão linear múltipla e os valores indicados pelos fabricantes nas respectivas bulas. Os erros relativos variaram entre 0 e 6 %.

Tabela 10. Determinação simultânea de ácido ascórbico e dipirona em amostras de medicamentos usando amperometria e a modelagem MLR.

Amostras	Concentração / $\mu\text{g g}^{-1}$							
	AA				DI			
	MLR	Real	Desvio	Erro	MLR	Real	Desvio	Erro
Padrão 1	0,97	0,94	0,03	3	1,89	1,83	0,06	3
Padrão 2	0,93	0,94	-0,01	1	18,68	18,61	0,07	0,3
Padrão 3	9,37	9,39	-0,02	0,2	1,93	1,83	0,10	5
Padrão 4	9,45	9,43	0,02	0,2	18,64	18,81	-0,17	0,9
APRACUR	1,76	1,75	0,01	0,6	3,30	3,50	-0,20	6
MAGNOPYROL	-	-	-	-	6,76	6,67	0,09	1
BENEGRIP	3,98	3,98	0,00	0	-	-	-	-
ANADOR	-	-	-	-	6,42	6,67	-0,25	4

Real – concentração do analito indicado pelo fabricante do medicamento

$$\text{DESVIO} = C_{\text{AA}} (\text{Real}) - C_{\text{AA}} (\text{MLR})$$

$$\text{Erro} = (C_{\text{AA}} (\text{Real}) - C_{\text{AA}} (\text{MLR})) / C_{\text{AA}} (\text{Real})$$

Como já citado anteriormente, diversos métodos para a determinação de ácido ascórbico são propostos na literatura. O método mais empregado para o doseamento da dipirona é o iodométrico. No presente estudo também se adotou a iodometria como método de padronização para o ácido ascórbico.

O comprimido da amostra foi pesado e depois triturado com auxílio de um pistilo para obter a homogeneização da mesma. Após esta etapa, foram retiradas duas frações, as quais foram quantitativamente pesadas. À primeira fração foi adicionada água para sua solubilização, em seguida o meio foi condicionado com ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e então foi feita a titulação com a solução de iodo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Já a segunda fração, após ser solubilizada, foi tamponada com um tampão de HAc/Ac (pH 5) e então titulada com a solução de iodo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Todas as titulações foram feitas usando como indicador uma solução de amido.

O volume da solução de I_2 gasto na primeira fração da amostra está relacionado com a oxidação do ácido ascórbico e da dipirona, enquanto que a

quantidade de I_2 gasto na segunda fração foi usado apenas para a oxidação do ácido ascórbico, pois a dipirona não é oxidada com o I_2 em pH 5. Assim podemos determinar o ácido ascórbico através da segunda titulação, enquanto que a dipirona pode ser determinada na primeira titulação eliminando-se a contribuição do volume total de I_2 gasto daquele utilizado na oxidação do ácido ascórbico.

A Tabela 11 resume os valores encontrados para o ácido ascórbico e a dipirona nos medicamentos analisados por iodometria. Estes resultados posteriormente foram comparados com os encontrados usando métodos de determinação simultânea. Pôde-se constatar uma boa concordância entre os valores encontrados pelos métodos volumétricos e os valores indicados pelos fabricantes nas respectivas bulas. Os erros relativos variaram entre 0,3 e 8 %.

Tabela 11. Determinação simultânea de ácido ascórbico e dipirona em amostras de medicamentos usado iodometria.

Amostras	Massa por comprimido/ mg							
	AA				DI			
	I_2	Real	Desvio	Erro	I_2	Real	Desvio	Erro
APRACUR	54,3	50	4,3	8	98,0	100	-2,0	2
MAGNOPYROL	-	-	-	-	501,3	500	1,3	0,3
BENEGRIP	302,2	300	2,2	0,7	-	-	-	-
ANADOR	-	-	-	-	478,0	500	-22,0	4,4

A Tabela 12 mostra uma comparação feita entre os dois métodos analíticos estudados para a determinação de ácido ascórbico e dipirona nos medicamentos analisados. Pode-se verificar uma boa concordância entre estes métodos e os valores indicados na bula pelo fabricante, entretanto vale ressaltar a finalidade do nosso método que foi fazer a determinação simultânea dos dois analitos usando apenas quatro padrões de calibração, demonstrando assim que o método proposto pode ser utilizado em análises de rotina com uma boa confiabilidade dos resultados. Também se deve destacar a facilidade e o baixo custo da análise.

O sistema de análise simultânea de multicomponentes foi adequada para a determinação simultânea de ácido ascórbico e dipirona, sendo verificada a importância de métodos quimiométricos para a resolução amostras contendo multicomponentes. Os resultados do MLR quando comparados com o da iodometria apresentam excelente concordância. Um dos fatores mais importantes na aplicação destas técnicas foi a resolução do sistema em um único potencial de trabalho, 500 mV.

Tabela 12. Comparação dos resultados obtidos por MLR e I_2 para a determinação simultânea de ácido ascórbico e dipirona em amostras de medicamentos.

Amostras	Massa por comprimido/ mg					
	AA			DI		
	I_2	MLR	Real	I_2	MLR	Real
APRACUR	54	52	50	98,0	98,3	100
MAGNOPYROL	-	-	-	501	509	500
BENEGRIP	302	300	300	-	-	-
ANADOR	-	-	-	478	489	500

3.4. Conclusões

A metodologia apresentada neste trabalho, usando calibração multivariada, eletrodos modificados e um multipotenciostato, mostrou ser uma boa ferramenta para a determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona, usando um único valor de potencial. O critério de fixação de um único potencial se mostrou simples e eficiente. Os resultados apresentados são considerados satisfatórios, especialmente considerando os baixos níveis de concentração e a similaridade das ondas de oxidação dos quatro analitos estudados. O método de calibração multivariada eliminou uma possível etapa de separação, simplificando a análise. A metodologia foi aplicada na análise simultânea de ácido ascórbico e dipirona em formulações farmacêuticas, onde os resultados apresentados mostram uma boa concordância entre os métodos padrões de análise e o aqui desenvolvido. Não

foi aplicada a metodologia para análise de ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona em amostras reais, uma vez que não foi encontrada nenhuma amostra que contenha os quatro analitos. Entretanto, este trabalho serviu para provar a possibilidade de se fazer análises multicomponentes em técnicas eletroanalíticas. Este trabalho foi apresentado no XI SIBEE (Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica) e foi publicado na revista *Analyst*, com grande repercussão, pois até o momento diversos pedidos de separatas foram recebidos.

Capítulo 4

SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO COM DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DIFERENCIAL DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM ÁGUA DE CHUVA USANDO CATALASE IMOBILIZADA EM REATOR TUBULAR

4.1. Introdução

A atmosfera, ao lado dos principais gases que a compõe apresenta em menores concentrações milhares de compostos químicos (orgânicos e inorgânicos) distribuídos nas fases líquida e gasosa ou no material particulado em suspensão. Quando esses compostos encontrados no ar apresentam níveis de concentração que os tornam impróprios ou nocivos à saúde humana, aos animais ou vegetais e danosos aos materiais, são considerados poluentes atmosféricos [147].

A composição química da atmosfera tem sido influenciada pelo crescimento da industrialização, tanto no que se refere ao aumento ou a diminuição da concentração de espécies químicas ou até mesmo na introdução de novas espécies. Assim, a preocupação com a qualidade do ar já se faz notar com as pesquisas sobre chuva ácida, que tiveram início no século passado e pesquisas com ozônio e efeito estufa, que vêm sendo realizadas há algumas décadas [148].

O reconhecimento de que a emissão descontrolada de poluentes na atmosfera ultrapassa a escala regional, não respeitando fronteiras, podendo desencadear mudanças globais, tem gerado programas de pesquisa amplos como o International Geosphere Biosphere Program (IGBP), bem como conferências mundiais da ONU (Conferência do Rio, em 1992) e Convenções do Clima, realizadas no Rio de Janeiro (1992), Berlim (1995), Kioto (1997) e Buenos Aires (1998), mesmo obtendo poucos avanços [149].

A contaminação da atmosfera pode ocorrer como consequência de processos naturais como também devido a atividades desenvolvidas pelo homem, definidas como fontes antropogênicas. Entre os processos naturais podem ser citadas as erupções de vulcões, incêndios de grandes extensões e aerossol marinho, entre outros. Entretanto, estes fenômenos provocam, de uma maneira geral, baixos impactos sobre o bem-estar e a saúde humana. Isto se deve, usualmente, ao baixo nível de concentração das espécies contaminantes introduzidas nos processos naturais e as grandes distâncias que separam as fontes de poluição natural dos grandes centros urbanos [150].

As fontes antropogênicas caracterizadas principalmente por processos de combustão industrial e domiciliar, veículos automotores e incineração de lixo, introduzem na atmosfera centenas de milhões de toneladas anuais de

espécies químicas, tais como, monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO₂), monóxido de nitrogênio (NO), dióxido de nitrogênio (NO₂), material particulado em suspensão e metais pesados. Os óxidos de nitrogênio e de enxofre, convertidos na atmosfera em ácidos nítrico e sulfúrico, são vinculados à acidificação das chuvas com efeitos tóxicos sobre a flora, a fauna e especialmente micro-organismos [151-154]. Nas florestas, a precipitação ácida provoca o amarelamento e queda das folhas e brotos das árvores, com redução ou desaparecimento das copas, até que as árvores morram [153]. No solo, a biodisponibilidade do alumínio aumenta com a precipitação ácida. Isto facilita a destruição de raízes novas pela ação de bactérias, diminuindo a vitalidade das árvores, tornando-as vulneráveis às doenças e à tempestades [154].

A degradação de materiais poliméricos, metais e obras de arte são atribuídas a espécies contidas na deposição seca, tais como SO₂, O₃, H₂O₂ e a deposição úmida (chuva ácida) [150, 155].

O peróxido de hidrogênio começou a ser pesquisado com maior intensidade a partir de 1980, por ter sido identificado como importante fotooxidante nas etapas de acidificação da atmosfera [156].

A importância do peróxido de hidrogênio, no estudo da chuva ácida, reside no fato de ser o oxidante fotoquímico de maior participação na oxidação de SO₂ a H₂SO₄ na fase aquosa da atmosfera, após absorção do SO₂(g) e oxidantes em nuvens, neblinas ou filme líquido sobre partículas de aerossóis [156-160]. A principal fonte de H₂O₂ é a reação de radicais fotoquímicos hidroperóxido em fase gasosa [156, 161]. Emissões significativas de H₂O₂ por fontes diretas, naturais ou antropogênicas, não são conhecidas.

Vários métodos de determinação de H₂O₂ em amostras ambientais foram desenvolvidos. Gutz e Klockow [162] desenvolveram um método de análise por injeção em fluxo rápido e sensível, para determinação de H₂O₂ e HSO₃⁻, entretanto em diferentes meios. Mais recentemente Gutz e Tanimoto [163] desenvolveram uma metodologia para análise de H₂O₂ e HSO₃⁻ no mesmo meio, dispensando a duplicação do sistema FIA, usando platina como eletrodo de trabalho. Em 1999, Gutz e Rocha [160] apresentaram um método eletroanalítico para determinação em fluxo de traços de H₂O₂, HSO₃⁻ e hidroximetanosulfonato na fase líquida da atmosfera, usando eletrodo de

mercúrio. Na maioria dos métodos amperométricos, para determinação de H_2O_2 , foram utilizados eletrodos sólidos de ouro adquiridos comercialmente ou de platina, de concepção e construção própria [162].

Para a aplicação da metodologia aqui apresentada, as amostras foram coletadas na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), cabendo uma breve descrição das condições da atmosfera local.

A RMSP localiza-se no Planalto Atlântico, mais especificamente no compartimento rebaixado conhecido como Bacia Sedimentar de São Paulo, ocupando uma área de aproximadamente 8000 km², apresenta elevações que variam de 715 a 900 m e é contornada por unidades topográficas que apresentam altitude de 1100 m, como a Serra do Mar [164].

O clima da RMSP pode ser classificado como tropical de altitude, com inverno seco e frio, e verão quente e úmido. A precipitação é em torno de 1500 mm, sendo que a maior parte ocorre nos meses de outubro a março. O número de dias de chuva anual varia de 70 a 130 [164].

Na cidade de São Paulo as condições meteorológicas são mais favoráveis à dispersão dos poluentes nos meses de setembro a abril (verão quente e úmido) são caracterizadas por grande instabilidade que se forma em toda a região Sudeste, e estão associadas a sistemas frontais vindo do sul do continente, da umidade proveniente da Região Amazônica e da brisa marítima [147]. As precipitações úmidas na cidade de São Paulo resultam dessas atividades convectivas.

Como principal pólo econômico do país e um dos maiores conglomerados humanos do mundo (cerca de 17 milhões de habitantes em apenas 8.000 Km²), a RMSP apresenta um dos maiores e mais graves problemas de poluição atmosférica do país [147, 149]. A poluição atmosférica é causada principalmente pelas emissões de poluentes liberadas pela frota de cerca de 5,3 milhões de veículos automotores e pelo parque industrial com mais de 30.000 unidades [147, 149].

Em 1986, foi criado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), o Programa Nacional de Poluição do Ar por Veículos Automotores (PROCONVE) que tem por finalidade criar diretrizes legais para a contenção das emissões de poluentes, sendo implantada e operacionalizada pela CETESB.

Neste trabalho propomos um método versátil para determinação amperométrica diferencial de peróxido de hidrogênio em amostras de água de chuva na região metropolitana de São Paulo, usando microeletrodos de ouro modificados pela eletrodeposição de platina, explorando técnicas de imobilização enzimática. As concentrações de peróxido de hidrogênio em cada amostra foi calculada baseada na diferença entre a corrente medida antes e depois do tratamento enzimático, usando catalase imobilizada em um reator tubular com a resina Ambertile IRA- 743.

4.2. Materiais e Métodos

Este item tem o objetivo de fornecer informações quanto aos materiais e à instrumentação usada para o desenvolvimento deste trabalho.

4.2.1. Imobilização Enzimática

A seletividade das enzimas e a sua capacidade de catalisar reações de substratos com baixas concentrações são de grande uso na análise química. Diversos métodos são descritos na literatura para a imobilização de enzimas, entre eles estão os métodos desenvolvidos para análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção amperométrica, onde na maioria das vezes a enzima é imobilizada na superfície de um eletrodo por meios químicos ou físicos, constituindo assim um biossensor. A peroxidase e a catalase são enzimas que atuam na redução do peróxido de hidrogênio, fato esse que tem atraído a atenção para o desenvolvimento de biossensores para análise de peróxido de hidrogênio. Muitos autores descrevem o uso de peroxidase e catalase no tratamento prévio de amostras. Neste trabalho propomos o desenvolvimento de um reator tubular usando estas enzimas imobilizadas com o auxílio de glutaraldeído sobre a resina Amberlite IRA - 743. Cabe destacar que a metodologia aqui desenvolvida permite a preparação de reatores enzimáticos em cerca de 15 minutos. A maioria dos trabalhos descritos na literatura requerem muitas horas ou mesmo mais de um dia para realizar a imobilização de enzimas visando a construção de reatores. Tais reatores foram construídos visando sua utilização em análises em linha de amostras de água de chuva.

A Figura 26 mostra um diagrama esquemático da imobilização enzimática. A resina Amberlite IRA - 743 (250 mg) foi inicialmente tratada com

100 μ L de glutaraldeído 0,1 % (IRA - GU) por 5 minutos, sob agitação. Nesta etapa, o glutaraldeído deve ligar-se quimicamente à resina. A seguir foram adicionadas 200 U de enzima (IRA - GU - ENZ) deixando em contato por 10 minutos, sob agitação para favorecer a interação glutaraldeído - enzima. A próxima etapa consistiu na preparação do reator tubular (ϕ = 0,26 cm e 2,2 cm de comprimento) com a resina modificada e lavagem com eletrólito para retirar o excesso de reagente. Os reatores preparados apresentaram alta estabilidade, uma vez que foram utilizados intensamente durante 15 dias consecutivos, ocasionando uma perda da ordem de 18 a 23 % da atividade enzimática. Quando os reatores não estão sendo usados eles são armazenados em *freezer* sob uma temperatura de -25 °C.

4.2.2. Reagentes e Soluções

Todas as soluções utilizadas nos experimentos foram preparadas com água deionizada obtida do sistema Nanopure da Barnsted e os reagentes usados foram de grau analítico. O peróxido de hidrogênio e as enzimas catalase (EC 1.11.1.6) e peroxidase (EC 1.11.1.7) foram obtidas da Sigma (St. Louis, MO, USA). Os sais utilizados para preparação do sistema tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,05 mol.L⁻¹ (pH 7,0) usado como eletrólito suporte foi obtido da Merck (Darmstadt, Germany). A resina de troca iônica e o glutaraldeído foram obtidos da Aldrich (Milwaukee, USA). Todas as soluções foram preparadas momentos antes das análises.

A solução estoque de peróxido de hidrogênio foi padronizada por permanganometria, sendo a solução de permanganato padronizada contra solução de oxalato.

Figura 26. Diagrama esquemático da imobilização enzimática. IRA – resina de troca iônica Amberlite IRA – 743, GU – glutaraldeído, ENZ – enzima (catalase ou peroxidase).

4.2.3. Procedimentos de Amostragem

As amostras de água de chuva foram coletadas empregando-se um coletor automático desenvolvido por Fonaro et al [165]. O sistema é composto de um sensor para chuva, o qual determina a abertura e o fechamento do sistema. O coletor foi instalado a aproximadamente 10 m do solo sobre uma coluna situada no bloco 12 superior do Instituto de Química – USP. Um tubo de PTFE conduz as amostras coletadas diretamente ao laboratório. As amostras foram analisadas até 30 minutos após a coleta. Nenhum decréscimo de H_2O_2 foi observado neste intervalo de tempo, entretanto quando isso não era possível, as amostras eram armazenadas, por um tempo máximo de 1 mês, em *freezer* a uma temperatura de -25°C .

4.2.4. Eletrodos e Célula Eletroquímica

Durante todo esse trabalho foi usado um sistema convencional de três eletrodos; eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar.

O eletrodo de trabalho consistiu de um *array* de microeletrodos de ouro, como já citado no capítulo 3 [143]. Os microeletrodos foram modificados pela eletrodeposição de platina presente numa solução de K_2PtCl_6 (2 mmol L^{-1} e pH 4,8), num potencial de $-1,00 \text{ V}$ por um tempo de 15 minutos [104]. Estes microeletrodos após a modificação se mostraram estáveis por pelo menos 8 dias de uso. Como eletrodo de referência foi usado um eletrodo miniaturizado de $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat.})}$ construído em nosso laboratório [144] e como eletrodo auxiliar foi usado uma agulha de aço inoxidável. Momentos antes de realizar a modificação da superfície, os microeletrodos foram polidos com alumina de 3 e de $0,05 \mu\text{m}$ e, após cada polimento, os microeletrodos foram submetidos a tratamento com ultrassom por 5 minutos. A célula eletroquímica utilizada neste trabalho foi mostrada nas Figuras 8A e 8B.

4.2.5. Instrumentação

Neste trabalho é utilizado um sistema de injeção em fluxo composto de dois canais. As soluções são propelidas por pressurização, utilizando uma bomba de aquário [166]. O controle do fluxo foi feito com o auxílio de uma válvula que pressionava um tubo de tygon colocado na linha. Tubos de teflon de $0,5 \text{ mm}$ de diâmetro interno foram utilizados para montar o sistema. Um

potenciostato multicanal descrito no capítulo anterior [34], operando no sistema amperométrico, foi utilizado para medidas do sistema FIA. Uma representação esquemática do sistema em fluxo é mostrada na Figura 27. O sistema é constituído de uma bomba de aquário de dois canais, duas válvulas de controle do fluxo, *loop* de amostragem, um reator tubular ($\phi = 0,26$ cm e 2,2 cm de comprimento) com enzima imobilizada em Amberlite IRA – 743, uma célula eletroquímica e um potenciostato.

Figura 27. Diagrama esquemático do sistema FIA empregado para a análise de peróxido de hidrogênio. A – bomba de aquário, B – depósitos com eletrólito, C – válvulas de controle do fluxo, D – *loops* de amostragem, E – reator tubular, F – célula eletroquímica, G – descarte, H – potenciostato, I – microcomputador.

4.2.5.1. Propulsor Pneumático Versátil e Isento de Pulsação Usado para Impulsionar Soluções em Sistemas de Análise em Fluxo

As bombas peristálticas constituem-se no equipamento mais utilizado para movimentar soluções em sistemas de análise em fluxo. São equipamentos versáteis, em geral, com múltiplos canais, que possibilitam impulsionar e/ou

aspirar soluções, emulsões ou mesmo suspensões, em ampla faixa de viscosidades, sem contato direto das mesmas com partes mecânicas da bomba, afora o tubo flexível sobre o qual são aplicados os movimentos peristálticos pelo rotor da bomba. As vazões podem ser ajustadas num amplo intervalo, de forma contínua ou em pequenos incrementos, controlando a rotação da bomba e/ou o diâmetro interno dos tubos. Entre as limitações de uso deste sistema propulsor estão o custo relativamente elevado do próprio equipamento (~ US \$ 1,500 para uma bomba típica de 4 canais), e dos tubos flexíveis (Tygon®, Neuprene® e outros) que a bomba requer. Estes tubos flexíveis sofrem pressão intermitente dos roletes da bomba e, quando submetidos a longos períodos de operação, apresentam gradual queda da vazão por fadiga e deformação, bem como aumento da permeabilidade a gases. Ao trabalhar com solventes orgânicos e/ou soluções concentradas de ácidos, bases ou oxidantes, o fator determinante da escolha do material passa a ser a (limitada) inércia química ao meio agressivo. Outra limitação está no ajuste da relação entre as vazões dos diferentes canais da mesma bomba, ditada pela limitada disponibilidade de tubos com diâmetros internos diferentes.

Finalmente, certos transdutores usados na detecção do sistema de análise em fluxo são sensíveis à vazão, como, por exemplo, os detetores voltamétricos e amperométricos, caso em que a pulsação na vazão do fluido, introduzida pela alternância entre os roletes propulsores, torna-se indesejável. Em sistemas amperométricos, a dependência do sinal da corrente com o fluxo da solução está relacionada com a perturbação na camada de difusão do eletrodo gerada pela reação eletroquímica [167]. Se a camada de difusão é fina a ponto de estar dentro da região de fronteira onde a velocidade de fluxo próxima ao eletrodo se aproxima de zero, não há influência do fluxo de solução. Isto acontece quando o sinal de corrente medido resulta de uma reação eletroquímica que ocorre durante um curto intervalo de tempo (poucos milissegundos) devido à aplicação de pulsos de potencial, tal como na amperometria de pulso normal ou diferencial. Quando o potencial em que ocorre o processo eletroquímico é aplicado por períodos mais longos ou mesmo continuamente (p. ex., amperometria d.c.), o espessamento da camada de difusão passa a ser determinado pela convecção local, influenciável, portanto, pela pulsação do fluido. Para detectores amperométricos com gota de

mercúrio, por exemplo, o ruído sobreposto ao sinal analítico, oriundo da troca dos roletes ativos, pode diminuir a faixa linear dinâmica de resposta do detector em até duas ordens de grandeza [90], obrigando à introdução de amortecedores pneumáticos.

Para contornar as limitações impostas pelo uso de bombas peristálticas e/ou reduzir o custo, outros sistemas de propulsão de soluções tem sido utilizados para análise em fluxo, entre as quais destacam-se o uso da força da gravidade [34, 105, 143, 168, 169], bombas de pistão ou de seringa [170-172], sistemas pneumáticos acionados por bombas de diafragma [173-174] ou gás comprimido [175] entre outros.

Neste trabalho faz-se uso de mini-compressores de ar do tipo bomba de diafragma, originalmente destinados ao borbulhamento de ar em aquários domésticos. Trata-se de uma alternativa versátil, de baixo custo, (~ US \$ 10.00 a 15.00), que permite ajuste contínuo da vazão em largo intervalo, bem como operação com dois canais, sempre com a vantagem da ausência de pulsação do fluido propelido. As potencialidades e o desempenho deste sistema simples de propulsão foram avaliados e comparados com os sistemas de propulsão por bomba peristáltica e por ação da gravidade, empregando detector amperométrico com eletrodo de gota de mercúrio.

Adaptação dos mini-compressores como sistema propulsor de solução

Um diagrama esquemático da adaptação de mini-compressores de ar para impulsionar soluções é ilustrado na Figura 28.

Mini-compressores de fabricação nacional das marcas Betta, Tropical e Master têm sido usados ao longo das pesquisas relatadas e nas aplicações dela decorrentes, com resultados igualmente satisfatórios. Todas são capazes de acumular pressão ao redor de 4 psi (0,28 bar) ao se restringir fortemente sua vazão. Como a vazão requerida na presente aplicação é muito inferior à capacidade dos mesmos, diferenças de uma bomba para outra são irrelevantes. Frascos de plástico ou de vidro com capacidade de 500 mL de solução foram usados, como reservatório da solução transportadora, sendo um para cada canal. Para operação ininterrupta mais prolongada, podem ser usados frascos de capacidade maior. Na tampa do frasco foram feitos dois orifícios para permitir a introdução de dois tubos de polietileno que alcançam o

fundo do recipiente. A vedação entre os tubos e a tampa foi conseguida embuchando os orifícios com pedaços de tubo de silicone de diâmetro apropriado. O tubo mais espesso (2 mm d.i.) é conectado ao mini-compressor, servindo para manter a pressurização, enquanto o mais fino (0,8 mm d.i.), alimenta o circuito em fluxo com a solução transportadora. O ajuste preciso da vazão do fluido transportador foi conseguido de duas maneiras: (a) instalando em série com o tubo de saída, uma válvula reguladora do tipo “agulha”, do tipo

Figura 28. Representação esquemática do sistema de análise em fluxo utilizando bomba de aquário para a propulsão de líquidos. (A) Mini-compressor de ar (dimensões: ~12 x 6 x 6 cm); (B) Reservatório de eletrólito; (C) Válvula reguladora de vazão; (D) Tubo flexível de Tygon®.

usado para regulagem de entrada de ar para aquários (de baixo custo, tal como o compressor); e (b) colocando em série com o circuito uma extensão apropriada de tubo com orifício capilar como restritor da vazão.

Na opção (a), para evitar o contato direto da solução com a válvula plástica, optou-se por inserir através da válvula um pedaço de tubo silicone com aproximadamente 1,0 mm d.i. e 2,3 mm d.e. para melhorar o ajuste fino da vazão da solução e evitar vazamento. Na opção (b), utilizou-se tubo de Tygon® com d.i.=0,254 mm e d.e.=0,76 mm. Com um pedaço de 50 cm, obteve-se vazão próxima a $0,50 \text{ mL min}^{-1}$ e, com metade deste comprimento, $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, ou seja, a relação entre estas variáveis é inversamente proporcional ao

comprimento do tubo capilar. Na falta do capilar de plástico, pode-se recorrer à conexão em série de um número apropriado de agulhas de injeção, do tipo sub-cutâneo (para insulina ou antialérgicos).

Para sistemas analíticos que requeiram dois (ou mais) canais, basta bifurcar a saída da bomba com um conector em forma de T e a ele conectar os tubos de entrada de dois frascos (ou mais, com divisores adicionais). Na saída de cada frasco é necessário colocar um regulador de vazão independente antes da eventual confluência dos fluidos. Existem no mercado bombas de dois canais independentes, que atendem ao mesmo propósito, sem necessidade de bifurcação.

Instrumentação

O circuito em fluxo foi constituído, em dois casos, de linha única, e num terceiro, de dois canais. O reservatório de eletrólito de suporte foi conectado ao regulador de vazão seguido de um injetor manual de amostras provido de alça de amostragem de 100 μL . Tubulação de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno serviu para interligar o reservatório com o injetor (30 a 40 cm de extensão) e este com o detector (25 cm). Diferentes sistemas de propulsão de solução foram comparados: bombas peristálticas (Ismatec modelo MS REGLO, fabricada na Suíça e Milan, de fabricação nacional), gravidade e mini-compressor de ar.

As medições amperométricas com eletrodo de gota de mercúrio foram feitas com um polarógrafo de pulso e célula eletroquímica anteriormente desenvolvidos no IQ-USP [90]. A célula, originalmente destinada à operação estacionária, foi modificada para operar com fluxo mediante a adaptação de um tubo de Teflon (0,5 mm d.i.) curvado em forma de L na lateral do eletrodo gotejante de mercúrio, de modo a direcionar o fluxo diretamente sobre a gota de Hg numa condição que se aproxima do modo "wall-jet". Os sinais de corrente foram registrados com um "Measurement and Plotting System" modelo 7090 da Hewlett-Packard, conectado na saída do conversor de corrente-tensão do polarógrafo.

A detecção amperométrica de H_2O_2 sobre microeletrodos de ouro modificados com platina foi efetuada com multipotenciostato anteriormente descrito [34]. Os potenciais aplicados nas células eletroquímicas foram

medidos em relação ao mini-eletrodo de referência de Ag/AgCl_(sat.) [144]. Todas as medições foram feitas em ambiente com temperatura controlada (25 ± 2 °C).

Soluções e Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico, de procedência Merck. A água deionizada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) foi obtida através do sistema de purificação comercial Nanopure da Barnstead. As soluções de H₂O₂ e de ácido ascórbico foram preparadas diariamente através de diluição em eletrólito adequado das soluções estoques $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Soluções de HClO₄ $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e de tampão acetato (pH 4,0) e fosfato (pH 7,0) foram utilizadas como eletrólitos de suporte.

Resultados e Discussão

O sistema de propulsão pneumática proposto neste trabalho, baseado em um mini-compressor de ar para aquário, foi comparado com a forma consagrada de propulsão em análise em fluxo, qual seja, o uso de bombas peristálticas, bem como a alternativa mais econômica que consiste em aproveitar a força da gravidade por desnivelamento entre o reservatório de solução transportadora e a saída do circuito de fluxo após a detecção.

As vazões máximas alcançadas para uma solução de tampão fosfato $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em circuito de um canal contendo diferentes extensões da bobina de reação estão ilustradas na Tabela 13. Conforme o esperado, com o aumento da extensão do reator ($\phi = 0,8 \text{ mm}$), a vazão diminui devido ao aumento da impedância hidrodinâmica do circuito. Observa-se, no entanto, que mesmo para um reator bastante longo (300 cm) a vazão ainda alcança $8,0 \text{ mL min}^{-1}$, preenchendo as necessidades de praticamente todas as aplicações em sistemas de análise em fluxo. O uso de tubos com diâmetro interno menor (0,5 mm, p. ex.) em circuitos longos levará a vazões mais baixas, mas ainda compatíveis com a prática. Somente circuitos incluindo dispositivos com impedância hidrodinâmica elevada como, por exemplo, reatores empacotados com partículas finas, poderão limitar o uso deste modo de propulsão de baixo custo.

A estabilidade da vazão do fluido transportador foi avaliada através do volume dispensado durante intervalos de operação do mini-compressor que variaram entre 30 minutos e 6 horas. Para cada intervalo de tempo fixou-se as vazões de 0,3; 0,9; 3 e 6 mL min⁻¹. Os resultados do volume de solução propelida revelaram que a vazão se mantém estável durante os diferentes intervalos de operação do mini-compressor.

Tabela 13. Vazões máximas obtidas com o mini-compressor de ar usando reator de diferentes tamanhos. Diâmetro interno do tubo 0,8 mm.

Comprimento do reator (cm)	Vazão Máxima (mL min ⁻¹)
50	14,1
100	12,6
200	9,6
300	8,0

Para conhecer a estabilidade da vazão proporcionada pelo mini-compressor sob condições adversas, tais como operação com flutuações acentuadas de temperatura ou de tensão de alimentação, o efeito destes parâmetros foi investigado. Na faixa de tensão entre 90 a 127 V (limites admissíveis para rede de 115 V), determinou-se que a vazão (refletindo a pressão da bomba) varia linearmente com a tensão, sendo que ao redor de 115 V, a vazão cresce de 1,0% volt⁻¹. O efeito da temperatura na vazão se dá, principalmente, de três modos, colocados em ordem decrescente de importância: alteração na viscosidade do fluido, alteração da pressão da bomba e dilatação volumétrica do fluido. O terceiro fator pode ser desprezado frente aos demais; o segundo, corresponde a 0,12% de elevação da vazão por grau; já o primeiro, alcança 1,9% °C⁻¹. Este coeficiente térmico é similar ao observado em técnicas corriqueiras influenciadas pela viscosidade, como a condutometria e a polarografia. Verifica-se, pois, que para usar o mini-compressor no campo ou em laboratórios sem condicionamento de ar (tal como na condutometria e na polarografia), há necessidade de intercalar com maior

periodicidade, soluções de referência entre as amostras. Quanto às flutuações de tensão, se estas forem súbitas (e não graduais ao longo do dia), é recomendável adicionar um estabilizador de tensão (de baixo custo, do tipo usado para microcomputadores).

Para efeito de comparação, bombas peristálticas de boa qualidade (p. ex., Ismatec), já incorporam estabilização eletrônica interna de tensão. Todavia, não estão livres de efeito da temperatura, fato que muitas vezes passa despercebido aos usuários. Isto porque o aquecimento dos tubos altera suas propriedades mecânicas como elasticidade e rigidez. Assim, a rapidez com que os tubos deformam e retornam à forma original sob os movimentos peristálticos imprimidos pelos roletes e, conseqüentemente, o volume dos bolsões de líquido transportados pode variar. Numa condição experimental típica, determinou-se crescimento relativo da vazão de $0,36\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$. Naturalmente, este valor, tal como a inconveniente fadiga gradual do tubo, depende do elastômero utilizado, do tempo de uso, da velocidade de rotação da bomba, do número de roletes, da pressão ajustada e da pressão de saída do líquido.

Uma das características desejáveis de um sistema de propulsão de solução para fins analíticos, especialmente com detetores dependentes de transporte de massa, é a isenção de pulsação no fluido transportador. Quando isto acontece obtém-se maior estabilidade de linha base, melhor repetibilidade nas medições e melhor limite de quantificação da espécie de interesse. A avaliação do uso de mini-compressores de ar e a sua comparação com outros sistemas de propulsão de solução, elaborada através da resposta dinâmica de um detector amperométrico com gota de mercúrio (sensível à variação na vazão do fluido transportador) é apresentada na Figura 29. Os perfis de $i \times t$ foram obtidos durante experimentos amperométricos sob fluxo contínuo de solução de HClO_4 10 mmol L^{-1} fixando-se o potencial do eletrodo de trabalho em $-0,9 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ e registrando-se a corrente faradaica da redução eletroquímica do O_2 dissolvido na solução do fluido transportador.

Figura 29. Sinais amperométricos registrados em estudo comparativo de diferentes formas de propulsão. (a) Bomba peristáltica (Ismatec); (b) Mini-compressor de ar; (c) Gravidade; (d) Bomba peristáltica (Milan). Condições: eletrodo de trabalho, eletrodo de gota de mercúrio; vazão, $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; meio de ácido perclórico $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; potencial aplicado, $-0,90 \text{ V}$ vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

A curva (a), ilustra o perfil do sinal de corrente resultante da pulsação da solução impulsionada pela bomba peristáltica Ismatec. O registro do sinal da corrente que flui pelo eletrodo aproxima-se de uma onda senoidal sincronizada com a troca dos roletes da bomba, sendo que os mínimos correspondem ao relaxamento da compressão exercida sobre o tubo flexível de Tygon®, com conseqüente redução no transporte convectivo de material eletroativo nas vizinhanças do eletrodo de trabalho. A oscilação introduzida no sinal de corrente apresenta variação relativa superior a 20%, flutuando entre o máximo de $4,64 \mu\text{A}$ e o mínimo de $3,73 \mu\text{A}$. Este "ruído" acentuado é um fator que limita a resposta em concentração do detector. Sinais livres de pulsação foram obtidos tanto recorrendo à ação da gravidade como ao mini-compressor de ar (registros b e c). Oscilação ainda maior do sinal da corrente catódica é gerado pela bomba peristáltica Milan (d). Este comportamento indesejável pode ser creditado ao número menor de roletes ativos disponíveis nesta bomba ($n = 6$), em comparação com o modelo usado da Ismatec ($n = 8$), bem como ao projeto menos adequado do dispositivo que pressiona o tubo contra os roletes.

Um outro aspecto interessante do uso do mini-compressor é a ausência de bolhas, apesar da solução ser propelida por pressão de ar. Já com a bomba peristáltica ocasionalmente formam-se micro-bolhas na região de ação dos roletes, possivelmente, devido à significativa variação de pressão e à turbulência local durante a movimentação do fluido dentro do tubo.

Na Figura 30 são comparados os registros dos sinais de corrente anódica resultantes de injeções sucessivas de 100 μL de solução de ácido ascórbico $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrólito de pH 4,0, ao ser empregada a bomba peristáltica Ismatec (Figura 30A) ou o mini-compressor de ar (Figura 30B), sob vazão de 1 ml min^{-1} . A detecção do ácido ascórbico baseia-se na sua oxidação eletroquímica a ácido de-hidroascórbico, registrada no potencial de +0,23 V vs. Ag/AgCl. Os sinais de corrente de pico obtidos na condição (30A) apresentam um valor médio de 61,2 nA com um desvio padrão relativo (DPR) de 4,5 % ($n=11$). Melhores resultados foram obtidos com o uso do mini-compressor de ar (condição 30B), com o qual, para corrente similar (60,8 nA) o DPR caiu para 2,6% ($n=11$). Este melhor desempenho pode ser creditado à uniformidade no transporte de material eletroativo para a superfície do eletrodo de trabalho resultante da ausência de pulsação do fluido transportador.

Uma aplicação do uso do mini-compressor a um sistema FIA com duplo canal envolveu a detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio com microeletrodos de ouro modificados com platina em meio de tampão fosfato $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, cujos resultados serão mostrados mais adiante.

Embora tenha sido dada ênfase ao uso de mini-compressores para impelir soluções em sistemas de análise em fluxo, também se pode recorrer a eles para aspirar soluções, após modificação simples que consiste encaixar, sob pressão ou mediante uso de cola, um tubo metálico ou plástico no orifício de entrada da câmara onde está alojado o diafragma do compressor. Quando este tubo é conectado à tampa de um frasco de configuração similar ao apresentado na Figura 28 estabelece-se uma pressão reduzida em seu interior, apropriada para aspirar o fluxo. Sistemas FIA monocal canal podem ser operados por aspiração. A aspiração também pode ser aproveitada para o preenchimento da(s) alça(s) de amostragem.

Figura 30. Análise por injeção em fluxo de ácido ascórbico $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando eletrodo de gota de mercúrio. (A) Medidas utilizando bomba peristáltica Ismatec; (B) Medidas utilizando o mini-compressor de ar. Condições: volume de amostra injetada, $100 \mu\text{L}$; vazão, $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; potencial de trabalho, $+0,23 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$; meio de tampão acetato/ácido acético ($\text{pH} = 4,0$).

Considerações Finais

Comprovou-se que os mini-compressores de ar, do tipo comercializado para uso em aquários, em combinação com válvulas ou capilares reguladores de vazão, constituem em uma alternativa simples, versátil e econômica para impulsionar e aspirar soluções em sistemas de análise em fluxo. Frente às bombas peristálticas, apresentam vantagens não só no custo e na ampla disponibilidade, como na ausência de pulsação do fluxo impelido – fator particularmente relevante para detetores amperométricos e voltamétricos –, na maior estabilidade da vazão por longos períodos de trabalho, na menor tendência a formar bolhas, na ausência de desgaste dos tubos flexíveis

expostos ao rotor e na grande robustez destes compressores, projetados para trabalhar ininterruptamente por longos períodos. Em relação ao uso da gravidade, o uso de mini-compressores proporciona pressões equivalentes a 3 metros de coluna de água, evita a necessidade (e eventuais riscos) de suspender o(s) frasco(s) e permitem ajuste mais rápido e prático da vazão. Os compressores permitem também a variação contínua da proporção entre as vazões de dois (ou mais) canais confluentes, o que requereria 2 bombas peristálticas, uma vez que com uma única bomba fica-se restrito às razões entre os diâmetros de tubo disponíveis.

Dependendo das circunstâncias de uso, algumas desvantagens da movimentação de fluidos por mini-compressores devem ser levadas em consideração: necessidade de pausa na operação para preenchimento do(s) frasco(s) (a cada 8 horas, para frascos de 1 L, vazão de 2 mL min⁻¹); necessidade de reajuste da vazão após modificações no circuito (p. ex., troca do reator) que alterem sua impedância hidrodinâmica; obstrução da válvula de ajuste de vazão por partículas maiores (ajuste de vazão por capilar é menos vulnerável); necessidade de válvula adicional (ou injetor com posição intermediária, fechada) para operação no modo *stopped flow*; maior susceptibilidade a flutuações na tensão da rede elétrica, na temperatura ambiente ou na viscosidade dos fluidos injetados.

A disponibilidade do modo de aspiração no mini-compressor pode ser aproveitada não só para promover o preenchimento da alça de amostragem como, possivelmente, para implementar sistema de baixo custo para análise por injeção seqüencial (SIA), em substituição às dispendiosas bombas de pistão ou peristálticas.

4.3. Resultados e Discussões

4.3.1. Catalase x Peroxidase

Experimentos visando avaliar a eficiência dos reatores com peroxidase e catalase envolveram injeções de 150 µL de soluções 2 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de H₂O₂ onde foi verificado uma conversão de 100 % deste analito para o reator com catalase, enquanto que o reator com peroxidase apresentou uma conversão de aproximadamente 50 % deste analito, como pode ser observado na Figura 31,

demonstrando que a cinética de redução do H_2O_2 pela peroxidase é mais lenta que com a catalase. Os estudos amperométricos demonstraram que o reator com catalase apresentou uma conversão de 100 % do H_2O_2 em concentrações de até $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 31. Ensaios amperométricos para H_2O_2 $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ usando o sistema em fluxo sem reator (a) e com reator tubular empacotado com catalase (b) e peroxidase (c). Condições: volume de amostra injetada, $150 \mu\text{L}$; vazão, $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; potencial de trabalho, $+0,60 \text{ V}$ vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$; meio de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

4.3.2. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo

Um outro fator importante estudado foi a vazão utilizada nos experimentos em FIA. A Figura 32 apresenta as respostas amperométricas do microeletrodo de ouro modificado com platina para injeções de $150 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrogênio em função da vazão aplicada, a qual variou de $0,5$ a $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. As correntes de oxidação permanecem praticamente constantes

quando as vazões variaram de 0,5 a 3,0 mL min⁻¹, enquanto que para vazões muito altas a enzima imobilizada no reator não elimina totalmente o peróxido de hidrogênio. A vazão de 2 mL min⁻¹ foi eleita a mais favorável, uma vez que ela combina boa repetibilidade, alta frequência analítica (90 amostras h⁻¹), baixo consumo de solução carreadora e a eliminação total do H₂O₂.

Figura 32. Variação do sinal analítico do H_2O_2 $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em microeletrodo de ouro modificado com platina com a vazão (0,5 a 5,0 mL min⁻¹), (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 2,0; (d) 3,0; (e) 4,0 e (f) 5,0 mL min⁻¹ em um canal sem (I) e com catalase (II). Condições: volume de amostra injetada, 150 μL ; potencial aplicado, +0,60 V vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$; meio de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0).

Um outro parâmetro do sistema FIA estudado foi o volume de amostra injetada. A Figura 33 mostra a influência do volume de amostra injetada nos sinais de corrente de oxidação H_2O_2 . Loops de 50 a 250 μL foram testados. Quando o volume de amostra injetada aumenta, o sinal amperométrico cresce, mas o tempo de análise também é aumentado, uma vez que o processo de

lavagem da célula requer um tempo mais longo. O volume de 150 μL foi escolhido para ser usado nas análises de peróxido de hidrogênio em água de chuva. Em todos os volumes estudados a catalase imobilizada no reator tubular eliminou totalmente o H_2O_2 nas amostras.

Figura 33. Variação do sinal analítico do H_2O_2 $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em microeletrodo de ouro modificado com platina com o volume de mostra injetada (50 a 250 μL), (a) 50; (b) 100; (c) 150; (d) 200 e (e) 250 μL em um canal sem (I) e com catalase (II). Condições: vazão, 2,0 mL min^{-1} ; potencial aplicado, +0,60 V vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$; meio de tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 7,0).

Para avaliar a lavagem da célula em fluxo contendo o microeletrodo de ouro modificado com platina, experimentos envolvendo injeções consecutivas de soluções de peróxido de hidrogênio com diferentes concentrações foram realizadas. Os experimentos demonstraram a ausência do efeito *carry-over* atribuído ao pequeno volume da célula, estimado em $19 \pm 1 \mu\text{L}$, e a sua configuração de camada delgada.

4.3.3. Calibração e Determinação de Peróxido de Hidrogênio em Amostras de Água de Chuva

Após os estudos preliminares, foi feito um teste para se verificar a recuperação do método proposto. Como pode ser observado na Figura 34, o método obteve uma recuperação de 104 % para um padrão de peróxido de hidrogênio de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Utilizando as condições descritas acima, passou-se ao estudo analítico para a determinação de peróxido de hidrogênio em água de chuva. Para este analito, observou-se excelente linearidade e boa repetibilidade. Uma série típica de medidas ($\text{H}_2\text{O}_2 = 1 \text{ a } 10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) é apresentada na Figura 35. A proporcionalidade entre as correntes de oxidação e as concentrações de peróxido de hidrogênio pode ser evidenciada na curva de calibração inserida na Figura 35, a qual apresentou um coeficiente angular de $83,8 \mu\text{A L mol}^{-1}$ e coeficiente de correlação de 0,999. Outra observação importante é com relação ao fator sinal / ruído, podendo verificar a alta estabilidade da linha base obtida para os baixos níveis de concentrações utilizadas. O limite de detecção do método foi calculado com base no desvio padrão do branco, sendo encontrado um valor de $2,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (3 σ) com RSD < 1 % [176].

Conhecidos os principais parâmetros definidos para o sistema FIA e tendo uma curva analítica bastante reprodutível, partiu-se para a determinação de peróxido de hidrogênio em amostras ambientais. Foram coletadas e analisadas 10 amostras como descrito em item anterior. Construiu-se uma curva analítica na faixa de 1×10^{-6} a $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e posteriormente as amostras foram injetadas no sistema FIA com e sem o reator enzimático, para que pudesse ser compensada a corrente de oxidação referente ao material interferente. Na Tabela 14 e Figura 36 pode ser visto os resultados obtidos para as amostras analisadas, bem como uma comparação feita destes resultados com os obtidos por mais dois métodos, amperometria com eletrodo de mercúrio [160] e detecção espectrofotométrica [177]. O método de determinação de peróxido de hidrogênio usando eletrodo de gota de mercúrio foi desenvolvido pelo aluno de doutorado Flávio Rocha do grupo do Prof. Dr. Ivano G. R. Gutz. Fazendo uma regressão linear dos dois métodos amperométricos foram encontrados coeficientes angular e linear muito próximos de 1 e zero, respectivamente. Os intervalos de confiança para tais

coeficientes são $(1,03 \pm 0,03)$ e $(-0,26 \pm 0,38) \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente para um nível de confiança de 95 %, sendo encontrado um coeficiente de correlação de 0,9999. Comparando os resultados obtidos pela amperometria usando microeletrodo de ouro modificado com platina e espectrofotometria foram encontrados coeficientes de $(1,01 \pm 0,02)$ e $(-0,12 \pm 0,23) \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente para um nível de confiança de 95 %, sendo encontrado um coeficiente de correlação de 0,999. Com base nesses resultados podemos afirmar que nenhuma diferença significativa entre os métodos foi observada.

Figura 34. Testes de recuperação para o H_2O_2 $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em amostra de água de chuva. Condições: vazão, $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra injetada, $150 \mu\text{L}$; potencial aplicado, $+0,60 \text{ V}$ vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$; meio de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Figura 35. Injeções repetitivas de 150 μL de amostra contendo: (a) 1; (b) 2; (c) 4; (d) 6; (e) 8; (f) $10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Condições: vazão, $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; potencial aplicado, $+0,60 \text{ V}$ vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$; meio de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Tabela 14. Resultados obtidos na análise de peróxido de hidrogênio em água de chuva.

Amostras	[H ₂ O ₂], $\mu\text{mol L}^{-1}$		
	Au/Pt Microeletrodo	Hg Microeletrodo	Espectrofotometria
1	1,68 $\pm$ 0,04	1,87 $\pm$ 0,02	1,73 $\pm$ 0,04
2	1,77 $\pm$ 0,03	1,80 $\pm$ 0,01	1,79 $\pm$ 0,04
3	4,78 $\pm$ 0,04	4,78 $\pm$ 0,04	4,79 $\pm$ 0,03
4	4,23 $\pm$ 0,08	3,59 $\pm$ 0,07	4,15 $\pm$ 0,05
5	3,86 $\pm$ 0,04	3,53 $\pm$ 0,07	3,68 $\pm$ 0,03
6	4,05 $\pm$ 0,05	3,95 $\pm$ 0,06	3,99 $\pm$ 0,02
7	2,83 $\pm$ 0,05	3,17 $\pm$ 0,09	2,96 $\pm$ 0,02
8	29,5 $\pm$ 0,4	31,6 $\pm$ 0,3	30,5 $\pm$ 0,2
9	16,9 $\pm$ 0,4	16,4 $\pm$ 0,2	15,9 $\pm$ 0,2
10	22,4 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,5	22,0 $\pm$ 0,5

Figura 36. Comparação dos resultados obtidos entre amperometria diferencial usando microeletrodo de ouro modificado pela eletrodeposição de platina, amperometria diferencial usando microeletrodo de mercúrio e espectrofotometria para análise de peróxido de hidrogênio em água de chuva.

4.4. Conclusões

Este trabalho apresentou a potencialidade dos microeletrodos de ouro modificados com platina associados a técnicas de análise em fluxo, para detecção de peróxido de hidrogênio em amostras de água de chuva usando catalase imobilizada em reator tubular. A alta sensibilidade das técnicas amperométricas combinadas com o pequeno volume da célula eletroquímica gerou um trabalho possível de se realizar com pequenos volumes de amostra e baixas concentrações. Este trabalho apresenta a possibilidade de se eliminar etapas de separação, extração e filtração, as quais aumentam em muito os custos da análise. O método apresentou uma frequência analítica de 90 amostras h^{-1} .

Capítulo 5

ANÁLISE AMPEROMÉTRICA SIMULTÂNEA DE GLICOSE E ÁCIDO ÚRICO USANDO MICROELETRODOS DE OURO MODIFICADOS ENZIMATICAMENTE

5.1. Introdução

A importância dos biossensores eletroquímicos, nas últimas décadas, teve um grande avanço devido às vantagens oferecidas pela especificidade dos sistemas bioquímicos e pela utilização de transdutores eletroquímicos. Diferentes eletrodos podem ser facilmente modificados pelo uso de biomacromoléculas (enzimas, anticorpos, organelas, células microbiológicas e tecido de espécies vivas), obtendo assim um reconhecimento bioquímico seletivo. Ao mesmo tempo os eletrodos podem ser modificados para melhor imobilizar mediadores de elétrons dos sistemas bioquímicos e/ou catalisadores químicos melhorando os transdutores e a seletividade eletroquímica [178].

No mundo, diversos pacientes sofrem de diabetes *mellitus*, resultante da deficiência de insulina [179], a qual é controlada pelo monitoramento da glicose no sangue, sendo necessária a injeção de insulina diariamente, como tratamento médico de pacientes diabéticos. Diariamente são realizados milhões de ensaios para a determinação de glicose em sangue, portanto um analito de interesse especial, e por consequência um dos biossensores mais investigados. A proporção de patentes para biossensores de glicose corresponde a cerca de 50 % de todas as patentes nesta área [180-182].

Até o momento, poucos biossensores eletroquímicos baseados na utilização de enzimas para glicose são utilizados em laboratórios de análises clínicas. Recentemente um especial interesse tem sido demonstrado no desenvolvimento de biossensores miniaturizados [183-184] para o monitoramento de glicose com possibilidade de uso em aplicações clínicas.

A glicose (I) pode ser oxidada diretamente sobre eletrodo ativado de platina gerando ácido glucônico (II) [178]. Este tipo de sensor apresenta várias desvantagens para ser utilizado em aplicações clínicas, onde a falta de seletividade e a adsorção sobre o eletrodo são as principais desvantagens deste método. Por isto, a preferência tem sido dada ao uso de enzimas seletivas acopladas a biossensores amperométricos para glicose. A glicose oxidase é a enzima mais comumente usada nos diferentes tipos de biossensores para glicose, devido principalmente a sua solubilidade em meio aquoso, alta estabilidade, alta especificidade pela glicose e seu baixo custo [185]. Esta enzima catalisa a reação de oxidação da glicose, conforme Esquema 5.

Esquema 5. Reação de oxidação da glicose (I) a ácido glucônico (II).

A concentração de glicose pode ser determinada eletroquimicamente pela medição da corrente resultante da oxidação ou redução do peróxido de hidrogênio, ou até mesmo pela redução da corrente catódica devido a redução de oxigênio. Nas análises clínicas, onde os possíveis interferentes são os ácidos ascórbico e úrico, é preferível trabalhar em potenciais menos positivos, uma vez que estes ácidos são facilmente oxidados em potenciais mais positivos, interferindo consequentemente nas medidas.

Outro importante problema a ser destacado, quando se trata de desenvolvimento de biossensores enzimáticos para glicose, é a imobilização da enzima e o uso de mediadores, os quais podem eliminar problemas de interferências [186-189]. Diferentes materiais porosos e condutores são usados para imobilizar o sistema mediador de elétron / enzima, tais como: polímeros condutores [186], pasta de carbono [187], platina [188] e fibra de carbono [189].

Para análise de grandes quantidades de amostras de glicose em laboratórios clínicos existe uma tendência no uso de técnicas de análise por injeção em fluxo e diversos trabalhos tem mostrado a aplicação de sensores para glicose com detectores amperométricos em FIA [189-190].

Atualmente, o elevado número de amostras a serem diariamente analisadas nos laboratórios de análises clínicas, tem direcionado as pesquisas no sentido de obter metodologias para determinações simultâneas de dois ou mais analitos de interesse clínico. Okawa e colaboradores [189] desenvolveram

um método de análise por injeção em fluxo para determinação de glicose e ácido úrico em soro sanguíneo, onde o ácido úrico era determinado coulometricamente, enquanto que a glicose era quantificada através de um biossensor eletroquímico. Milardovic e colaboradores [178] propuseram um método para determinação de glicose em sangue usando um biossensor amperométrico baseado na imobilização de glicose oxidase em eletrodo de níquel modificado com hexacianoferrato. Wang et al. [183] desenvolveram um método para determinação de glicose baseado na deposição eletroquímica de irídio e glicose oxidase em eletrodos de fibra de carbono.

Ácido úrico (I), como um produto do metabolismo da purina, é um constituinte dos fluídos biológicos. Tem sido demonstrado que anormalidades de ácido úrico leva a diversos sintomas de doenças [191]. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia simples e rápida para análises de rotina. Diversos métodos têm sido desenvolvidos, dentre eles, um método eletroquímico utilizando eletrodo de pasta de carbono pré-tratado eletroquimicamente [191]. Um outro método é baseado na conversão do ácido úrico pela uricase em alantoína (II) e peróxido de hidrogênio (Esquema 6), o qual na presença de peroxidase, oxida o cromógeno, formando um composto vermelho determinado espectrofotometricamente [192], sendo este último método utilizado para comparação dos resultados obtidos neste trabalho.

Matos e colaboradores [105] desenvolveram uma metodologia para determinação dos ácidos úrico e ascórbico em urina usando microeletrodos de ouro modificados com paládio e detecção amperométrica diferencial, usando ascorbato oxidase e uricase para oxidar o ácido ascórbico e o ácido úrico, respectivamente.

Esquema 6. Reação de oxidação do ácido úrico (I) a alantoína (II) e peróxido de hidrogênio.

Neste trabalho estamos propondo a determinação simultânea de glicose e ácido úrico em amostras clínicas usando biossensores amperométricos a partir da modificação de microeletrodos de ouro com platina/glicose oxidase. Testes para definir parâmetros do sistema de análise por injeção em fluxo e eletroquímicos foram realizados e serão mostrados no decorrer deste capítulo.

5.2. Materiais e Métodos

Este item tem o objetivo de fornecer informações quanto aos materiais e à instrumentação usada para o desenvolvimento deste trabalho.

5.2.1. Reagentes e Soluções

Todas as soluções utilizadas nos experimentos foram preparadas com água deionizada obtida do sistema Nanopure da Barnsted e os reagentes usados foram de grau analítico. O ácido úrico, a 4-aminoantipirina, o fenol, a glicose e a enzima glicose oxidase (EC 1.1.3.4) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). O acetato de celulose foi obtido da Aldrich (Milwaukee, USA). O sistema tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,0) usado como eletrólito suporte foi preparado a partir de sais P.A. da Merck (Darmstadt, Germany). Todas as soluções foram preparadas antes das análises.

5.2.2. Eletrodos e Célula Eletroquímica

Como eletrodo de trabalho foram utilizados dois microeletrodos de ouro obtidos a partir de um circuito integrado [143], como descrito nos capítulos anteriores. Os microeletrodos foram modificados eletroquimicamente pela

eletrodeposição de platina presentes numa solução de K_2PtCl_6 (2 mmol L^{-1} e pH 4,8), num potencial de $-1,0 \text{ V}$ por um tempo de 15 minutos [104]. Estes microeletrodos, após a modificação, se mostraram estáveis por pelo menos 8 dias de uso. Momentos antes de realizar a modificação da superfície, os microeletrodos foram polidos com alumina de 3 e de $0,05 \mu\text{m}$ e, após cada polimento, os microeletrodos foram submetidos a tratamento com ultrassom por 5 minutos. Como eletrodo de referência foi usado um eletrodo miniaturizado de $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat.})}$ construído em nosso laboratório [144] e como eletrodo auxiliar foi usado uma agulha de aço inoxidável. A célula eletroquímica utilizada neste trabalho foi à mesma usada em outros trabalhos, já apresentada nos capítulos anteriores (Figuras 8A e 8B).

5.2.3. Instrumentação

As medições amperométricas foram realizadas usando um sistema de análise por injeção em fluxo descrito anteriormente. Foi usada uma célula de quatro eletrodos, dos quais; dois eram eletrodos de trabalho, um de referência e um auxiliar. As medições foram realizadas no potenciostato multicanal [34] desenvolvido ainda no mestrado.

5.2.4. Construção do Biossensor

A glicose não apresentou uma boa sensibilidade aos microeletrodos de ouro modificados com platina, fazendo-se necessário o uso da glicose oxidase, a qual converte a glicose em peróxido de hidrogênio, analito facilmente oxidado na superfície dos microeletrodos usados. Assim foi desenvolvido um biossensor eletroquímico, conforme Figura 37 [193], ao qual após a modificação eletroquímica com platina era adicionada 1 mg de glicose oxidase e por fim $10 \mu\text{L}$ de acetato de celulose $0,1 \%$, usada para fixar a enzima na superfície do microeletrodo.

Figura 37. Diagrama esquemático do biossensor para determinação de glicose.

Para confecção deste biossensor, alguns estudos iniciais foram realizados, afim de obter uma melhor sensibilidade, dentre eles pode-se destacar: o tempo de deposição da platina, a eletrodeposição de uma mistura de platina + glicose oxidase, a escolha do polímero condutor e a quantidade deste polímero que seria suficiente para segurar a enzima na superfície do microeletrodo, bem como possibilitar a migração das moléculas de glicose para a superfície dos microeletrodos. Como resultados destes estudos verificou-se que um tempo de 15 minutos de deposição e 10 µL de acetato de celulose 0,1 % eram suficientes para obter um microeletrodo com boa sensibilidade para nossos estudos. Testes envolvendo a eletrodeposição simultânea de platina + glicose oxidase não se mostraram eficientes, provavelmente devido à pequena quantidade de enzima que permanece na superfície do microeletrodo após a modificação.

Definida as condições da preparação do biossensor, passou-se a investigar o sistema eletroquímico de determinação de glicose. Durante todos os testes foram observados os resultados obtidos para até quatro potenciais de trabalho, sendo que o potencial - 0,2 V foi o que apresentou melhores resultados, quanto à sensibilidade, à reprodutibilidade, à não saturação da superfície do microeletrodo e foi a condição que apresentou à melhor correlação entre corrente de redução do peróxido e concentração de glicose.

5.3. Resultados e Discussões

Como um dos objetivos do projeto inicial foi a determinação simultânea de glicose e ácido úrico em urina, passou-se a investir um certo tempo nesta etapa do trabalho. Buscou-se, inicialmente, estudar o comportamento de soluções de glicose sobre microeletrodos de ouro modificados com platina, uma vez que o comportamento eletroquímico do ácido úrico já havia sido estudado em trabalhos anteriores.

5.3.1. Caracterização do Biossensor

Nesta etapa do desenvolvimento da metodologia buscou-se avaliar o comportamento do biossensor na presença de duas soluções com concentrações diferentes de glicose, para isso foram utilizadas soluções com concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹ de glicose, foram aplicados potenciais de trabalho de - 0,30, - 0,20, 0 e + 0,20 V. Na Figura 38 observa-se que nos três primeiros potenciais aparece uma corrente de redução do peróxido de hidrogênio, enquanto que em + 0,20 V aparece uma corrente de oxidação, também não foi verificado nenhum tipo de efeito de memória, mostrando que o biossensor estava trabalhando de forma adequada com uma boa lavagem da sua superfície pelo fluxo de eletrólito.

Figura 38. Variação do sinal analítico da glicose 1×10^{-3} (I) e 5×10^{-3} (II) mol L⁻¹ no biossensor amperométrico. Condições: volume de amostra, 100 μ L; potenciais aplicado, (a) – 0,30 V, (b) – 0,20 V, (c) 0 V e (d) + 0,20 V vs Ag/AgCl_(sat); meio de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹; vazão, 5 mL min⁻¹.

5.3.2. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo

Influência da vazão na determinação de glicose

A influência da vazão do sistema na determinação de glicose foi um outro parâmetro estudado. Na Figura 39 podem ser observados os resultados obtidos para uma curva de calibração com concentrações de glicose entre 1 e 10×10^{-4} mol L⁻¹ com vazões variando de 0,5 a 5 mL min⁻¹, podendo-se verificar que existe uma dependência do sinal analítico com a vazão do sistema FIA, uma vez que quanto menor a vazão menos linear é a resposta obtida pelo biossensor, isso pode ser explicado pelo fato de que na superfície do microeletrodo existe a oxidação da glicose pela glicose oxidase em peróxido e este é reduzido no microeletrodo, e quanto menor for a vazão mais demorada é

a renovação da superfície do microeletrodo. Neste ponto deve ser levada em consideração o processo de difusão através do filme de acetato de celulose, onde a difusão no seu interior pode ser 10^4 ou 10^5 vezes mais lenta. O fluxo de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ foi considerado como sendo o que melhor satisfaz os seguintes aspectos: sinal obtido e velocidade de análise, apesar de se ter um gasto maior de reagentes.

Figura 39. Variação do sinal analítico da glicose 1 a $10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ no biossensor amperométrico. Condições: vazão de fluxo, (a) 0,5, (b) 1,0, (c) 2,0, (d) 3,0, (e) 4,0 e (f) $5,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra, $100 \mu\text{L}$; potencial aplicado, $-0,20 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$; meio de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Curva analítica para a glicose

Utilizando as condições descritas anteriormente, passou-se ao estudo analítico para a determinação de glicose em amostras sintéticas. Foram obtidas curvas analíticas em quatro potenciais de trabalho. Observou-se excelente linearidade e boa reprodutibilidade para a curva obtida usando um potencial de trabalho de $-0,20 \text{ V}$, condição muito favorável para minimizar os efeitos de outros interferentes. Uma série típica de medidas (glicose = 1 a $10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) é apresentada nas Figuras 40 e 41. O limite de detecção (3 σ) e quantificação encontrado para o método foi $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente [176]. Como se pretende determinar glicose em amostras de

urina, onde as concentrações de glicose estão na faixa de 10^{-3} mol L⁻¹, o método foi considerado muito satisfatório.

Figura 40. Injeções repetitivas de 100 μ L de amostra de glicose contendo: 1, 2, 4, 6, 8 e 10 $\times 10^{-4}$ mol L⁻¹ no biossensor amperométrico. Condições: potenciais de trabalho, (a) - 0,30 V, (b) - 0,20 V, (c) 0 V e (d) + 0,20 V vs Ag/AgCl_(sat); meio de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0); vazão, 5 mL min⁻¹; volume de amostra, 100 μ L.

Figura 41. Injeções repetitivas de 100 μL de amostra de glicose contendo: (a) 1,0, (b) 2,0, (c) 4,0, (d) 6,0 e (e) 8,0 $\times 10^{-4}$ mol L⁻¹ no biossensor amperométrico. Condições: potenciais de trabalho, - 0,20 V vs Ag/AgCl_(sat); meio de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0); vazão, 5 mL min⁻¹; volume de amostra, 100 μL .

5.3.3. Análise Simultânea de Glicose e Ácido Úrico

Após definir as condições ótimas para a determinação de glicose, passou-se a estudar a possibilidade da determinação simultânea de ácido úrico e glicose em amostras de urina, uma vez que o objetivo deste trabalho é definir condições para a determinação simultânea de dois ou três analitos de interesse na urina. Na Figura 42 pode ser observado que estudos envolvendo ácido úrico e glicose foram realizados em diferentes potenciais usando o microeletrodo de ouro modificado com platina e o biossensor para glicose. Observou-se que em potenciais a partir de + 0,20 V, o microeletrodo de ouro modificado com platina apresentou corrente de oxidação para o ácido úrico. Entretanto, para potenciais negativos, mais precisamente - 0,20 V o biossensor apresentou corrente de redução para o peróxido de hidrogênio gerado a partir da oxidação da glicose pela glicose oxidase.

Figura 42. Determinação simultânea de ácido úrico e glicose usando microeletrodo de ouro modificado com platina (a e b) e biossensor (c e d). Condições: Potenciais de trabalho, - 0,30, - 0,20, 0 e + 0,20 V vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$; meio de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); vazão, 5 mL min^{-1} ; volume de amostra, $100 \text{ }\mu\text{L}$.

Determinação espectrofotométrica de glicose [193]

Para comparar os resultados obtidos utilizou-se o biossensor amperométrico utilizaremos o método padrão para a determinação de glicose nos laboratórios de análises clínicas que é o método espectrofotométrico. Este método baseia-se no fato de que a glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:

O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

Com base nessas reações foi montado o método para a determinação espectrofotométrica para a glicose. A Figura 43 mostra o espectro de absorção da antipirilquinonimina, sendo observado que o melhor comprimento de onda foi em 505 nm. Obtido o comprimento de onda de máxima absorção desenvolveu-se uma curva analítica na faixa de 1 a $10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, demonstrando o bom comportamento do método espectrofotométrico para a determinação de glicose.

Figura 43. (A) Espectro de absorção e (B) curva analítica para a determinação espectrofotométrica de glicose.

Determinação espectrofotométrica de ácido úrico [193]

A determinação espectrofotométrica de ácido úrico apresenta o mesmo princípio que o método da glicose, entretanto se usa a uricase no lugar da glicose oxidase, uma vez que a uricase converte o ácido úrico em alantoína e peróxido de hidrogênio, conforme Esquema 6.

O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de ácido úrico na amostra.

Com base nessas reações foi montado o método para a determinação espectrofotométrica para o ácido úrico. A Figura 44 mostra o espectro de absorção da antipirilquinonimina, sendo observado que o melhor comprimento de onda foi em 505 nm. Obtido o comprimento de onda de máxima absorção desenvolveu-se uma curva analítica na faixa de 1 a 10×10^{-5} mol L⁻¹, demonstrando a bom comportamento do método espectrofotométrico para a determinação de ácido úrico.

Figura 44. (A) Espectro de absorção e (B) curva analítica para a determinação espectrofotométrica de ácido úrico.

A metodologia analítica desenvolvida neste trabalho foi aplicada para a determinação simultânea de ácido úrico e glicose em amostras sintéticas. Foram analisadas 10 amostras sintéticas, cujos resultados podem ser encontrados na Tabela 15. As concentrações de ácido úrico e glicose foram escolhidas de acordo com a liberação diária destes analitos na urina de uma pessoa normal. Os resultados foram comparados com os obtidos pelo método espectrofotométrico para determinação destes analitos em laboratórios de análises clínicas. Fazendo uma regressão linear dos dois métodos, tanto para o ácido úrico como para a glicose, foram encontrados coeficientes angulares e lineares muito próximos de 1 e zero, respectivamente, como pode ser visto na Figura 45. O intervalo de confiança para os coeficientes angulares e lineares foram $(1,03 \pm 0,06)$ e $(-0,02 \pm 0,04)$ g, respectivamente para o ácido úrico com um nível de confiança de 95 %. Para a glicose, o intervalo de confiança para os coeficientes angulares e lineares foram $(0,90 \pm 0,08)$ e $(0,03 \pm 0,02)$ g, respectivamente com um nível de confiança de 95 %.

Tabela 15. Resultados obtidos na análise de ácido úrico e glicose em amostras sintéticas.

Amostras	Massa / g			
	Ácido Úrico		Glicose	
	Au/Pt Microeletrodo	Espectrofotometria	Biossensor	Espectrofotometria
1	$0,50 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,02$
2	$0,49 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,00$	$0,24 \pm 0,01$
3	$0,38 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,00$
4	$0,85 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,02$
5	$0,66 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,02$
6	$0,73 \pm 0,02$	$0,73 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,00$	$0,28 \pm 0,01$
7	$0,58 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
8	$0,65 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,00$	$0,21 \pm 0,00$
9	$0,72 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$
10	$0,37 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,00$

Figura 45. Comparação dos resultados obtidos entre amperometria e espectrofotometria para a determinação de glicose e ácido úrico.

5.4. Conclusões

Este trabalho apresentou a potencialidade dos microeletrodos de ouro modificados com platina + enzimas (glicose oxidase) associados a técnicas de análise em fluxo, para detecção simultânea de ácido úrico e glicose em amostras de urina. A alta sensibilidade das técnicas amperométricas combinadas à seletividade do uso de biossensores e com o pequeno volume a célula eletroquímica gerou um trabalho possível de se realizar com pequenos volumes de amostra. Este trabalho apresenta a possibilidade de se analisar simultaneamente dois analitos de grande interesse clínico, além de eliminar etapas de separação, extração e filtração, as quais aumentam em muito os custos da análise. O método apresentou uma frequência analítica de 90 amostras h^{-1} .

Capítulo 6

CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS

Fazendo uma avaliação global do trabalho desenvolvido e comparando com o que foi proposto no plano inicial, chegamos a conclusão que os objetivos foram alcançados, e que este trabalho se constituiu em uma contribuição na área da química eletroanalítica. Como o trabalho aborda vários temas, desde o estudo de análise simultânea usando microeletrodos modificados com diferentes metais nobres até o uso de biossensores, a seguir faremos nossas considerações finais e apresentaremos algumas perspectivas futuras sobre cada um dos temas abordados.

6.1. Considerações Finais

A construção de sensores de baixo custo e confiáveis, obtidos a partir da produção em larga escala tem recebido grande atenção da comunidade científica. Tal fato pode ser comprovado pelo aumento do número de publicações nos últimos anos, principalmente para os sensores de massa, amperométricos, condutométricos e ópticos. Com o advento da microeletrônica e da construção de sensores inteligentes muitos sensores podem ser utilizados para monitorar espécies de interesse em sistemas *in-vivo*, além de possibilitar o desenvolvimento de uma instrumentação portátil.

No primeiro dos temas estudados neste trabalho foram utilizadas ferramentas quimiométricas para a resolução das misturas de AA, DA, EP e DI, sendo usada a calibração multivariada (MLR e PLS). Esta metodologia apresentou resultados muito satisfatórios, especialmente considerando os baixos níveis de concentração e a similaridade das ondas de oxidação dos quatro analitos estudados, inclusive sendo empregada na análise simultânea de ácido ascórbico e dipirona em formulações farmacêuticas, onde os resultados apresentados mostraram uma boa concordância com os métodos padrões de análise. Este método permite análises sem separações prévias, além da possibilidade de se realizar múltiplas análises até uma nova recalibração.

Um outro tema explorado neste trabalho foi a detecção de peróxido de hidrogênio em amostras de água de chuva usando catalase imobilizada em reator tubular. Os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com os espectrofotométricos e amperométricos com eletrodo de gota de mercúrio, obtendo uma boa concordância. Este trabalho abre caminhos para uma nova

maneira de se imobilizar enzimas usando resina de troca iônica Amberlite IRA – 743.

O terceiro e último tema explorado foi a potencialidade dos microeletrodos de ouro modificados com platina + enzimas (glicose oxidase) associados à técnicas de análise em fluxo, para detecção simultânea de ácido úrico e glicose em amostras de urina. Neste trabalho os resultados encontrados foram comparados com os obtidos por espectrofotometria, ao quais apresentaram uma boa concordância.

Todos os trabalhos aqui apresentados apresentaram como principais vantagens, a rapidez, a simplicidade das medições e o baixo custo operacional. Entretanto, uma das desvantagens deste trabalho é no que se refere ao uso da calibração multivariada, que para ser implantada necessita de um número muito grande de experimentos, no caso da determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona foram necessárias 16 misturas de calibração para a validação do modelo quimiométrico.

6.2. Perspectivas de Trabalhos Futuros

O presente trabalho abre numerosas perspectivas para a realização de trabalhos futuros, cabendo destacar os seguintes aspectos:

- A associação dos microeletrodos individualmente modificados com os métodos quimiométricos e a metodologia de análise por injeção em fluxo se mostrou uma forma poderosa na resolução de misturas multicomponentes. Novas formas de modificação de eletrodos, o aumento do número de multicomponentes e de sensores, a associação de diferentes transdutores (por exemplo eletroquímicos, ópticos, de massa, etc) poderão possibilitar a resolução de misturas cada vez mais complexas. A evolução dos métodos quimiométricos por sua vez se constituem em ferramenta indispensável para a evolução de tais métodos. A curto prazo, outros estudantes do grupo deverão fazer uso de tais métodos para a quantificação de aminoácidos em amostras de nutrientes parenterais. Outra aplicação potencial é a realização de estudos visando a quantificação de metais pesados em amostras de água de abastecimento e de chuva.

- A nova forma de imobilização enzimática desenvolvida neste trabalho abriu interessantes perspectivas, uma vez que se trata de forma rápida, simples e de fácil execução. Novos estudos (envolvendo outras enzimas) estão em andamento e esta linha poderá ser explorada para diversas aplicações. A possibilidade de realizar medições diferenciais em fluxo abre numerosas perspectivas de trabalho para quantificar analitos em amostras complexas.
- A modificação de eletrodos de ouro por eletrodeposição de paládio e platina em diferentes pHs, mostrou que o depósito realizado em pH 4,8 apresenta maior capacidade de catálise. Um estudo fundamental, visando caracterizar os filmes formados poderá ser fundamental para a compreensão desta catálise. A aplicação de tais filmes sobre eletrodos de ouro obtidos a partir de CDs graváveis levou a interessantes aplicações para a quantificação de espécies de interesse farmacêutico.
- A construção de microbiossensores via deposição de enzimas e de filmes poliméricos sobre os microeletrodos de circuitos integrados se mostrou viável, possibilitando a realização de quantificações em fluxo com pequenos volumes de amostras (tipicamente 100 μ L). O desenvolvimento de novas formas de fixação destas e de novas enzimas sobre os microeletrodos poderá levar ao desenvolvimento de conjuntos para multiespecificação de grande interesse na área clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fritz, J. S., Schenk, G. H.; *Quantitative Analytical Chemistry*, Fifth Edition, New Jersey, 1987.
2. Janata, J., Josowicz, M., Vanýsek, P., DeVaney, D. M.; *Anal. Chem.*, **70** (1998) 179R.
3. Cattrall, R. W.; *Chemical Sensors*, Oxford Science Publications, New York, 1997.
4. Riley, T., Tomlinson, C.; *Principles of Electroanalytical Methods*, John Wiley & Sons, New York, 1987.
5. Brett, A. M. O., Brett, C. M. A.; *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*, Livraria Almedina, Coimbra, 1996.
6. Meglen, R. R.; *Chemometrics Intell. Lab. Systems*, **3** (1988) 17.
7. Thomas, E. V., Haaland, D. M.; *Anal. Chem.*, **62** (1990) 1091.
8. Thomas, E. V.; *Anal. Chem.*, **66** (1994) 795A.
9. Martens, H., Naes, T.; *Multivariate Calibration*, John Wiley, London, 1993.
10. Cladera, A., Gomez, E., Estela, J. M., Cerdá, V.; *Anal. Chim. Acta*, **267** (1992) 95.
11. Poppi, R. J.; "Quantificação de Picos Cromatográficos Superpostos por Métodos de Calibração Multivariada", Dissertação de mestrado, 1989, Instituto de Química – UNICAMP.
12. Lukkari, I., Lindberg, W.; *Anal. Chim. Acta*, **211** (1988) 1.
13. Fearn, T.; *Appl. Stat.*, **32** (1983) 73.
14. Oman, S. D., Naes, T., Zube, A.; *J. Chemom.*, **7** (1993) 195.
15. Haaland, D. M.; *Anal. Chem.*, **60** (1988) 1208.
16. Small, G. A., Arnold, M. A., Marquardt, L. A.; *Anal. Chem.*, **65** (1993) 3279.
17. Bhandare, P., Mendelson, Y., Puera, R. A., Janatsch, G., Kruse-Jarres, J. D., Marbach, R., Heise, H. M.; *Appl. Spectrosc.*, **47** (1993) 1214.
18. Robinson, M. R., Eaton, R. P., Haaland, D. M., Koepp, G. W., Thomas, E. V., Stallard, B. R., Robinson, P. L.; *Clin. Chem.*, **38** (1992) 1618.
19. Brown, S. D., Bear, R. S., Blank, T. B.; *Anal. Chem.*, **64** (1992) 22R.
20. Geladi, P., Kowalski, B. R.; *Anal. Chim. Acta*, **185** (1986) 1.

21. Sjöström, M., Wold, S., Lindberg, W., Persson, J., Martens, H.; *Anal. Chim. Acta*, **150** (1983) 61.
22. Pimentel, M. F., Neto, B. B., Araújo, M. C. V., Pasquini, C.; *Spectrochim. Acta*, **52B** (1997) 2151.
23. Saldanha, T. C. B., Araújo, M. C. U., Neto, B. B., Chame, H. C.; *Anal. Letters*, **33(6)** (2000) 1187.
24. Draper, N., Smith, H.; *Applied Regression Analysis*, Wiley, New York, 1981.
25. Thomas, E. V.; *Anal. Chem.*, **66** (1994) 795A.
26. Sharaf, M. A., Illman, D. L., Kowalski, B. R.; *Chemometrics*, Wiley, New York, 1986.
27. Golub, G., Van Loan, C.; *Matrix Computations*, John Hopkins, Baltimore, 1989.
28. Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Deming, S. N. et al; *Chemometrics: a textbook*, Elsevier, Amsterdam, 1988.
29. Hoogvliet, J. C., Reijn, J. M., Bennekou, W. P. van; *Anal. Chem.*, **63** (1991) 2418.
30. Matsue, T., Aoki, A., Ando, E., Uchida, I.; *Anal. Chem.*, **62** (1990) 407.
31. Fielden, P. R., McCreedy, T.; *Anal. Chim. Acta*, **273** (1993) 111.
32. Fang, T., McGrath, M., Diamond, D., Smyth, M. R.; *Anal. Chim. Acta*, **305** (1995) 347.
33. Paeschke, M., Dietrich, F., Uhlig, A., Hintsche, R.; *Electroanalysis*, **8** (1996) 891.
34. Matos, R. C., Angnes, L., Lago, C. L.; *Instrum. Sci. Technol.*, **26** (1998) 451.
35. Last, T. A.; *Anal. Chem.*, **55** (1983) 1509.
36. Meyer, H., Drewer, H., Gründig, B., Cammann, K., Kakerow, R., Manoli, Y., Mokwa, W., Rospert, M.; *Anal. Chem.*, **67** (1995) 1164.
37. McGrath, M. J., Fang, T., Diamond, D., Smyth, M. R.; *Anal. Letters*, **28(4)** (1995) 685.
38. Kissinger, P. T., Heinemann, W. R.; *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, 1^a ed., New York, 1984.
39. Kassai, N., Matsue, T., Uchida, I.; *Electroanalysis*, **8** (1996) 748.
40. Paeschke, M., Dietrich, F., Uhlig, A., Hintsche, R.; *Electroanalysis*, **8** (1996) 891.
41. Aoki, A., Matsue, T., Uchida, I.; *Anal. Chem.*, **64** (1992) 44.

42. Schwabe, K., Oelssner, W., Suschke, H. D. Z.; *Phys. Chem. Leipzig*, **261** (1980) 113.
43. Dees, D. W., Tobias, C. W.; *J. Electrochem. Soc.*, **134** (1987) 369.
44. Aoki, A., Matsue, T., Uchida, I.; *Anal. Chem.*, **62** (1990) 2206.
45. Rohwedder, J. J. R., Pasquini, C.; *Analyst*, **123** (1998) 1641.
46. Rohwedder, J. J. R., Pasquini, C.; *Analyst*, **123** (1998) 1861.
47. Wang, J., Rayson, G. D., Lu, Z., Wu, H.; *Anal. Chem.*, **62** (1988) 1924.
48. Herrero, A., Ortiz, M. C.; *Talanta*, **49** (1999) 801.
49. Herrero, A., Ortiz, M. C.; *Talanta*, **46** (1998) 129.
50. Wang, J.; *Stripping Analysis. Principles, Instrumentation and Applications*, VCH Publishers, Deerfield Beach, 1985.
51. Meenakumari, V.; *Analyst*, **120** (1995) 2849.
52. Martín, M. E., Hernández, O. M., Jiménez, A. I., Arias, J. J., Jiménez, F.; *Anal. Chim. Acta*, **381** (1999) 247.
53. Riviejo, A. J., Buyo, F. J., Pingarrón, J. M., Peral, J. L.; *Electroanalysis*, **5** (1993) 303.
54. García, J. M., Martín, E., Jiménez, A. I., Jiménez, F., Arias, J. J.; *J. Electroanal. Chem.*, **373** (1994) 235.
55. García, J. M., Martín, E., Jiménez, A. I., Jiménez, F., Arias, J. J.; *Anal. Lett.*, **27** (1994) 1763.
56. Lindberg, W., Kowalski, B.; *Anal. Chim. Acta*, **206** (1988) 125.
57. Wightman, R. M.; *Anal. Chem.*, **53** (1981) 1125A.
58. Bond, A. M., Fleischmann, M., Robinson, J. J.; *J. Electroanal. Chem.*, **172** (1984) 11.
59. Donten, D., Kublik, J. J.; *J. Electroanal. Chem.*, **196** (1985) 275.
60. Wipf, D. O., Wightman, R. M.; *Anal. Chem.*, **60** (1988) 2460.
61. Correia, A. N., Mascaro, L. H., Machado, S. A. S., Mazo, L. H., Avaca, L. A.; *Química Nova*, **18(5)** (1995) 475.
62. Bond, A. M.; *Analyst*, **119** (1994) R1.
63. Bond, A. M., Fleischmann, M., Robinson, J. J.; *J. Electroanal. Chem.*, **168** (1984) 299.
64. Santos, J. H., Bond, A. M., Mocak, J., Cardwell, T. J.; *Anal. Chem.*, **66** (1994) 1925.
65. Lane, R. F., Hubbard, A. T.; *Anal. Chem.*, **48** (1976) 1287.

66. Cheng, H. Y., Schenk, J., Huff, R., Adams, R. N.; *J. Electroanal. Chem.*, **100** (1979) 23.
67. O'Neil, R. D.; *Analyst*, **118** (1993) 433.
68. Stamford, J. A.; *J. Neurosci. Methods*, **17** (1986) 1.
69. Justice, J. B.; *Voltametry in Neurosciences*, Humana, Clifton, NJ, 1987.
70. White, J. G., Claire III, R. L. St., Jorgenson, J. W.; *Anal. Chem.*, **58** (1986) 239.
71. Hsueh, C. C., Brajter-Toth, A.; *Anal. Chim. Acta*, **321** (1996) 209.
72. Augelli, M. A., Nascimento, V. B., Pedrotti, J. J., Gutz, I. G. R., Angnes, L.; *Analyst*, **122** (1997) 843.
73. Wang, J., Taha, Z.; *Anal. Chem.*, **63** (1991) 1053.
74. Wang, J., Taha, Z.; *Anal. Chim. Acta*, **252** (1991) 215.
75. Zoski, C. G., Bond, A. M., Allison, E. T., Oldham, K. B.; *Anal. Chem.*, **62** (1990) 37.
76. Birke, L. R., Huang, Z.; *Anal. Chem.*, **64** (1992) 1513.
77. Morf, W. E.; *Anal. Chim. Acta*, **330** (1996) 139.
78. Tay, E. B., Khoo, S., Loh, S.; *Analyst*, **114** (1989) 1039.
79. Cox, J. A., Jaworski, K.; *Anal. Chem.*, **61** (1989) 2176.
80. Cox, J. A., Lewinski, K.; *Talanta*, **40** (1993) 1911.
81. Lo Gordon; *Anal. Chim. Acta*, **178** (1985) 247.
82. Wang, J., Chen, Q.; *Anal. Chem.*, **66** (1994) 1007.
83. Wang, J., Lu, F., Angnes, L., Liu, J., Sakslund, H., Chen, Q., Pedrero, M., Chen, L., Hammerich, O.; *Anal. Chim. Acta*, **305** (1995) 3.
84. Horrocks, B. R., Schmidtke, D., Heller, A., Bard, A. J.; *Anal. Chem.*, **65** (1993) 3605.
85. Azevedo, C. M. N., Araki, K., Toma, H. E., Angnes, L.; *Anal. Chim. Acta*, **387** (1999) 175.
86. Wang, J., Golden, T., Lin, Y., Angnes, L.; *J. Electroanal. Chem.*, **333** (1992) 65.
87. Guadalupe, R., Abruña, H. D.; *Anal. Chem.*, **57** (1985) 142.
88. Kalcher, K.; *Electroanalysis*, **2** (1990) 419.
89. Kalvoda, R.; *Electroanalytical Methods in Chemical and Environmental Analysis*, Plenum Press, New York, 1987.

90. Pedrotti, J. J.; “*Desenvolvimento de Instrumentação e Métodos de Análise por Injeção em Fluxo com Detecção Voltamétrica em Eletrodo de Mercúrio*”, Tese de Doutorado, Instituto de Química – USP, 1993.
91. Matos, R. C., Angnes, L., Araújo, M. C. U., Saldanha, T. C. B.; *Analyst*, **125** (2000) 2011.
92. Matos, R. C., Pedrotti, J. J., Angnes, L.; *Anal. Chim. Acta*, **441(1)** (2001) 71.
93. Muñoz, R. A. A., Matos, R. C., Angnes, L.; *J. Pharm. Science*, (2001) **no prelo**.
94. Muñoz, R. A. A., Matos, R. C., Angnes, L.; *Talanta*, (2001) **no prelo**.
95. Barendrecht, E.; *J. Appl. Electrochem.*, **2** (1990) 175.
96. Sittampalan, G., Wilson, G. S.; *Anal. Chem.*, **55** (1983) 1608.
97. Wang, J., Golden, T.; *Anal. Chem.*, **59** (1987) 740.
98. Chastel, O., Kauffmann, J. M., Patriarche, G. J., Christian, G.; *Anal. Chem.*, **61** (1989) 170.
99. Gerhardt, G. A., Oke, A. F., Nagy, G., Moghaddam, B., Adams, R.; *Brain Res.*, **290** (1984) 390.
100. Gorton, L., Karan, H. E., Hale, P. D., Inagaki, T., Okamoto, Y., Skotheim, T. A.; *Anal. Chim. Acta*, **228** (1990) 23.
101. Hoyer, B., Florence, T. M., Batley, G. S.; *Anal. Chem.*, **59** (1987) 1608.
102. Frew, J. E., Hill, H. A. O.; *Anal. Chem.*, **59** (1987) 933A.
103. Farmacopéia Brasileira, Organização Andrei Editora S. A., 3ª Edição, São Paulo.
104. Matos, R. C., Augelli, M. A., Pedrotti, J. J., Lago, C. L., Angnes, L.; *Electroanalysis*, **10(13)** (1998) 887.
105. Matos, R. C., Augelli, M. A., Lago, C. L., Angnes, L.; *Anal. Chim. Acta*, **404** (2000) 151.
106. Pournaghi-Azar, M. H., Ojani, R.; *Talanta*, **42** (1995) 1839.
107. Alexander, P. W., Marpaung, H.; *Talanta*, **29** (1982) 213.
108. Xiaohua, C., Kalcher, K., Cai, X., Neuhold, C., Ogorevc, B.; *Talanta*, **44** (1994) 407.
109. Chung, H. K., Ingler Jr., J. D.; *Anal. Chim. Acta*, **243** (1991) 89.
110. Greenway, G. M., Ongono, P.; *Analyst*, **115** (1990) 1297.
111. Leubolt, R., Klein, H.; *J. Chromatogr.*, **640** (1993) 271.
112. Sultan, S. M.; *Talanta*, **40** (1993) 593.

113. Ferreira, S. L. C., Bandeira, M. L. S. F., Lemos, V. A., Santos, H. C., Costa, A. C. S., Jesus, D. S.; *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **357** (1997) 1174.
114. Sultan, s. M., Abdennabi, Suliman, F. E. O.; *Talanta*, **41** (1994) 125.
115. Uchiyama, S., Hasebe, Y., Suzuki, S.; *Electroanalysis*, **5** (1993) 653.
116. Moll, N., Joli, J. P.; *J. Chromatogr.*, **405** (1987) 347.
117. Gao, Z., Ivaska, T. Z., Wang, G., Li, P., Zhao, Z.; *Talanta*, **40** (1993) 399.
118. Giz, M. J., Duong, B., Tao, N. J.; *J. Electroanal. Chem.*, **465** (1999) 72.
119. Zen, J. M., Wang, W. M., Ilangoan, G.; *Anal. Chim. Acta*, **372** (1998) 315.
120. Forzani, E. S., Rivas, G. A., Solís, V. M.; *J. Electroanal. Chem.*, **435** (1997) 77.
121. Ewing, A. G., Dayton, M. A., Wightman, R. M.; *Anal. Chem.*, **53** (1981) 1842.
122. Gonon, F. G., Navarre, F., Buda, M. J.; *Anal. Chem.*, **56** (1984) 573.
123. Falat, L, Cheng, H. Y.; *Anal. Chem.*, **54** (1982) 2111.
124. Wang, J., Naser, N., Ozsoz, M; *Anal. Chim. Acta*, **234** (1990) 315.
125. Sun, Y., Ye, B., Zhang, W., Zhou, X.; *Anal. Chim. Acta*, **363** (1998) 75.
126. Gonon, F. G., Fombarlet, C. M., Buda, M. J., Pujol, J. F.; *Anal. Chem.*, **53** (1981) 1386.
127. Nagy, G., Gerhardt, G. A., Oke, A. F., Rice, M. E., Adams, R. N.; *J. Electroanal. Chem.*, **188** (1985) 85.
128. Malem, F., Mandler, D.; *Anal. Chem.*, **65** (1993) 37.
129. Forzani, E. S., Rivas, G. A., Solís, V. M.; *J. Electroanal. Chem.*, **435** (1997) 77.
130. Hernández, P., Sánchez, I., Patón, F., Hernández, L.; *Talanta*, **46** (1998) 985.
131. Copper, B. R., Wightman, R. M., Jogenson, J. W.; *J. Chromatogr. B*, **653** (1994) 25.
132. Kim, S. H., Lee, J. W., Yeo, I.; *Electrochimica Acta*, **45** (2000) 2889.
133. Britz-Mckibbin, P., Wong, J., Chen, D. D. Y.; *J. Chromatogr. A*, **853** (1999) 535.
134. Yang, J., Zhang, G., Wu, X., Huang, F., Lin, C., Cao, X., Sun, L., Ding, Y.; *Anal. Chim. Acta*, **363** (1998) 105.
135. Ni, J., Ju, H., Chen, H., Leech, D.; *Anal. Chim. Acta*, **378** (1999) 151.

136. Levy, M., Zylber-Katz, E., Rosenkranz, B.; *Clin. Pharmacokinet.*, **28**(3) (1995) 216.
137. Belal, F.; *Electroanalysis*, **4**(5) (1992) 589.
138. Costa, N., Ksenija, V., Mirjana, N.; *Acta Pharm. Jugosl.*, **34** (1984) 177.
139. Geisslinger, G., Böcker, R., Levy, M.; *Pharm. Research*, **13**(8) (1996) 1272.
140. Sakiara, K. A., Pezza, L., Melios, C. B., Pezza, H. R., Moraes, M.; *IL Farmaco*, **54** (1999) 629.
141. Bougault, M. J.; *J. Pharm. Chim.*, **7** (1898) 161.
142. Rapaport, L. I., Shvartsburd, M. M.; *Aptech. Delo*, **3**(5) (1954) 47. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 49:2674c, 1955.
143. Augelli, M. A., Nascimento, V. B., Pedrotti, J. J., Gutz, I. G. R., Angnes, L.; *Analyst*, **122** (1997) 843.
144. Pedrotti, J. J., Angnes, L., Gutz, I. G. R.; *Electroanalysis*, **8** (1996) 673.
145. Neto, B. B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E.; *Planejamento e Otimização de Experimentos*, UNICAMP, Campinas, 1995.
146. *The Unscrambler User's Guide*, version 6.0, CAMO, Trondheim, 1996.
147. *CETESB Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo*, São Paulo, 1994.
148. Kowalok, M. E.; *Environmental*, July – August **35**(6) (1993) 12.
149. "O Fracasso da Conferência de Buenos Aires.", O Estado de São Paulo, 1998. [<http://www.estado.com.br/jornal/>].
150. Godish, T.; *Air Quality*, 3rd, Lewis Publishres, Boca Raton, 1997.
151. Alloway, B. J., Ayres, D. C.; *Chemical Principles of Environmental Pollution*, 2nd, Londres, 1997.
152. Haag, H. P.; *Chuvas Ácidas*, Fundação Cargill, Campinas, 1985.
153. Cowling, E.; *Environ. Sci. Technol.*, **16**(2) (1982) 110A.
154. Mohnen, V. A.; *Sci. Am.*, **259**(2) (1988) 14.
155. WHO – World Health Organization, Air pollution in the world's megacities – A report from the United Nations Environment Programme and the World Health Organization, *Environment*, **36**(2) (1994) 4.
156. Albuquerque, Y. D. T.; "Nova Metodologia para Determinação Amperométrica Sequencial por Injeção em Fluxo Contínuo de H₂O₂, HSO₃⁻

- e Hidroxialcanosulfonato em Amostras Ambientais*", Tese de Doutorado, IQ – USP, 1993.
157. Fornaro, A.; *"Chuva Ácida em São Paulo: Caracterização Química de Amostras Integradas e Sequenciais de Deposição Úmida"*, Dissertação de Mestrado, IQ – USP, 1991.
 158. Deng, Y., Zuo, Y.; *Atmospheric Environment*, **33** (1999) 1469.
 159. Brandt, C., van Eldik, R.; *Chemical Review*, **95** (1995) 119.
 160. Rocha, F. R.; *"Desenvolvimento e Aplicações de Métodos Eletroanalíticos em Fluxo para Determinação de Traços de H₂O₂, HSO₃⁻ e Hidroximetanosulfonato na Fase Líquida da Atmosfera"*, Dissertação de Mestrado, IQ – USP, 1999.
 161. Cardoso, M. F.; *"Produção e transporte de Ozônio Troposférico em Cubatão, São Paulo"*, Dissertação de Mestrado, IAG – USP, 1997.
 162. Gutz, I. G. R., Klockow, D.; *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **335** (1989) 919.
 163. Taminoto, Y. D., Gutz, I. G. R.; *Res. VI Enc. Nac. Química Analítica*, Araraquara (1991) 199.
 164. Galvão, P.; *"Chuva Ácida: Estudo de Caso no Campus USP/SP"*, Dissertação de Mestrado, Instituto de Geociências – USP, 1996.
 165. Fornaro, A., Isolani, P. C., Gutz, I. G. R.; *Atmospheric Environment B*, **27(3)** (1993) 307.
 166. Matos, R. C., Fontenele, R., Gutz, I. G. R., Angnes, L., Pedrotti, J. J.; *Química Nova*, **no prelo**.
 167. Kowalski, Z., Kubiak, W.; *Anal. Chim. Acta*, **159** (1984) 129.
 168. Richter, E. M., Kume, G. H., Mioshi, R. N., Augelli, M. A., Angnes, L.; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366** (2000) 444.
 169. Richter, E. M., Kume, G. H., Augelli, M. A., Angnes, L.; *Mercury as a Global Pollutant*, 5th Intern. Conf., May 23-28, 1999, Rio de Janeiro, Brasil.
 170. Christian, G. D.; *J. Pharm. Biom. Anal.*, **10(10-12)** (1992) 769.
 171. Chaniotakis, N. A., Tsagatakis, J. K., Moschou, E. A., West, S. J., Wen, X. W.; *Anal. Chim. Acta*, **356(1)** (1997) 105.
 172. Albertus, F., Horstkotte, B., Cladera, A., Cerda, V.; *Analyst*, **124(9)** (1999) 1373.
 173. Grudpan, K., Taylor, C., Sitter, H., Keller, C.; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **346(10-11)** (1993) 882.

174. Weeks, D. A., Johnson, K. S.; *Anal. Chem.*, **68** (2000) 2717.
175. Wang, R. Y., Jarrat, J. A., Keay, P. J., Hawkes, J. J., Coakley, W. T.; *Talanta*, **52(1)** (2000) 129.
176. Miller, J. C., Miller, J. N.; *Statistic for Analytical Chemistry*, Horwood, Chichester, 1992.
177. Bergmeyer, H. U.; *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, 2nd ed., p 1205-1214, 1974.
178. Milardovic, S., Kruhac, I., Ivekovic, D., Rumenjak, V., Tkalcec, M., Graaric, B. S.; *Anal. Chim. Acta*, **350** (1997) 91.
179. Turner, A. P. F., Pickup, J. C.; *Biosensors*, **1** (1985) 85.
180. Gorton, L.; *Electroanalysis*, **7** (1995) 23.
181. Pantano, P., Kuhr, W. G.; *Electroanalysis*, **7** (1995) 405.
182. Christiansen, T. F., Jakobsen, K. M.; *Acta Anaesthes. Scand.*, **39** (1995) 31.
183. Wang, J., Rivas, G., Chicharro, M.; *J. Electroanal. Chem.*, **439** (1997) 55.
184. Sakslund, H., Wang, J., Hammerich, O.; *J. Electroanal. Chem.*, **402** (1996) 149.
185. Wilson, R., Turner, A. P. F.; *Biosensors Bioelectr.*, **7** (1992) 165.
186. Ju, H., Zhou, D., Xiao, Y., Chen, H.; *Electroanalysis*, **10(8)** (1998) 541.
187. Wang, J., Wu, L. H., Lu, Z., Li, R., Sanchez, J.; *Anal. Chim. Acta*, **228** (1990) 251.
188. Pravda, M., Jungar, C. M., Iwuoha, C., Smyth, M. R., Vytras, K., Ivaska, A.; *Anal. Chim. Acta*, **304** (1995) 127.
189. Okawa, Y., Kobayashi, H., Ohno, T.; *Anal. Chim. Acta*, **315** (1995) 137.
190. Gunasingham, H., Tan, C. H.; *Analyst*, **115** (1990) 35.
191. Cai, X., Kalcher, K., Neuhold, C., Ogorevc, B.; *Talanta*, **3** (1994) 407.
192. Método Colorimétrico – SERA – PAK; Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.
193. Cass, A. E. G.; *Biosensors, A Practical Approach*, The Practical Approach Series, London, 1990.