UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-graduação em Química

FABIANA DA SILVA FELIX

Novos Materiais para Aplicações Analíticas nas Determinações de Compostos Orgânicos de interesse Farmacêutico e Ambiental

São Paulo

Data do depósito na SPG: 30/04/2009

FABIANA DA SILVA FELIX

Novos Materiais para Aplicações Analíticas nas Determinações de Compostos Orgânicos de interesse Farmacêutico e Ambiental

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Química.

Área de Concentração: Química Analítica
Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

São Paulo
2009

Fabiana da Silva Felix

Novos Materiais para Aplicações Analíticas nas Determinações de Compostos Orgânicos de interesse Farmacêutico e Ambiental

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Química Analítica.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, José Carlos e Tereza, pela educação, amor e apoio.

À minha família querida, Roberto e João Pedro, pelo amor, companheirismo, carinho e apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos e sobrinhos pela amizade, carinho e momentos de confraternização.

Ao prof. Lúcio Angnes pela orientação, amizade, incentivo e por todos os ensinamentos recebidos, principalmente os científicos.

Aos prof. Ivano G.R. Gutz e Claudimir L. do Lago pelos ensinamentos, amizade e colaborações.

Ao prof. Cristopher M.A. Brett e pós-graduandos da Universidade de Coimbra pela contribuição a este trabalho e, principalmente, pelas doações dos resistores de carbono assim como pelos importantes conselhos para o seu melhor funcionamento como sensores voltamétricos.

Ao prof. Jivaldo R. Matos e Luís C.C. da Silva pela amizade e contribuição a este trabalho.

Ao prof. Jorge C. Masini pela amizade e bons conselhos.

Aos amigos do laboratório: Marlene, Vinny, Fernando, Caracol, João (in memoriam), Osmar, Pedro, Pimenta, Kléeeston, Wolverine, Wanderson, William, Carlos, Socorro, Miyuki, Baby Look, Jhonny, Escobar, Blanes, Dosil, Pop, André, Cabelo, Fábio, Eduardo, Zé Geraldo....

Em especial às gatas do LAIA, Dani, Lúcia, Érika e Renatinha, pela amizade, almoços, colaborações, entre outras coisas....

Às amigonas de sempre do Mackenzie, Ana Claúdia e Danielle, pelas risadas, almoços, apoio e muitas histórias.

A todos da secretaria de pós-graduação do Instituto de Química, Cibele, Emiliano, Milton e Marcelo, por todo auxílio e bom atendimento.

Aos professores e colegas da Química Analítica.

Às amigas do time de vôlei do CAI pelos diversos momentos de alegria e descontração.

Ao CNPq pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro a este projeto de pesquisa.

RESUMO

Felix, F.S. **Novos Materiais para Aplicações Analíticas nas Determinações de Compostos Orgânicos de Interesse Farmacêutico e Ambiental.** 2009. 139p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química (Química Analítica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sensores de filme de carbono, construídos a partir de resistores com 2 Ω de resistência nominal, foram utilizados para aplicações em áreas de interesse ambiental e farmacêutico sem a modificação prévia de suas superfícies. Através de um tratamento eletroquímico em meio ácido, é possível obter uma faixa de potencial (para ambos os limites anódico e catódico) maior comparado aos eletrodos de carbono convencionalmente utilizados. Devido ao fato dos sensores serem confeccionados em escala industrial na Alemanha, seu custo é muito baixo, tornando possível sua utilização na forma de eletrodos descartáveis. Além disso, são caracterizados por uma grande versatilidade, reprodutibilidade e estabilidade. Para comprovar a viabilidade dos eletrodos de filme de carbono como transdutores voltamétricos, amostras de paraquat foram analisadas em águas de rio e potável. A associação com a voltametria de onda quadrada possibilitou obter um limite de detecção inferior ao limite máximo estabelecido para o herbicida em água potável. Estudos por voltametria cíclica mostraram dois picos para a redução do paraquat, similares aos descritos na literatura. Os sensores de filme de carbono também foram adaptados ao sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação amperométrica de paracetamol e de ambroxol em formulações farmacêuticas. Em ambos os estudos, foi possível obter ampla faixa linear de concentração, baixos limites de detecção e sensibilidade elevada. Estudos de repetibilidade com os dois analitos apresentaram desvios padrões relativos de até 3%, comprovando a ausência de efeito de memória. Os resultados obtidos durante as análises em fluxo com os novos sensores amperométricos concordaram com as metodologias descritas nas farmacopéias. Ao longo dos quatro anos de doutoramento também foram desenvolvidos outros estudos, os quais estão descritos nos apêndices desta tese.

Palavras-chave: sensores; filmes de carbono; análises de fármacos; pesticidas; amperometria; voltametria de onda quadrada.

ABSTRACT

Felix, F.S. **New Materials for Analytical Application in Organic Compound Determination for Pharmaceutical and Environmental Interests.** 2009. 139p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry (Analytical Chemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Carbon film sensors, built from resistors of 2 Ω nominal resistance, were employed for application in the environment and pharmaceutical fields without previous modification of the electrode surface. When these sensors are electrochemically treated they obtain a wider potential window (both anodic and cathodic regions) than many other forms of carbon. Due to the fact that sensors are produced on industrial scale in Germany, the cost of each unit is very low, a feature that enables the use of these electrodes in disposable form. Moreover, they have great versatibility, reproducibility and stability. To prove the suitability of the carbon film electrodes as voltammetric sensors paraquat samples were analysed in river and drinking water. The association with the square wave voltammetry led to a detection limit below the allowed upper limit for herbicide analysis in drinking water. Previous results with cyclic voltammetry showed two peaks for paraquat reduction, in agreement with the literature data. The carbon film sensors were also adapted to the flow injection analysis system for amperometric determination of acetaminophen and ambroxol in pharmaceutical formulations. It was possible to obtain a wide linear working range, low detection limit and high sensitivity for both analytes. During the repeatabilty studies, acetaminophen and ambroxol showed relative standard desviations lower than 3% without any memory effect. The results obtained with a new amperometric sensor associated to FIA were in good agreement with those recommended by pharmacopoeias. In the appendices of this thesis are described other studies which have been developed for four years of PhD.

Keywords: sensors; carbon films; pharmaceutical analyses; pesticides; amperometry; square wave voltammetry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10

2. OBJETIVOS 14

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
3.1. Sensores Voltamétricos 19
3.1.1. Eletrodos de Carbono Vítreo 20
3.1.2. Eletrodos de Fulereno e Nanotubos 22
3.1.3. Eletrodos de Diamante 24
3.1.4. Eletrodos de Grafite 25
3.1.5. Eletrodos de Resistores de Filme de Carbono 30
3.2. Análises de Paraquat, Paracetamol e Ambroxol 32
3.2.1. Paraquat 32
3.2.2. Paracetamol 33
3.2.3. Ambroxol 34

4. PARTE EXPERIMENTAL 35
4.1. Reagentes e Soluções 36
4.2. Eletrodos de Trabalho 36
4.3. Instrumentação 37
4.3.1. Medições Eletroquímicas 37
4.3.2. Medições Espectrofotométricas 38
4.3.3. Medições Titulométricas Ácido-Base 39
4.4. Procedimento de Análise 39
4.4.1. Voltametria de Onda Quadrada 39
4.4.2. FIA com Detecção Amperométrica 40
4.4.3. Espectrofotometria 40
4.4.4. Titulação Ácido-Base 41

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42

5.1. Quantificação de Paraquat em Amostras Ambientais Utilizando Voltametria de Onda Quadrada 43
5.1.1. Voltametria Cíclica 43
5.1.2. Voltametria de Onda Quadrada 47
5.1.2.1. Curva de Calibração e Estudo de Estabilidade 47
5.1.2.2. Interferências 52
5.1.2.3. Determinação de Paraquat em Amostras Ambientais 53
5.1.3. Conclusões Parciais 54
5.2. Quantificação de Paracetamol em Formulações Farmacêuticas Utilizando Análises em Fluxo com Detecção Amperométrica 55
5.2.1. Voltametria Cíclica 55
5.2.2. Análises em Fluxo com Detecção Amperométrica 59
5.2.2.1. Curva Analítica, Estudos de Repetibilidade e Interferências 59
5.2.2.2. Determinação de Paracetamol em Amostras Farmacêuticas 64
5.2.3. Conclusões Parciais 67
5.3. Quantificação de Ambroxol em Formulações Farmacêuticas Utilizando Análises em Fluxo com Detecção Amperométrica 68
5.3.1. Voltametria Cíclica 68
5.3.2. Análises em Fluxo com Detecção Amperométrica 73
5.3.2.1. Curva Analítica, Estudos de Repetibilidade e Interferências 73
5.3.2.2. Determinação de Ambroxol em Amostras Farmacêuticas 78
5.3.3. Conclusões Parciais 80

6. CONCLUSÕES 82

7. PERSPECTIVAS FUTURAS 86

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88

APÊNDICES 109

APÊNDICE A – Quantificação de adrenalina em formulações farmacêuticas utilizando biossensores tissulares 110
1. Introdução 110

2. Resultados e Discussão 111
3. Conclusões 117
4. Referências Bibliográficas 118

APÊNDICE B – Determinação de salbutamol em xaropes utilizando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (EC-C^4D) .120
1. Introdução 120
2. Resultados e Discussão 121
3. Conclusões 125
4. Referências Bibliográficas 125

APÊNDICE C – Estudo do comportamento térmico e cinético do salbutamol em produtos farmacêuticos 128
1. Introdução 128
2. Resultados e Discussão 129
3. Conclusões 134
4. Referências Bibliográficas 135

CURRICULUM VITAE 137

1. INTRODUÇÃO

Um sensor químico pode ser definido como um dispositivo que permite a coleta de dados e obtenção de informações, geralmente contínuas, sobre o ambiente no qual está inserido. Geralmente, ele fornece um tipo de resposta relacionada diretamente com a concentração de uma espécie química de interesse [1]. Um sensor químico ideal deve funcionar de maneira reversível e realizar a medição diretamente na matriz da amostra, sem preparo prévio. Dentre estes sensores, os eletroquímicos (condutométricos, potenciométricos e voltamétricos são os mais comuns) são aqueles em constante desenvolvimento e aprimoramento além de seu uso ser ainda crescente em diversas áreas tais como farmacêutica, clínica, ambiental e industrial. Isto se deve, principalmente, a criação de novas possibilidades para manipular as propriedades destes sensores, dentre as quais tem-se a eletrocatálise, a prevenção de envenenamento de superfícies, a seletividade e a pré-concentração de espécies de interesse [2]. Características vantajosas também inerentes ao uso dos sensores eletroquímicos referem-se à portabilidade, facilidade de automação e possibilidade de miniaturização.

Consultando bases de dados, como por exemplo o ISI Web of Knowledge^{SM}, pode-se ter uma idéia da extensão da produção científica da área. Utilizando as palavras “electrochemical and sensor”, foi possível encontrar um número superior a 6000 artigos científicos publicados a partir de 1990. Estas pesquisas descrevem novos materiais, aplicações em diversas amostras, novos métodos de fabricação de sensores, estratégias para melhoria na seletividade e nos limites de detecção, entre outros [3-6]. A fabricação de sensores descartáveis [7,8] e o desenvolvimento de tecnologias que permitem a imobilização de enzimas em sistemas eletródicos para a confecção de biossensores com elevada estabilidade também têm atraído o contínuo interesse de pesquisadores [9,10]. Sofisticados métodos para “screen-printing” surgem rotineiramente na literatura [11,12] e a possibilidade de fabricação de microeletrodos isolados ou na forma de “arrays”, os quais viabilizam ganho de sensibilidade e abrem perspectivas para o monitoramento multielementar [13-15], impulsionam pesquisas para aplicações rotineiras.

Um grande número de novos materiais tem sido recentemente sintetizados e suas propriedades e aplicações eletroquímicas ainda não foram estudadas extensivamente. A utilização das diferentes formas de carbono dopado com heteroátomos de boro e nitrogênio, entre outros, são exemplos [2,16].

Sensores de resistores de carbono dopados com nitrogênio apresentam uma ampla janela de potencial anódico e catódico similar àquelas dos eletrodos de diamante dopado com boro, permitindo assim a quantificação de compostos que não podem ser determinados de forma favorável com outros eletrodos convencionais (carbono vítreo, platina e ouro). Esta particularidade possibilitou a determinação de zinco, em nível de traços, sem a inconveniente interferência da geração de hidrogênio [17]. Outras vantagens destes sensores são o baixo custo, facilidade da sua utilização durante as análises além de serem descartáveis, eliminando as etapas de limpeza e polimento do sensor durante os experimentos.

Os novos sensores são construídos a partir de resistores de filme de carbono (resistência nominal de 2 Ω, comprimento de 0,4 cm e diâmetro de 0,15 cm), confeccionados na Alemanha e "descobertos" para aplicações eletroanalíticas pelo professor Christopher Brett da Universidade de Coimbra, com quem temos trabalhado em colaboração.

Os sensores voltamétricos, principalmente os amperométricos, têm sido associados extensivamente aos sistemas em fluxo oferecendo alta sensibilidade, respostas rápidas e a possibilidade de monitoramento contínuo, resultantes das características hidrodinâmicas [18,19]. Além disso, podem ser utilizados como detectores em cromatografia líquida e eletroforese capilar, salientando as vantagens dessas técnicas de separação [20,21].

A alta sensibilidade encontrada na associação entre os sistemas por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*) e a detecção amperométrica é devida, principalmente, ao signficativo aumento do transporte de massa para a superfície do transdutor. Durante as análises, um potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho e a intensidade da corrente de pico é monitorada em função do tempo. Dentro de certos limites, esta corrente é proporcional à concentração do analito [22]. Em alguns casos, uma seletividade maior é alcançada através da escolha de um potencial menor aplicado ao transdutor, embora às custas de redução de sensibilidade. A sensibilidade também é favorecida pela combinação da vazão do sistema, da geometria, material e posicionamento do detector em relação ao fluxo da solução, além do volume de amostra utilizado. O detector posicionado frontalmente ao fluxo é mais vantajoso porque o transporte de massa é mais efetivo e garante uma limpeza eficiente de sua superfície após passagem da zona de amostra [22,23].

A combinação dos sistemas em fluxo com os detectores amperométricos, para a determinação de diversos analitos de interesse, vem sendo implementada com sucesso pelo nosso grupo de pesquisa [24-30]. No presente trabalho, são apresentados estudos em que sensores amperométricos foram desenvolvidos para aplicações analíticas quando associados a FIA. Neste contexto, fez-se uso de resistores de filme de carbono como transdutores em estudos envolvendo a quantificação de paracetamol (analgésico e agente antipirético) e ambroxol (agente expectorante) em formulações farmacêuticas.

Os resistores de filme de carbono foram também associados à técnica de voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) para a quantificação do herbicida paraquat em amostras ambientais. A SWV é uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados àqueles encontrados em cromatografia [31]. A alta sensibilidade alcançada pela SWV é devido à combinação entre uma etapa de pré-concentração do analito (eletrolítica ou adsortiva) com procedimentos avançados de medição [32]. Além disso, sua teoria e os modelos matemáticos foram desenvolvidos considerando, também, as espécies eletroativas adsorvidas na superfície eletródica e reações redox totalmente irreversíveis [33]. A descrição detalhada desta técnica voltamétrica e suas aplicações já estão bem difundidas na literatura [31-34]. Nos últimos anos, a utilização da SWV na quantificação de diferentes classes de pesticidas em diversas amostras tem mostrado crescimento exponencial [35-39]. Porém, muitos estudos desenvolvidos com diferentes transdutores mostraram a necessidade do emprego de artifícios para contornar os problemas de adsorção do paraquat na superfície dos eletrodos de trabalho [40-43].

2. OBJETIVOS

A crescente demanda de análises químicas e a necessidade de monitoramento contínuo dos processos de produção e controle de qualidade nas diversas áreas tem direcionado estudos no sentido de buscar novos materiais para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos que sejam mais facilmente construídos, possibilitem análises reprodutíveis, possuam alta seletividade e sensibilidade, apresentem resposta em tempo real, entre outras propriedades desejadas durante as análises eletroanalíticas.

A proposta deste trabalho é dar contribuições à área do desenvolvimento de detectores eletroquímicos. As atividades de pesquisa descritas ao longo deste texto são baseadas na construção de novos sensores, a partir de resistores de filme de carbono, para aplicações em áreas de interesse ambiental (paraquat) e farmacêutica (paracetamol e ambroxol).

Paraquat, assim como os demais pesticidas, é tradicionalmente quantificado através da cromatografia líquida [44-47]. A cromatografia requer a utilização de algumas etapas prévias de preparação da amostra, evitando assim os interferentes e, principalmente, a contaminação da coluna cromatográfica que pode levar a resultados errôneos e danosos. Esta etapa prévia de preparação, muitas vezes, é longa e complexa, o que faz com que o tempo de análise aumente muito, e conseqüentemente eleve os custos da análise. Em função destas desvantagens, surgiu a necessidade de desenvolver métodos eletroanalíticos para a quantificação do paraquat que fossem mais rápidos, de baixo custo e tão sensíveis quanto àqueles alcançados com as técnicas cromatográficas. Além disso, buscar metodologias que contornem os problemas de adsorção do herbicida na superfície dos transdutores é também necessário.

Na primeira etapa deste trabalho, foram associadas as vantagens do emprego das técnicas voltamétricas (voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada) com as características vantajosas dos novos sensores (baixos limites de detecção, sensibilidade elevada e ampla faixa linear de concentração) para o estudo do comportamento eletroquímico do paraquat assim como a sua quantificação em amostras ambientais.

Na segunda etapa, os resistores de filme de carbono foram utilizados como detectores amperométricos com excelente desempenho. Na detecção amperométrica, é aplicado ao eletrodo de trabalho um potencial constante e suficiente para oxidar ou reduzir a espécie eletroativa de interesse, sendo a corrente

monitorada em função do tempo. Levando-se em consideração que muitos compostos orgânicos de interesse farmacêutico, biológico ou ambiental podem ser oxidados ou reduzidos, a aplicabilidade dos sensores amperométricos é ampla e ainda pouco explorada. A facilidade de adaptação dos detectores amperométricos a métodos de análise por injeção em fluxo (FIA) tem resultado no desenvolvimento de sistemas simples com alta freqüência analítica. Neste contexto, os resistores de filme de carbono foram utilizados como sensores amperométricos na determinação dos fármacos paracetamol e ambroxol em formulações farmacêuticas.

Outros estudos foram desenvolvidos paralelamente às investigações com os novos sensores. O primeiro deles foi a quantificação de epinefrina, fármaco que pertence à família das catecolaminas, em produtos farmacêuticos empregando biossensores amperométricos. Os biossensores foram desenvolvidos a partir de tecidos vegetais, provenientes de frutos de uma palmeira (cocos de *Livistona chinensis*), facilmente encontrada no campus da Universidade de São Paulo. O mesocarpo dos frutos, rico em enzima polifenol oxidase, foi empregado como fonte natural de material enzimático na construção dos biossensores. As vantagens no uso de tecidos vegetais como fonte de material biológico para o desenvolvimento de biossensores são bem conhecidas, dentre elas tem-se o baixo custo e a simplicidade de construção. Nos últimos anos, este tipo de sensor vem sendo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa [25,48-50]. Detalhes deste estudo se encontram de forma resumida no *Apêndice A.*

Um outro estudo foi realizado para a determinação de salbutamol em formulações farmacêuticas, um agonista β_2-adrenérgico seletivo, empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C^4D, do inglês *Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*), descrito no *Apêndice B*. Esta técnica surge como uma alternativa interessante na análise de fármacos por sua rapidez e seletividade além de proporcionar limites de detecção compatíveis com a concentração de princípio ativo encontrado nos medicamentos. O equipamento de eletroforese capilar interfaceado a um computador foi desenvolvido pelo grupo do professor Claudimir L. do Lago e tem sido utilizado para análises de diferentes tipos de amostras reais tais como, água de coco, álcool combustível, água de represa e café [51-54].

As técnicas de análise térmica têm sido utilizadas para a caracterização de vários compostos sólidos, principalmente na área farmacêutica, sendo consideradas

rápidas e apropriadas para o controle de qualidade e desenvolvimento de novos medicamentos [55]. Em vista da potencialidade das técnicas termoanalíticas aplicadas a fármacos, um estudo do comportamento térmico e estabilidade do salbutamol em padrão e amostra farmacêutica é descrito no *Apêndice C*. Além da sua importância no uso terapêutico, o salbutamol tem sido também considerado um importante agente anabólico [56].

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Sensores Voltamétricos

O desempenho das técnicas voltamétricas é fortemente influenciado pelo material do eletrodo de trabalho. Conseqüentemente, muitos esforços são direcionados para a fabricação e manutenção destes eletrodos. Durante muitos anos, os transdutores de mercúrio (gotejante ou filmes de mercúrio) foram extensivamente utilizados nas diversas análises [57-60]. Isto se deve, principalmente, à ampla faixa de potencial de trabalho catódico, elevada reprodutibilidade e superfície renovável. Em função da limitação da faixa de potencial anódica e à toxicidade do mercúrio, novos materiais surgiram para a determinação de diversos compostos, inclusive os orgânicos. Dentre eles, destacam-se os eletrodos sólidos confeccionados a partir de diferentes materiais tais como platina [61,62], ouro [63,64], níquel [65,66], cobre [67,68], prata [69,70], paládio [71] e cobalto [72] e as diversas formas de carbono [73-75].

Os materiais a base de carbono geralmente apresentam corrente de fundo mais baixa e uma faixa de potencial de trabalho mais ampla do que os demais eletrodos sólidos. Via de regra, eles são de menor custo, mecanicamente estáveis e estão disponíveis em uma variedade de formas tais como carbono vítreo, pasta de carbono, fibras de carbono, diamante, grafite pirolítico, carbono vítreo reticulado, fulerenos, nanotubos de carbono, resistores, entre outros. O eletrodo de carbono, na sua forma mais simples, é bom condutor de eletricidade devido aos elétrons do orbital π deslocalizado, formado pela sobreposição dos orbitais *p* de cada átomo de carbono que compõem o plano lamelar de carbonos [76]. A Figura 1 apresenta algumas das diferentes formas de carbono utilizadas em diversos estudos eletroquímicos.

Assim como os demais transdutores sólidos, principalmente os de platina e de ouro, os eletrodos de carbono também apresentam problemas de adsorção em suas superfícies oriundos dos processos eletródicos que resultam na passivação do eletrodo e, conseqüentemente, ao decréscimo do sinal analítico. Para contornar este problema, muitos pesquisadores sugerem a aplicação de pulsos de potenciais (positivos e/ou negativos), de maneira a eliminar o material indesejável da superfície do eletrodo. Além disso, o tratamento eletroquímico prévio pode atuar no desempenho do eletrodo de modo a favorecer, por exemplo, a transferência eletrônica das espécies envolvidas ou aumentar a faixa de potencial de trabalho.

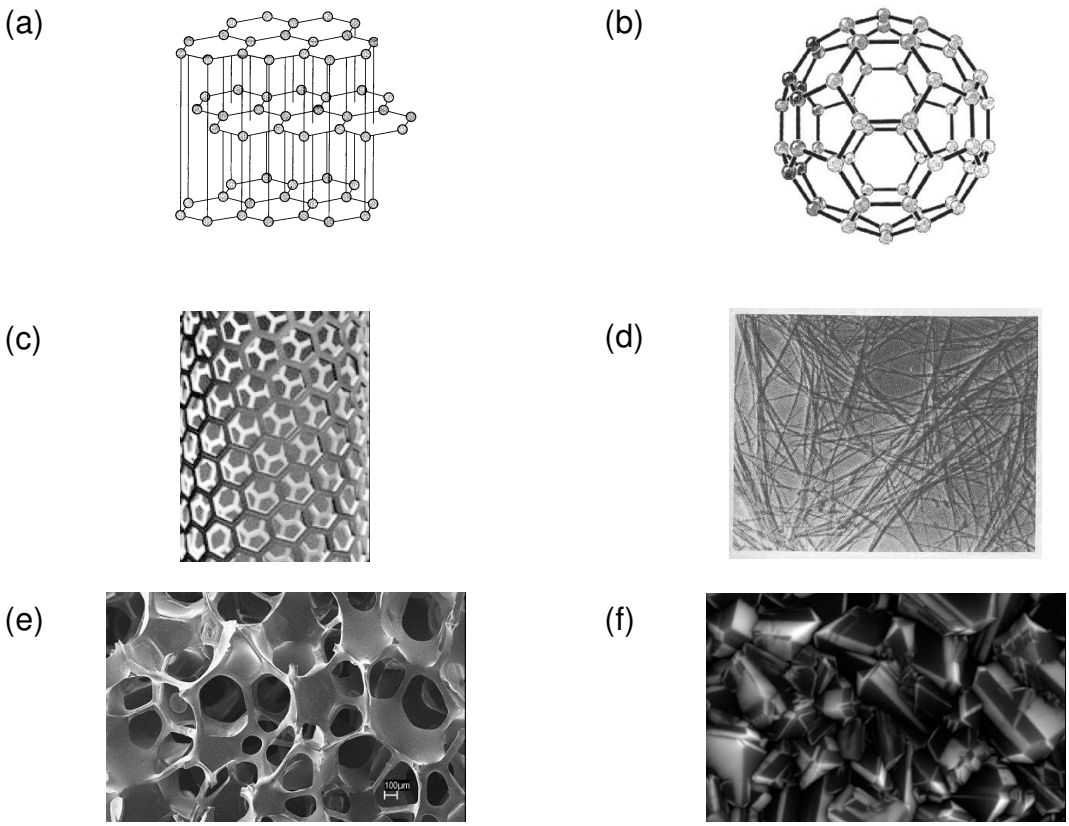


Figura 1 – Diferentes formas do carbono: (a) grafite, (b) fulereno, (c) nanotubos, (d) fibras, (e) carbono vítreo reticulado e (f) diamante [77-81].

A seguir, serão discutidos estudos realizados com os diferentes sensores de carbono (carbono vítreo, fulereno, nanotubos, grafite, diamante, pasta de carbono e eletrodos impressos) na determinação de analitos envolvendo áreas de interesse farmacêutico e ambiental. Além disso, outros estudos envolvendo o novo sensor (resistor de filme de carbono) em diferentes matrizes serão apresentados.

3.1.1. Eletrodos de Carbono Vítreo

O carbono vítreo é um material comumente empregado nos estudos eletroquímicos e eletroanalíticos devido a suas propriedades mecânicas e elétricas favoráveis. Suas características físicas favorecem a montagem experimental, pode ser polido facilmente, é compatível com a maioria das soluções e eletrólitos utilizados bem como sua superfície pode ser modificada adequadamente seguindo

diversos caminhos, como por exemplo através da adsorção química do agente modificador ou pela eletropolimerização [76].

Há muitos estudos descritos na literatura envolvendo sensores de carbono vítreo na quantificação de compostos orgânicos em amostras farmacêuticas e ambientais. Eles podem ser não modificados [73,82-87] ou modificados com diferentes agentes modificadores tais como polímeros condutores, rutênio, porfirinas, bismuto, entre outros [88-93].

Um eletrodo de carbono vítreo foi empregado na determinação de ganciclovir, um potente agente antiviral utilizado contra herpes, pelas técnicas voltamétricas de pulso diferencial e onda quadrada em amostras farmacêuticas e fluido biológico [82]. Este foi um dos primeiros trabalhos realizados com técnicas eletroquímicas no qual apresentou limites de detecção na ordem de 10^{-8} mol L^{-1} e sem a necessidade de tratamento prévio das amostras.

Eletrodo de carbono vítreo recoberto com filme de bismuto foi utilizado na quantificação de paration, pesticida organofosforado extremamente tóxico, em amostras ambientais [91]. Durante os estudos voltamétricos, um pico de redução irreversível foi constatado em -620 mV (*vs.* SCE), sendo que nenhum pico foi evidenciado com o eletrodo não modificado. Após otimização das condições de trabalho (potencial e tempo de deposição do bismuto, valor de pH da solução eletrólito, freqüência, incremento de potencial, entre outros) a resposta voltamétrica foi proporcional à concentração de paration na faixa compreendida entre 3,0 – 100 ng mL^{-1}. Além disso, os eletrodos de bismuto têm sido empregados como uma alternativa atraente aos eletrodos convencionais de mercúrio bem como são poucos os estudos relatados com este sensor para análises de compostos orgânicos.

Um eletrodo de carbono vítreo modificado com porfirina tetrarrutenada de cobalto, através de adsorção química, foi empregado na determinação de metabissulfito em produtos farmacêuticos [90]. Este sensor amperométrico associado à técnica de “Batch Injection Analysis” (BIA) levou a resultados que combinaram boa repetibilidade dos sinais de corrente anódica (D.P.R. = 0,94 %, para 30 medições), ampla faixa de concentração linear (2,5 x 10^{-7} – 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1}), elevada sensibilidade (924 mA mol^{-1} L cm^{-2}) e baixo limite de detecção (8,1 x 10^{-8} mol L^{-1}).

O carbono vítreo reticulado é quimicamente similar ao carbono vítreo convencional. Este material poroso possui baixa expansão térmica, alta resistência à corrosão, alta condutividade elétrica, baixa resistência à passagem de solução, área

superficial grande (acima de 66 cm^2 cm^{-3} para 100 poros por polegada) e inércia química em uma ampla faixa de temperatura [76,94].

Em 1981, Wang [95] publicou o primeiro trabalho de revisão do carbono vítreo reticulado como um novo material para a construção de sensores em diferentes aplicações eletroanalíticas, incluindo estudos com ácido ascórbico, epinefrina, L-dopa e espécies inorgânicas.

Wieck e colaboradores [96] construíram biossensores de glicose para análises em fluxo utilizando dois procedimentos de imobilização da glicose oxidase na superfície do carbono vítreo reticulado, a adsorção física e a ligação química covalente com carbodiimida. Eles concluíram que a imobilização da enzima com ligação covalente apresentou uma atividade maior (5,75 e 1,75 unidades g^{-1} para as imobilizações com ligação covalente e por adsorção, respectivamente) para a detecção do analito. Em um outro estudo mais recente [97], os autores monitoram amperometricamente peróxido de hidrogênio, produzido pela oxidação enzimática da glicose, em +0,9 V (*vs.* SCE). Neste estudo, eles verificaram que as correntes de oxidação foram lineares em uma faixa de concentração restrita (2,5 – 10 mmol L^{-1}).

3.1.2. Eletrodos de Fulereno e Nanotubos

Os fulerenos foram descobertos em 1985, sintetizados pela primeira vez em 1990 e constituem uma das formas alotrópicas do carbono. Pode ser esférico, elipsoidal ou cilíndrico. O fulereno C_{60} foi denominado “Buckminsterfullerene” em homenagem ao arquiteto Richard Buckminster Fuller [76]. Recentemente muitos pesquisadores têm estudado o comportamento eletroquímico dos filmes de fulerenos parcialmente reduzidos que tornam-se excelentes condutores elétricos, dependendo do cátion presente na etapa de redução [98-103]. Dessa maneira, os filmes podem ser utilizados como agentes modificadores promovendo a eletrocatálise, melhorando a sensibilidade e a seletividade dos sensores durante as análises [99]. Conforme Csiszar e colaboradores [102], os fulerenos parcialmente reduzidos correspondem a uma etapa transiente do processo no qual a redução ocorre somente na superfície do material. Já os filmes de fulereno no estado neutro ou totalmente reduzidos não são muito utilizados nas análises eletroquímicas, pois impedem a difusão ou adsorção das espécies de interesse [103].

Um eletrodo de ouro foi modificado com filme de fulereno C_{60} para a quantificação de dopamina na presença de ácido ascórbico. Dois picos anódicos bem distintos de ambos os analitos foram observados em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH 7,2 [99]. Durante os experimentos de voltametria de onda quadrada, o sensor permaneceu estável durante 15 dias e apresentou um valor de limite de detecção melhor (2,6 x 10^{-10} mol L^{-1}) comparado a outros detectores.

Eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de fulereno C_{60} foi utilizado para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas e amostras de urina [100]. Este sensor apresentou um pico de oxidação do analito em uma região menos positiva assim como uma corrente anódica correspondente a quase o dobro da obtida com um eletrodo de carbono vítreo convencional. A mudança no valor da resposta voltamétrica é um indicativo forte do comportamento catalítico do filme de fulereno sobre a eletrooxidação do fármaco.

Os nanotubos de carbono são fulerenos cilíndricos e foram descobertos por Iijima em 1991 [104]. Quanto ao número de camadas, eles podem ser classificados em simples (SWNT, *single-wall carbon nanotubes*) ou multicamadas (MWNT, *multi-wall carbon nanotubes*). Um tipo especial de MWNT é o nanotubo de parede dupla (DWNT, *double-wall carbon nanotubes*) [105]. Os nanotubos de carbono, por apresentarem superfície com elevada estabilidade química, podem interagir diretamente com poucos átomos ou moléculas em suas paredes. Em geral, algum pré-tratamento em meio ácido ou dispersão do material em filme polimérico é necessário para eliminar impurezas, melhorar a transferência eletrônica ou permitir a funcionalização dos nanotubos [106]. A funcionalização, alterações nas propriedades eletrônicas e estruturais do material, pode ocorrer através de suas paredes, pontas ou por encapsulamento. Estas alterações associadas a grande resistência e flexibilidade mecânica do material fazem com que os nanotubos sejam explorados para confecção de sensores, dispositivos eletrônicos e eletromecânicos [105]. Porém, um dos problemas enfrentados pelos pesquisadores para a preparação destes sensores é a baixa solubilidade deste material frente a solventes comuns.

Huang e colaboradores [107] desenvolveram um método voltamétrico para a quantificação de ofloxacina, um antibiótico utilizado principalmente contra bactérias do tipo Gram-negativo, em produtos farmacêuticos. Uma suspensão estável e uniforme de MWNT (previamente tratado em meio ácido por 5 horas) e Nafion® foi obtida após a evaporação do etanol em temperatura ambiente, recobrindo a

superfície de um eletrodo de carbono vítreo. Nas condições de otimização dos experimentos (quantidade da suspensão MWNT-Nafion, valor de pH da solução eletrólito de tampão fosfato, potencial e tempo de acumulação, velocidade de varredura, entre outros) a corrente de oxidação foi linear com a concentração do fármaco em uma faixa compreendida de 0,5 até 100 x 10^{-6} mol L^{-1}. Os autores concluíram que com este sensor foi possível obter um intervalo de concentração mais amplo em comparação àqueles alcançados através de métodos espectrofotométricos, cromatografia líquida e quimiluminescência, descritos na literatura.

Além dos nanotubos de carbono serem utilizados na determinação de compostos orgânicos em formulações farmacêuticas [108-110], eles também tem sido propostos como materiais eficientes para remoção de poluentes, como por exemplo, a atrazina, um herbicida que pode atuar como desregulador hormonal [111]. Os autores verificaram que a capacidade de adsorção deste herbicida dependia da área superficial do sensor e de outros fatores, bem como o processo foi espontâneo e exotérmico. Ainda neste estudo, MWNT mostrou ser melhor agente adsorvente do que SWNT para a remoção de atrazina em águas residuárias, embora o custo do material fosse ainda relativamente alto.

3.1.3. Eletrodos de Diamante

Os materiais de diamante representam uma nova classe de carbono que exibem um futuro promissor, particularmente, para aplicações eletroanalíticas [76]. Estudos eletroquímicos com este material tiveram um início relativamente tardio, aproximadamente 20 anos atrás. O diamante apresenta uma alta dureza e conseqüentemente, sua etapa de preparação requer altas temperatura e pressão. Um outro inconveniente é o fato de ser um isolante elétrico, ou seja, não é um bom condutor de eletricidade o que o torna inaplicável como material de eletrodo [112].

Quando o diamante é dopado com boro ou outro agente dopante, torna-se um material semicondutor. Melhora das características de condutividade elétrica e em conseqüência outras propriedades eletroquímicas podem ser verificadas a partir de um nível de dopagem da ordem de 10^{20} cm^{-3} (um átomo de boro correspondendo a 1000 átomos de carbono) [113]. Outras características importantes devem ser também ressaltadas tais como boa transparência óptica, inércia química, baixo

coeficiente de fricção, estabilidade morfológica e microestrutural a altas temperaturas (em torno de 180 ^{0}C), alta resistência química, ampla janela de potencial de trabalho e baixa corrente de fundo [114,81]. Mesmo para o diamante dopado, a sua reatividade pode variar consideravelmente. Dessa maneira, a superfície do sensor ainda pode ser renovada ou condicionada através de polimento, tratamentos por plasma ou aplicações de potenciais anódico ou catódico, entre outros [113].

A eletrooxidação de naproxen, um antiinflamatório indicado para o tratamento de reumatismo e artrite juvenil, foi estudada em meio não aquoso (CH_3CN + $LiClO_4$) utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro [115]. Verificou-se que a oxidação do fármaco segue o mecanismo ECEC (eletroquímico/químico/eletroquímico/químico) com 1 elétron envolvido na primeira etapa do processo, seguido da formação de um cátion radicalar intermediário. Após uma rápida desprotonação, o analito é oxidado irreversivelmente com a perda do segundo elétron. Um ataque nucleofílico ocorre para a produção do derivado acetamido de naproxen. Foi possível a quantificação do antiinflamatório em formulações farmacêuticas de maneira seletiva, rápida e precisa utilizando a voltametria de pulso.

Codognoto e colaboradores [116] descreveram um método eletroanalítico para a determinação de carbaril, inseticida que pode causar efeitos neurológicos ao homem, empregando um eletrodo de diamante dopado com boro. Os resultados voltamétricos mostraram uma melhora na sensibilidade após um pré-tratamento anódico do sensor em -3,0 V (*vs.* Ag/AgCl) durante 30 min. Este método mostrou ser apropriado para o monitoramento do analito em águas naturais sem a necessidade de etapas prévias de tratamento da amostra, indispensáveis para várias metodologias propostas na quantificação de pesticidas da família dos metilcarbamatos (incluindo carbaril).

3.1.4. Eletrodos de Grafite

O grafite é uma das formas alotrópicas do carbono e pode ser encontrado na forma natural ou sintética (produzido industrialmente com o uso de altas temperaturas e pressões) com propriedades físicas e químicas diferentes devido às impurezas presentes. É um excelente condutor de calor e eletricidade, compressível,

maleável, refratário em atmosfera inerte e exibe resistência ao ataque químico e ao choque térmico [117]. Os sensores de grafite pirolítico altamente ordenados com planos normais e terminais possuem características eletroquímicas diferentes devido à natureza das ligações químicas de carbono que ocorrem na superfície dos planos. Nos planos normais, as camadas de grafite estão dispostas paralelamente à superfície com um espaçamento de 3,35 Å. Os defeitos de superfície ocorrem na forma de degraus expondo os terminais das camadas de grafite pirolítico conferindo, normalmente, uma transferência eletrônica mais rápida [118].

A superfície do eletrodo de grafite pirolítico foi modificada com nanotubos de carbono e funcionalizada com o complexo de tetra-aminoftalatocianina de cobalto para a determinação de asulam, herbicida pertencente ao grupo dos carbamatos [119]. Este sensor mostrou valores de corrente anódica seis vezes maior assim como o potencial de oxidação apareceu em uma região menos positiva, em comparação ao sensor de grafite não modificado. Estudos de recuperação foram realizados em amostras de água natural e o valor encontrado foi de 105 ± 0,10 %.

Os eletrodos de pasta de carbono são preparados a partir de uma mistura de pó de grafite com líquidos orgânicos imiscíveis e de caráter não eletrolítico tais como óleo mineral, parafina, silicone, entre outros. Estes sensores foram idealizados para serem utilizados em intervalos de potenciais mais positivos onde os eletrodos de mercúrio não são aplicáveis, tendo em vista à fácil oxidação deste metal. Além disso, eles foram empregados, inicialmente, em estudos mecanísticos de compostos orgânicos [120].

Recentemente, um método voltamétrico foi proposto para a quantificação de tamoxifeno, fármaco utilizado no tratamento de câncer de mama, em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de pasta de carbono [121]. Com este sensor, verificou-se um único pico anódico em +1,1 V (*vs.* SCE) utilizando uma solução eletrolítica de tampão ácido acético/acetato de sódio em metanol. O método mostrou ser rápido e sensível em uma faixa de concentração linear de $7,0 \times 10^{-10}$ – $3,0 \times 10^{-8}$ mol L^{-1}.

Os sensores de pasta de carbono podem ser facilmente modificados. A principal razão da modificação de sua superfície é obter um eletrodo novo com propriedades eletroquímicas pré-definidas, como por exemplo a melhora da seletividade. Esta característica os torna um dos materiais mais convenientemente

modificados com um ou mais componentes, especialmente com enzimas para a construção de biossensores [76].

Um interessante exemplo é o eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto para a determinação de aziprotrina, herbicida do grupo das triazinas, utilizando detecção amperométrica associada a sistema em fluxo [122]. Nos experimentos com voltametria cíclica, verificou-se que o sensor proposto apresentou propriedades catalíticas. Além da corrente catódica ser maior, o potencial de redução surgiu em uma região mais favorável -125 mV (*vs.* Ag/AgCl) em comparação a outros sensores com valores de -350 e -900 mV (*vs.* Ag/AgCl) para pasta de carbono não modificada e carbono vítreo, respectivamente. Com este sistema, utilizando uma vazão de 4,0 mL min^{-1}, alça de amostragem de 100 μL e um potencial de -130 mV, foi possível obter um limite de detecção de 2,0 x 10^{-10} g mL^{-1} e uma freqüência de amostragem de 60 determinações h^{-1}.

As pastas modificadas com a ftalocianina de cobalto têm sido utilizadas na detecção amperométrica de compostos que são oxidados ou reduzidos em potenciais extremos. A habilidade deste agente modificador em catalisar reações catódicas ou anódicas sugere que os quelantes metálicos são capazes de doar e receber elétrons. Isto significa que as propriedades do metal ligadas a fitalocianina têm um papel importante na determinação da atividade catalítica do sensor [123, 124].

Tecidos animais e vegetais têm sido incorporados em vários transdutores eletroquímicos para a construção de biossensores na quantificação de diferentes analitos, incluindo fármacos, hormônios, neurotransmissores, aminoácidos, entre outros compostos orgânicos. As vantagens do emprego de tecidos, principalmente os vegetais, em relação às enzimas isoladas incluem a maior disponibilidade, simplicidade na construção de eletrodos e bioreatores, custo menor, maior aplicabilidade quando acoplados com enzimas isoladas para formar os chamados sensores híbridos, maiores estabilidade e vida útil por manter a enzima em seu meio natural. Porém, estes biossensores tissulares possuem baixa seletividade a um dado substrato visto que o material biocatalítico contém numerosas enzimas que podem manter múltiplas vias metabólicas [125, 126].

Em 1988, Wang e Lin [127] construíram um dos primeiros eletrodos de pasta de carbono biologicamente modificados com tecido de banana sensível a dopamina, L-dopa e adrenalina. Muitos sensores foram confeccionados utilizando diferentes

partes de plantas tais como sementes, flores, polpa, casca, mesocarpo, epicarpo, entre outros [128, 129].

Um biossensor composto de grafite, resina epóxi e tecido de batata doce (fonte de polifenol oxidase) foi desenvolvido por Lupetti e colaboradores [130] para análise de vários compostos fenólicos. O mesmo biossensor foi também utilizado para quantificar hidroquinona (com potencial de trabalho de -0,25 V *vs.* Ag/AgCl) em águas residuárias de um processo fotográfico. A sensibilidade e a seletividade também foram avaliadas e o biossensor apresentou um tempo de vida superior a 6 meses (mais de 500 determinações).

As fibras de carbono foram inicialmente utilizadas nas indústrias aeronáutica e aeroespacial. O sucesso desta aplicação fez crescer as pesquisas e as novas aplicações envolvendo este material assim como o aprimoramento do processo de fabricação [76]. Inúmeras características têm sido apontadas como responsáveis pelo uso destes materiais em estudos eletroquímicos. As fibras são constituídas basicamente de carbono e, sob este aspecto, o comportamento deste material em medidas eletroquímicas é bem conhecido. Além disso, as fibras podem ser aplicadas em uma ampla faixa de potencial negativo e positivo, possuem pequenas dimensões (entre 5 e 50 μm) e grupos funcionais na superfície, como por exemplo o oxigênio, possibilitando a construção de eletrodos quimicamente modificados ou biossensores [131].

As pequenas dimensões das fibras de carbono possibilitam a construção de eletrodos em escalas micrométricas, os quais apresentam características eletroquímicas muito diferentes daquela dos eletrodos convencionais tais como baixa queda ôhmica, elevada relação corrente faradaica/corrente capacitiva, possibilidade de uso na ausência de eletrólito suporte, utilização de altas velocidades de varredura, realização de medidas em vivo, entre outros [132, 133].

He e Chen [134] desenvolveram um dos primeiros métodos voltamétricos para a determinação de ácido pipemídico, fármaco utilizado no tratamento de infecções urinárias, em produtos farmacêuticos sem a necessidade de tratamento prévio das amostras, etapa esta descrita nos trabalhos envolvendo cromatografia líquida, ou empregando eletrodos de mercúrio. Para tanto, os autores utilizaram fibras de carbono para a oxidação do fármaco em tampão fosfato com um potencial de pico em +1,06 V (*vs.* Ag/AgCl). Neste estudo, foi possível alcançar um limite de detecção de $1,2 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} com um tempo de acumulação de apenas 30 s.

Fibras de carbono foram utilizadas para a eletrooxidação de linuron, pesticida substituto da uréia, em amostras de solo [135]. Um tratamento eletroquímico foi necessário (20 ciclos de 0,0 – 1,5 V em solução fosfato, pH 2,0) para ativar e renovar a superfície do sensor. Dentre as vantagens destacadas pelos autores, este método promoveu uma redução do tempo de análise em 10 vezes comparado a outros métodos voltamétricos descritos na literatura.

Eletrodos impressos ou "screen-printed electrodes" são constituídos por filmes depositados sobre um suporte inerte, geralmente de PVC (cloreto de polivinila) ou cerâmica, parcialmente coberto por uma segunda camada de material isolante para definir as áreas de contato elétrico e superfície do eletrodo. Estes filmes são produzidos através de diferentes procedimentos, com destaque para os processos de "screen-printing" ou "silk-screen". Tais estratégias possibilitam a produção de eletrodos em massa a um custo extremamente baixo, simples, rápido e versátil, sendo apropriadas para a confecção de eletrodos descartáveis. Atualmente é comum a fabricação de sistemas completos, já contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, todos impressos no mesmo suporte. Estes sensores podem ainda ser miniaturizados para análises *in vivo* [136, 137].

Tintas condutoras a base de metais (Au, Pt, Ag e Pd) ou de grafite, originalmente desenvolvidos na elaboração de circuitos impressos eletrônicos, têm se mostrado eficiente para serem utilizadas na confecção dos eletrodos impressos [138]. Praticamente, todos os artifícios e agentes utilizados na modificação da superfície dos eletrodos de pasta de carbono se adequam com sucesso aos eletrodos impressos. Os processos de modificação de eletrodos mais comuns envolvem a incorporação de enzimas, metais, ácidos nucléicos, tecidos, bactérias, mediadores de elétrons, polímeros, entre outros [137].

Análise por injeção em fluxo associada à detecção amperométrica foi utilizada para a determinação do anestésico injetável procaína em amostras farmacêuticas [139]. Um eletrodo impresso, confeccionado em uma superfície de cerâmica coberta por um filme de tinta condutora a base de grafite, foi desenvolvido para a oxidação do fármaco em +0,80 V (*vs.* pseudo referência de Ag). O método mostrou ser simples e rápido sem a necessidade de modificação prévia ou tratamento eletroquímico da superfície do eletrodo.

Um biossensor amperométrico foi desenvolvido para a quantificação de organofosforados e carbamatos, pesticidas que atuam no sistema nervoso central de

vertebrados e insetos, em amostras ambientais [140]. A enzima tirosinase foi imobilizada mediante ligações cruzadas com glutaraldeído e albumina de soro bovino sobre a superfície de um eletrodo impresso, modificado previamente com ftalocianina de cobalto. A ação catalítica do quelante metálico promoveu uma melhora na sensibilidade e estabilidade do biossensor quando o-quinona foi reduzida eletroquimicamente em -0,20 V (*vs.* Ag/AgCl). O tempo de vida útil deste sensor foi de 10 dias e a constante aparente de Michaelis-Menten, a partir da equação de Eadie-Hofstee, foi de 1,60 x 10^{-3} mol L^{-1}.

3.1.5. Eletrodos de Resistores de Filme de Carbono

Os filmes de carbono são preparados a partir da pirólise de precursores orgânicos e, mediante tratamento eletroquímico em meio ácido, a faixa de potencial de trabalho é estendida para valores correspondentes àqueles encontrados com o eletrodo de diamante, sem comprometer a integridade do filme [17]. Estes eletrodos são mais inertes do que muitas outras formas de carbono, fabricados com elevada reprodutibilidade, são facilmente utilizados em diferentes células eletroquímicas e, por serem produzidos em larga escala, são de baixo custo. Suas características o tornam uma boa opção para serem utilizados como sensores descartáveis em eletroanálises [141-143].

Os filmes de carbono foram modificados com azul da Prússia e cobertos covalentemente com diferentes enzimas para a confecção de biossensores [144]. Estes sensores modificados biologicamente foram empregados na determinação de glicose, etanol, lactato e gluatamato através da redução de peróxido de hidrogênio em +50 mV (*vs.* Ag/AgCl). Amostras de alimento foram utilizadas durante as análises amperométricas.

Eletrodos de filme de carbono foram modificados quimicamente com um filme de hexacianoferrato durante sua imersão por 50 min na solução contendo os sais precursores [145]. O ácido ascórbico foi oxidado em +0,05 V (*vs.* SCE) com um limite de detecção de 2,1 x 10^{-6} mol L^{-1}. O sensor permaneceu estável durante 4 meses. Estes sensores modificados com complexos de cianetos de metais de transição mostraram um bom desempenho quando utilizados como mediadores redox na confecção de biossensores [146].

Eletrodos de filme de bismuto foram confeccionados, a partir de sua deposição na superfície dos resistores de carbono, para a determinação de cádmio, chumbo e zinco empregando a voltametria de onda quadrada [141]. Os melhores valores de limite de detecção e sensibilidade foram obtidos quando o filme foi formado utilizando a eletrodeposição com potencial constante. Porém, o filme de bismuto depositado *in situ* exibiu melhores resultados quanto à reprodutibilidade, com exceção na determinação de zinco em que ambos os métodos apresentaram resultados similares.

A influência do surfactante Triton X-100 na eletrooxidação dos íons cádmio e chumbo sobre a superfície dos eletrodos de filme de carbono cobertos com Nafion® foi investigada por Gouveia-Caridade e Brett [147]. Estudos de impedância e voltametria de onda quadrada foram realizados para monitorar as mudanças ocorridas na interface entre o filme de carbono e o surfactante não iônico. Os autores concluíram que concentrações altas do surfactante (acima de 100 mg L^{-1}) poderiam bloquear os poros do polímero de maneira irreversível, interferindo nos processos eletródicos. As mudanças na estrutura e morfologia dos filmes de Nafion® também foram verificadas quando o eletrodo de mercúrio foi utilizado.

Três diferentes polímeros eletroativos provenientes de monômeros de fenazinas foram estudados para a modificação da superfície dos resistores de carbono [148]. Após a otimização do processo de eletropolimerização (escolha de eletrólito e o seu valor de pH) e estudos das propriedades eletroquímicas dos polímeros, verificou-se que o vermelho neutro apresentou a melhor adesão sobre a superfície do sensor. Além disso, a oxidação e a redução dos filmes são controladas pela difusão, os ânions nitrato e sulfato têm efeito catalítico e o processo não é influenciado pelo oxigênio dissolvido. Esse derivado de fenazina tem sido extensivamente utilizado como mediador redox na construção de vários biossensores para a detecção de glicose, piruvato, álcool, acetaldeído e glicerol, tendo os resistores como materiais de substrato [149-153].

O comportamento eletroquímico de três líquidos iônicos a temperatura ambiente sobre a superfície do eletrodo de filme de carbono foi estudado utilizando a voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica [154]. Depois da remoção de oxigênio, a janela de potencial de trabalho mais ampla (-2,5 até +2,0 V *vs.* Ag/AgCl) foi verificada na presença de um derivado de sulfonamida. Este líquido iônico foi empregado na eletrooxidação de dois derivados de ferroceno, benzoil e

acetil ferroceno, ambos insolúveis em água. Verificou-se um comportamento quase-reversível para os compostos estudados.

3.2. Análises de Paraquat, Paracetamol e Ambroxol

3.2.1. Paraquat

Paraquat (dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio) é um herbicida não seletivo e comumente chamado dicloreto de metil–viologeno por formar, quando reduzido, um composto de cor azul ou violeta. Ele foi produzido pela primeira vez na década de 30 e tem sido utilizado desde a década de 60 do século passado, principalmente, no controle de ervas daninhas [155]. Paraquat é extremamente tóxico podendo ser letal para humanos e animais. Este herbicida pode ser reduzido pela enzima NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo)-citocromo redutase e, sob condições aeróbicas, é oxidado com a formação de superóxido ou outras espécies de oxigênio reduzido. Desta maneira, o organismo humano pode sofrer um "stress" oxidativo ou peroxidação de gorduras [156].

O paraquat é considerado um agente carcinogênico e mutagênico. Por ser uma molécula muito persistente no meio ambiente, há um grande risco de contaminação proveniente de utilizações abusivas. Várias técnicas analíticas têm sido apresentadas na literatura para a sua determinação. Dentre elas destacam-se a cromatografia líquida [157], cromatografia gasosa [158], espectrofotometria [159], eletroforese capilar [160], voltametria [161], potenciometria [162], colorimetria [163] e imunoensaios [164]. Muitos destes métodos incluem pré-tratamento das amostras, uso de reagentes especiais ou de oxidantes com a finalidade de melhorar o sinal analítico do metil–viologeno.

O herbicida tem sido investigado eletroquimicamente em várias superfícies eletródicas, incluindo eletrodos sólidos convencionais [165, 166], eletrodos de mercúrio [161, 167, 168], eletrodos quimicamente modificados com compostos orgânicos ou inorgânicos [169-172], microeletrodos [173, 174], eletrodos de ouro obtidos a partir de discos compactos graváveis [175] e eletrodos impressos [176], para análises, principalmente, em matrizes ambientais e alimentícias.

3.2.2. Paracetamol

Paracetamol (N-acetil-p-aminofenol, 4-acetamido-fenol, acetaminofen ou tilenol) é um analgésico popular e um agente antipirético. Sua ação é similar à aspirina além de ser uma alternativa apropriada para pacientes que são sensíveis ao ácido acetilsalicílico [177]. A ingestão de doses excessivas deste fármaco pode levar à acumulação de metabólitos tóxicos nos quais podem causar severas e algumas vezes hepatoxicidade letal e nefrotoxicidade [178-180].

Para a determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos, a farmacopéia americana recomenda a cromatografia líquida como método oficial [181], enquanto a farmacopéia brasileira cita a técnica espectrofotométrica [182]. Há muitos estudos descritos na literatura para a quantificação deste fármaco em amostras farmacêuticas e fluidos biológicos. Estes incluem espectrofotometria [183-185], fluorimetria [186], cromatografia líquida [187-189], voltametria com diferentes sensores [190-194], entre outros. Além disso, análise em fluxo (FIA) usando detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta tem sido extensivamente empregada na determinação do paracetamol [195-197]. Geralmente estes métodos espectrofotométricos requerem reações de derivatização, reagentes especiais e/ou suas análises são demoradas.

Paracetamol e p-aminofenol, um dos produtos de degradação do fármaco, foram determinados simultaneamente em formulações farmacêuticas através da eletroforese capilar com detecção amperométrica em micro-escala (μTAS, do inglês *Micro Total Analysis System*) [198]. O microdispositivo foi construído em um substrato planar de acrílico (25 mm x 10 mm x 2 mm) e um eletrodo de carbono foi utilizado durante as análises. Nas condições otimizadas, a separação foi promovida sob potencial de 2,0 kV em 150 s com um tempo de injeção de 3 s. Utilizando um potencial de trabalho de +0,6 V (*vs.* Ag/AgCl), foi possível obter faixas lineares de concentração $1,0 \times 10^{-3} - 5,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} e $1,0 \times 10^{-3} - 1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} para paracetamol e p-aminofenol, respectivamente. Este método proporciona redução do volume de reagentes e amostras além de apresentar baixo custo de fabricação, tempo reduzido de análise e não requer pré-tratamento das amostras.

3.2.3. Ambroxol

Ambroxol, trans-4-(2-amino-3,5-dibromobenzilamino) ciclohexanol, atua como um agente mucolítico que melhora a expectoração durante o tratamento agudo ou crônico de doenças respiratórias, estimulando o transporte da mucosa e reduzindo a secreção [199]. Este fármaco é administrado em doses diárias de 30-120 mg e geralmente é encontrado na forma de xaropes ou comprimidos [200].

Muitos métodos analíticos para a determinação de ambroxol em fluidos biológicos e formulações farmacêuticas são encontrados na literatura. Dentre eles, destaca-se cromatografia líquida [201-203], eletroforese capilar [204], espectroscopia Raman [205,206], espectrofotometria [207,208], cromatografia gasosa [209] e voltametria [210,211]. Há poucos procedimentos analíticos automatizados descritos para a quantificação deste fármaco. Atualmente, tem-se cromatografia líquida acoplada à técnica de injeção seqüencial (SIA) e espectrofotometria com análise por injeção em fluxo (FIA) [212-214] descrito na literatura. FIA associado à detecção amperométrica para a determinação de ambroxol é uma alternativa, até o momento, explorada apenas pelo nosso grupo de pesquisa e está descrita no presente trabalho.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e Soluções

Nitrato de potássio, hidróxido de sódio, ácido acético, acetato de sódio, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), hidróxido de sódio, ácido sulfúrico, mono-hidrogenofosfato de sódio, di-hidrogenofosfato de potássio, ácido fosfórico, ácido benzóico e ácido clorídrico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Paracetamol, cafeína, ácido ascórbico, ácido cítrico, lactose e glicose foram obtidos da Sigma (St. Louis, Estados Unidos). Paraquat (dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio) e ácido húmico foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, Estados Unidos). As soluções de referência dos íons metálicos Cd^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+} e Zn^{2+} 1000 mg L^{-1} foram obtidas da Carlo Erba (Milão, Itália). Cloridrato de ambroxol foi gentilmente doado pela Farmácia de Manipulação Arvensis, localizada na cidade de São Paulo.

Todas as soluções foram preparadas a partir da dissolução do sal ou diluição das soluções de referência em eletrólito suporte conveniente, utilizando água ultrapura do sistema da Millipore Milli-Q (resistividade $\geq$ 18 MΩ cm).

4.2. Eletrodos de Trabalho

Eletrodos de filme de carbono foram construídos a partir de resistores cerâmicos, com comprimento de 4 mm, diâmetro externo de 1,5 mm e resistência nominal de 2 Ω. Estes resistores, com 15 μm de espessura de filme, foram fabricados pela deposição pirolítica de carbono (a partir de metano puro) em atmosfera com 5% de nitrogênio [17] e caracterizados por impedância [2].

Os resistores comerciais utilizados são dotados de dois terminais metálicos, encapsulados nas extremidades da peça cilíndrica. A forma mais simples encontrada para o emprego destes resistores como sensores foi através da remoção mecânica de um dos terminais e isolamento elétrico do terminal que permaneceu conectado (para o isolamento foram utilizados tubo plástico e Araldite®). A área cilíndrica exposta do eletrodo foi de 0,17 cm^2.

A seguir é apresentado um esquema da construção dos eletrodos de filme de carbono utilizados durante os estudos eletroquímicos, a partir de resistores (Figura 2).

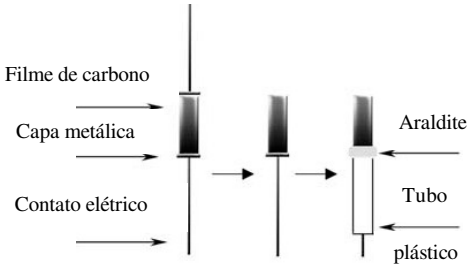


Figura 2 – Esquema simplificado das etapas de construção dos sensores de filme de carbono a partir de resistores.

Antes de utilizar o resistor como eletrodo de trabalho, este foi submetido a um pré-tratamento eletroquímico com ácido perclórico 1,0 mol L^{-1} em velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e controle de corrente em ± 1 mA. Conforme já fora verificado anteriormente por Brett e colaboradores [17] é possível ampliar a janela de potencial de trabalho no sentido anódico e catódico com o uso deste tratamento eletroquímico. Este tratamento (realizado em meio aquoso) promove significativa melhora na sensibilidade e permite que se alcance limites de detecção menores. Desta forma, o pré-tratamento influencia diretamente no desempenho do sensor.

Para efeito comparativo com o eletrodo de filme de carbono, os eletrodos de carbono vítreo (marca Metrohm e área do cilindro 0,18 cm^2) e platina (marca Metrohm e área de 0,07 cm^2) foram utilizados como eletrodos de trabalho durante os estudos voltamétricos de paracetamol e ambroxol em formulações farmacêuticas.

4.3. Instrumentação

4.3.1. Medições Eletroquímicas

Para as medidas voltamétricas foi utilizado um potenciostato ECO Chemie Autolab PGSTAT 20 (EcoChemie, Holanda). Os estudos de voltametria cíclica e de onda quadrada foram realizados em uma célula eletroquímica convencional de 10 mL tendo como transdutor o eletrodo de filme de carbono, como eletrodo auxiliar um fio de platina e como eletrodo de referência $Ag/AgCl_{(KCl\ sat.)}$, construído no

laboratório [215]. Todos os potenciais relacionados ao presente trabalho são referentes a este eletrodo.

Os experimentos amperométricos foram realizados em uma célula eletroquímica construída em acrílico (Figura 3). Os eletrodos de trabalho e de referência foram os mesmos utilizados no sistema estacionário. Porém, um tubo de aço inoxidável, localizado na saída da célula, passou a desempenhar o papel de eletrodo auxiliar. Uma bomba peristáltica (Ismatec, Zurique, Suíça) foi empregada para a propulsão das soluções durante as análises. A injeção das amostras e soluções de referência foi realizada com o auxílio de um injetor comutador manual (CENA, Piracicaba) [216,217]. As conexões utilizadas para este sistema foram de tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm.

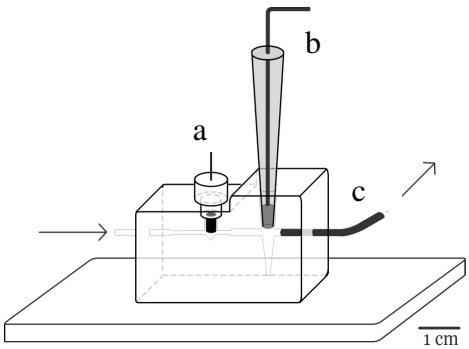


Figura 3 – Representação esquemática da célula amperométrica utilizada nos experimentos: (a) filme de carbono como eletrodo de trabalho, (b) Ag/AgCl o eletrodo de referência e (c) eletrodo auxiliar um tubo de aço inoxidável. As setas indicam a entrada e saída de solução.

4.3.2. Medições Espectrofotométricas

Para efeito de comparação com os resultados eletroquímicos, as amostras farmacêuticas de paracetamol e ambroxol foram submetidas às análises espectrofotométricas. Para tanto, os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro UV-visível (Hitachi U-2001) empregando uma célula convencional de quartzo (caminho óptico de 1,00 cm e volume total de 4 mL).

4.3.3. Medições Titulométricas Ácido-Base

As amostras de produtos farmacêuticos de ambroxol foram submetidas às análises de titulação potenciométrica para efeito de comparação com os resultados eletroquímicos. As medições titulométricas foram realizadas em um pHmetro (Quimis, modelo 400 M1S) conectado a um eletrodo de vidro combinado. Todas as medidas de potencial hidrogeniônico foram obtidas a temperatura ambiente (25° C ± 2° C).

4.4. Procedimento de Análise

As amostras de água de rio utilizadas para as análises de paraquat foram coletadas no canal do rio Jundiaí-Taiaçupeba, localizado na divisa das cidades de Mogi das Cruzes e Suzano, no estado de São Paulo. Logo após a coleta, estas amostras foram acidificadas com ácido sulfúrico (pH ~ 2), filtradas por membranas de acetato de celulose 0,45 mm e mantidas a 4 °C em frascos de polietileno.

As amostras de produtos farmacêuticos empregadas nas análises de paracetamol e ambroxol foram adquiridas comercialmente em drogarias locais. O paracetamol foi quantificado em amostras de comprimidos, ao passo que o ambroxol (na forma de cloridrato) foi determinado em xaropes.

4.4.1. Voltametria de Onda Quadrada

Para a realização das análises do paraquat em amostras de água potável e de rio, a 6,0 mL de amostra foram acrescidos 2,0 mL de nitrato de potássio 0,5 mol L^{-1}. Em seguida, foi adicionada uma solução de hidróxido de sódio 0,2 mol L^{-1}, suficiente para o ajuste da força hidrogeniônica (pH ~7). Finalmente, o volume foi então completado com água deionizada a 10 mL. Esta solução foi homogeneizada e a seguir uma alíquota de 7,0 mL foi transferida para a célula eletroquímica para posterior determinação do herbicida, utilizando o método de adição padrão.

4.4.2. FIA com Detecção Amperométrica

(i) paracetamol: foram analisadas cinco diferentes amostras de comprimidos contendo o fármaco e outras substâncias. Cada um dos comprimidos foi inicialmente dissolvido em balão volumétrico de 100 mL, utilizando água deionizada. Alíquotas de 100 e 150 μL (para comprimidos contendo 750 e 500 mg de paracetamol, respectivamente) foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, que foram completados adequadamente com solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}.

(ii) ambroxol: para a análise de cloridrato de ambroxol, foram empregadas quatro diferentes amostras de xarope contendo o analito e outros componentes. Alíquotas de 120 μL ou 240 μL de amostras (para xaropes contendo 30 e 15 mg do fármaco, respectivamente) foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1}.

4.4.3. Espectrofotometria

(i) paracetamol: para efeito de comparação, o paracetamol foi determinado nas amostras farmacêuticas utilizando o método proposto pela farmacopéia brasileira [182]. Para tanto, uma massa definida do fármaco foi dissolvida em 10 mL de metanol, completando-se um volume de 500 mL com água deionizada. Desta solução, diluições apropriadas foram feitas, sendo as soluções resultantes empregadas na análise por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, com absorbâncias medidas em 254 nm.

(ii) ambroxol: este fármaco foi quantificado nas amostras empregando o método descrito na literatura [218]. Neste método, uma certa quantidade do analito foi dissolvida em ácido clorídrico 0,1 mol L^{-1}, completando-se um volume de 100 mL com o mesmo ácido. Diluições apropriadas desta solução foram realizadas bem como as soluções resultantes foram utilizadas na análise por espectrofotometria, com absorbâncias medidas em 244 nm.

4.4.4. Titulação Ácido-Base

O ambroxol foi também quantificado nas amostras farmacêuticas empregando o método recomendado pela farmacopéia britânica [219], baseado na titulação potenciométrica. Uma certa quantidade do fármaco em metanol, na presença de ácido clorídrico, foi titulada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L^{-1}. O volume de hidróxido adicionado entre as duas inflexões da curva foi estimado e utilizado para calcular a massa equivalente do fármaco. A primeira inflexão refere-se à titulação do ácido clorídrico, enquanto a segunda, à desprotonação do ambroxol.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme já mencionado, a proposta inicial deste trabalho envolvia o desenvolvimento de resistores de filme de carbono como sensores voltamétricos associados à voltametria de onda quadrada e ao sistema de injeção em fluxo (FIA) com detecção amperométrica, para aplicações analíticas. Três diferentes sistemas foram estudados e direcionados à análise do herbicida paraquat e aos fármacos paracetamol e ambroxol, conforme descrito nas seções seguintes.

5.1. Quantificação de Paraquat em Amostras Ambientais Utilizando Voltametria de Onda Quadrada

5.1.1. Voltametria Cíclica

O comportamento voltamétrico do paraquat (PQ) tem sido investigado extensivamente utilizando vários tipos de sensores, incluindo eletrodos sólidos (modificados ou não) e de mercúrio [220]. A Figura 4 apresenta os voltamogramas cíclicos para uma solução de PQ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em diferentes soluções de eletrólito suporte 0,1 mol L^{-1} e utilizando o eletrodo de filme de carbono, construído a partir de um resistor. A linha cheia corresponde a um voltamograma cíclico realizado em meio de nitrato de potássio, a linha pontilhada à solução de tampão fosfato (pH 6,0) e a linha tracejada à solução de tampão acetato de sódio/ácido acético (pH 4,7).

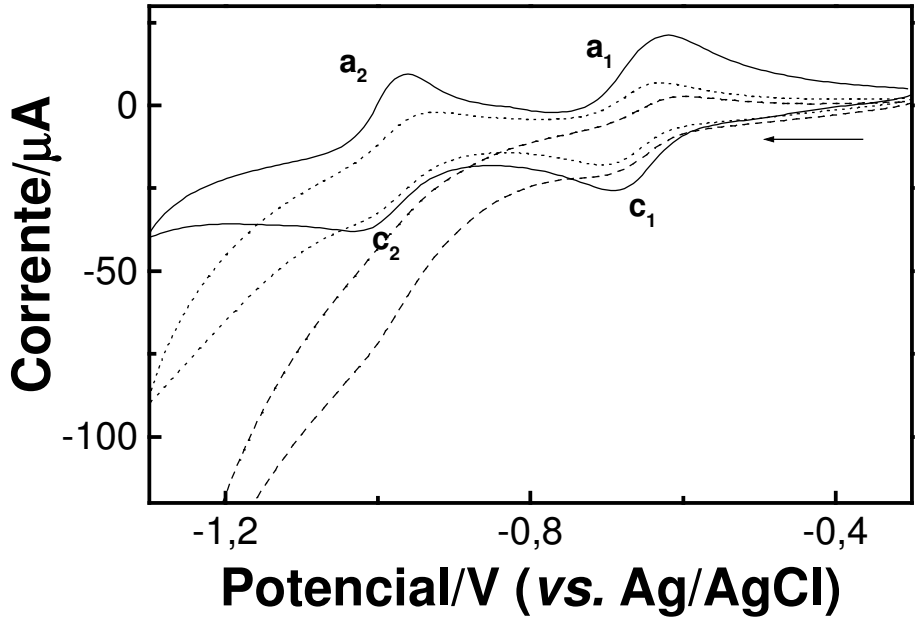


Figura 4 – Voltamogramas cíclicos de PQ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em três diferentes soluções de eletrólito 0,1 mol L^{-1} sobre o eletrodo de filme de carbono: nitrato de potássio (linha cheia), tampão fosfato pH 6,0 (linha pontilhada) e tampão acetato pH 4,7 (linha tracejada). Área do eletrodo de 0,17 cm^2. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1}.

Na Figura 4 observa-se que os picos de redução (c_1,c_2) e os de oxidação (a_1,a_2) do paraquat são bem definidos em eletrólito nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1}. Praticamente não se verifica o pico de redução (c_2) do herbicida em tampão acetato 0,1 mol L^{-1}. Em meio de fosfato, tem-se uma condição intermediária, mas com definição de picos muito inferior àquela obtida em meio de nitrato. As duas ondas de redução do PQ em nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1} são verificadas em -0,68 V (c_1) e -1,02 V (c_2) *vs.* Ag/AgCl. Este comportamento, de acordo com a literatura, pode ser atribuído ao seguinte mecanismo [161,220]:

$$PQ^{2+} + 1e^- \leftrightarrow PQ^{\bullet+} \quad \textbf{(1)}$$

$$PQ^{\bullet+} + 1e^- \leftrightarrow PQ^0 \quad \textbf{(2)}$$

$$PQ^{2+} + PQ^0 \leftrightarrow 2\,PQ^{\bullet+} \quad \textbf{(3)}$$

O cátion paraquat, PQ^{2+}, é convertido a um radical azul $PQ^{\bullet+}$ em um processo rápido, reversível, que envolve um elétron em aproximadamente -0,68 V (equação 1). Este radical pode adsorver na superfície do eletrodo e, em varreduras para potenciais mais negativos, ser reduzido reversivelmente para formar espécies neutras, PQ^0, em -1,02 V (equação 2). De acordo com a literatura, uma outra reação também pode ocorrer entre PQ^{2+} e PQ^0 gerando $PQ^{\bullet+}$ (equação 3) [161,169].

Os resultados obtidos na Figura 4 e um estudo adicional de pH com solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH variando entre 6 e 10) mostraram que em meio de nitrato de potássio tem-se a melhor condição para o processo de redução do paraquat. Logo, nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1} foi selecionado como solução eletrolítica para os experimentos voltamétricos seguintes.

A Figura 5 apresenta o estudo da variação da corrente com as velocidades de varredura, de 10 a 70 mV s^{-1} (Figura 5A) e de 100 até 900 mV s^{-1} (Figura 5B), utilizando uma solução de PQ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em meio de nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1}. Verifica-se que há um aumento de corrente nas ondas catódicas (c_1 e c_2) e anódicas (a_1 e a_2) bem como os potenciais de picos deslocam-se para regiões mais negativas e positivas para os processos de redução e oxidação, respectivamente. Ainda comparando as Figuras 5A e 5B, observa-se dois perfis voltamétricos distintos. O processo de redução é praticamente independente da velocidade de varredura, verificando-se em todas as condições dois picos de redução bem definidos (c_1 e c_2) correspondendo às reações de $PQ^{2+}/PQ^{\bullet+}$ e $PQ^{\bullet+}/PQ^0$, respectivamente. De acordo com a literatura [161,220], em velocidades baixas o processo de redução para PQ^{2+} torna-se menos reversível. Conseqüentemente, o pico de oxidação a_1 é substituído progressivamente pelos picos a_3 e a_4 como pode ser observado na Figura 5A. Este aspecto foi bem discutido por Walcarius e colaboradores [221] que constataram uma forte interação entre o

cátion radicalar e a superfície do eletrodo, promovendo a oxidação do íon $PQ^{\bullet+}$ resultante das reações eletroquímicas e/ou de comproporcionamento (equação 3).

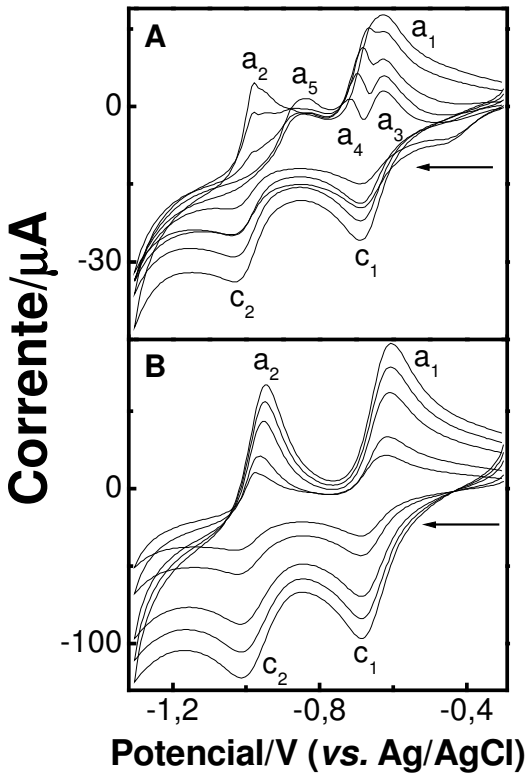


Figura 5 – Voltamogramas cíclicos de uma solução PQ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1} em diferentes velocidades de varredura: (A) 10, 20, 30, 50 e 70 mV s^{-1}; (B) 100, 200, 500, 700 e 900 mV s^{-1}. a_1-a_5: correspondem aos picos anódicos. c_1 e c_2: representam os picos catódicos.

Conforme Monk e colaboradores [222], o pico de oxidação a_5 pode representar a oxidação do dímero radicalar (equação 4) proveniente da reação entre os íons $PQ^{\bullet+}$. Os autores também constataram o aparecimento do pico anódico a_5, detectável somente em baixas velocidades de varredura.

$$(PQ)_2^{2+} \rightarrow 2e^- + 2PQ^{2+} \quad \textbf{(4)}$$

5.1.2. Voltametria de Onda Quadrada

5.1.2.1. Curva de Calibração e Estudo de Estabilidade

Visando a determinação de baixas concentrações de PQ, foi necessário inicialmente estudar as melhores condições operacionais (freqüência, *f*, amplitude da onda quadrada, *a*, e incremento de varredura, ΔE_s) para sua determinação por voltametria de onda quadrada (VOQ). Para estes experimentos, utilizou-se uma solução de PQ 2,0 x 10^{-5} mo L^{-1} em eletrólito de nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1}. Além disso, para o monitoramento da corrente de redução considerou-se apenas a onda catódica c_1 por não apresentar problemas de adsorção consideráveis, fato este também constatado por Souza e colaboradores [175].

Durante a investigação da variação da freqüência (20 – 500 s^{-1}) com o sinal analítico, verificou-se um aumento proporcional na corrente catódica até *f* igual a 100 s^{-1}, com deslocamento de potenciais para regiões mais negativas. Para freqüências acima de 100 s^{-1}, houve uma influência menos significativa na resposta voltamétrica. Por este motivo, optou-se por *f* igual a 100 s^{-1}.

Quando a amplitude da onda quadrada aumentou de 10 até 25 mV, observou-se um aumento linear na corrente de redução do herbicida. Para valores compreendidos entre 25 e 50 mV, não houve uma alteração considerável no sinal voltamétrico. Logo, escolheu-se uma amplitude de 25 mV.

O incremento de varredura foi investigado no intervalo de 1 até 5 mV. Neste estudo, constatou-se uma pequena mudança na corrente catódica e fixou-se ΔE_s em 2 mV.

Na Tabela 1, encontram-se resumidos os parâmetros estudados e selecionados para as análises com a voltametria de onda quadrada. Estes valores serão, posteriormente, utilizados na elaboração da curva de calibração do paraquat.

Tabela 1 – Parâmetros avaliados e condições de trabalho selecionadas

Parâmetros avaliados em VOQ		
Parâmetro	**Faixa estudada**	**Valor selecionado**
Freqüência, *f*, (s^{-1})	20 – 500	100
Amplitude, *a*, (mV)	10 – 50	25
Incremento, ΔE_s, (mV)	1 – 5	2

Outras condições investigadas foram a força iônica e o pH da solução eletrolítica. A força iônica, mantida com nitrato de potássio, foi estudada na faixa de 0,05 até 1,0 mol L^{-1} enquanto que o pH do meio foi avaliado entre os valores de 7,0 até 11, empregando a voltametria de onda quadrada sobre o eletrodo de filme de carbono. Nestes experimentos, verificou-se a máxima corrente com valor de força iônica igual a 0,1 mol L^{-1}. Para forças iônicas maiores, ocorreu um significativo decréscimo de corrente com o incremento da concentração do eletrólito. Em presença de 0,05 mol L^{-1} de nitrato de potássio, também ocorreu diminuição do sinal voltamétrico c_1. A Figura 6 apresenta os respectivos voltamogramas de onda quadrada para uma solução de PQ 2 x 10^{-5} mol L^{-1}, em diferentes forças iônicas de uma solução de nitrato de potássio. O estudo do efeito do pH (7 – 11) na resposta voltamétrica indicou uma variação muito pequena nos sinais de corrente. Deste modo foi adotado o pH 7 para os experimentos voltamétricos subseqüentes, em meio de nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1}.

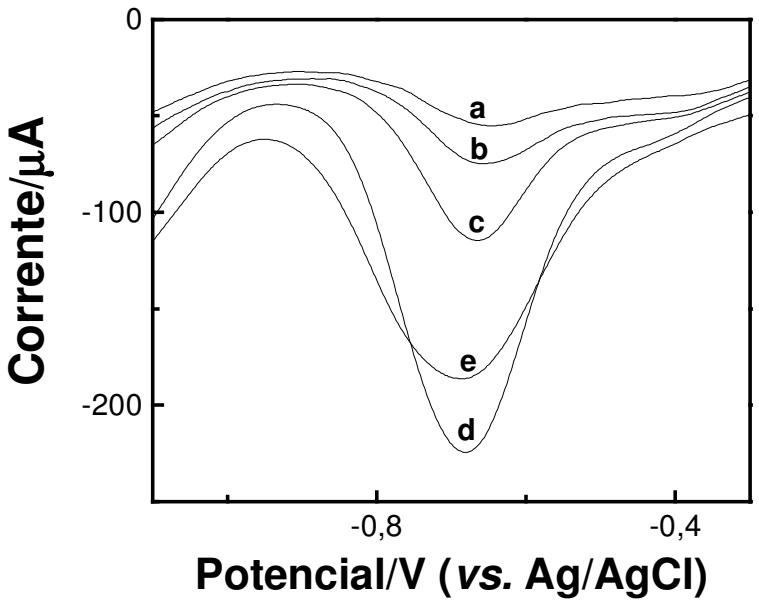


Figura 6 – Estudo da força iônica com nitrato de potássio empregando voltametria de onda quadrada sobre o eletrodo de filme de carbono: (a) 1,0, (b) 0,5, (c) 0,3, (d) 0,1 e (e) 0,05 mol L^{-1}. Parâmetros experimentais: f : 100 s^{-1}, a : 25 mV, ΔE_s : 2 mV. Solução de PQ 2,0 x 10^{-5} mol L^{-1}.

Após as etapas de otimização, diferentes alíquotas de uma solução estoque de paraquat 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1} foram adicionadas à solução de nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1} com o intuito de determinar a relação linear entre os sinais de corrente voltamétrica e a concentração do herbicida. A partir dos resultados obtidos, foi possível estabelecer uma curva analítica para o pico de redução (c_1) na faixa de concentração situada entre 8,6 x 10^{-8} e 1,9 x 10^{-6} mol L^{-1} (Figura 7). A equação de regressão correspondente à faixa linear de concentração para o paraquat é $i/\mu A = 0,61 + 8,43\ c$, com r = 0,999, no qual c corresponde à concentração de PQ em µmol L^{-1}. O limite de detecção foi estimado em 2,5 x 10^{-8} mol L^{-1} (três vezes o desvio padrão do branco) [223].

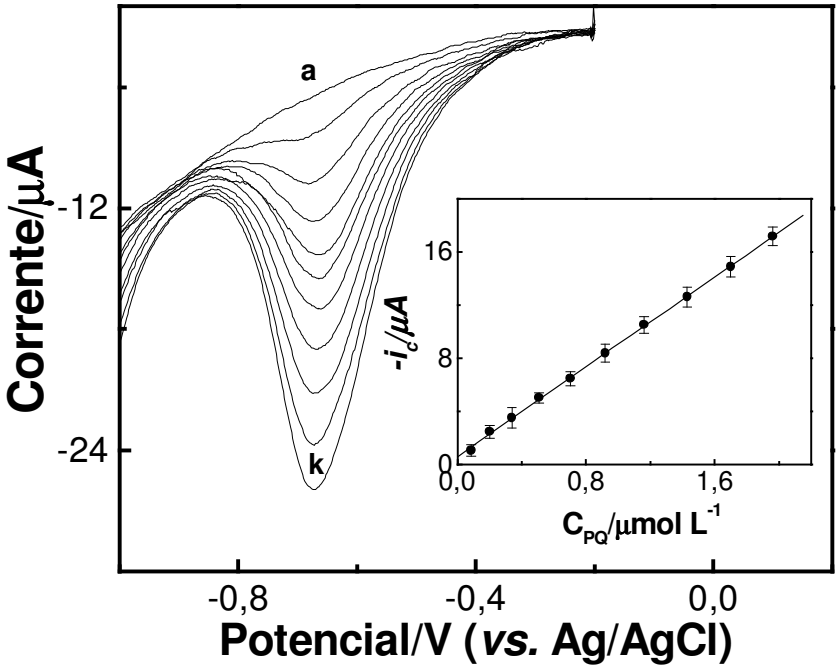


Figura 7 – Voltamogramas de onda quadrada para PQ em nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1} utilizando eletrodo de filme de carbono, com f : 100 s^{-1}, a : 25 mV, ΔE_s : 2 mV. Concentrações de PQ: (a) branco, (b) 8,6 x 10^{-8}, (c) 2,0, (d) 3,4, (e) 5,1, 7,0, (g) 9,2 x 10^{-7}, (h) 1,2, (i) 1,4, (j) 1,7, (k) 1,9 x 10^{-6} mol L^{-1}. As intensidades de corrente referem-se à resultante dos pulsos diretos e reversos. Área do eletrodo: 0,17 cm^2.

O eletrodo de filme de carbono apresentou estabilidade muito satisfatória. Nenhuma alteração significativa foi observada após o sensor ter sido submetido às condições da análise por VOQ, durante um dia inteiro de experimentos.

Para avaliar o desempenho do sensor por períodos mais longos, medições com o mesmo transdutor foram realizadas ao longo de 5 dias. Para tal, foi escolhida uma solução de PQ 2,0 x 10^{-6} mol L^{-1} em nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1} que foi analisada exaustivamente no período correspondente. A Figura 8 mostra que nos dois primeiros dias não houve variação ao passo que nos dias seguintes o sinal aumentou, chegando a um sinal 7,6% maior no quinto dia. Simultaneamente foi registrado um pequeno deslocamento dos sinais de pico. Na Figura 8 é apresentado (com

ampliação) o sinal do pico catódico (c_1) registrado no primeiro e no quinto dia. Esta melhora no desempenho do sensor foi atribuída ao tratamento eletroquímico em meio de $HClO_4$ realizado diariamente, antes das medições com PQ.

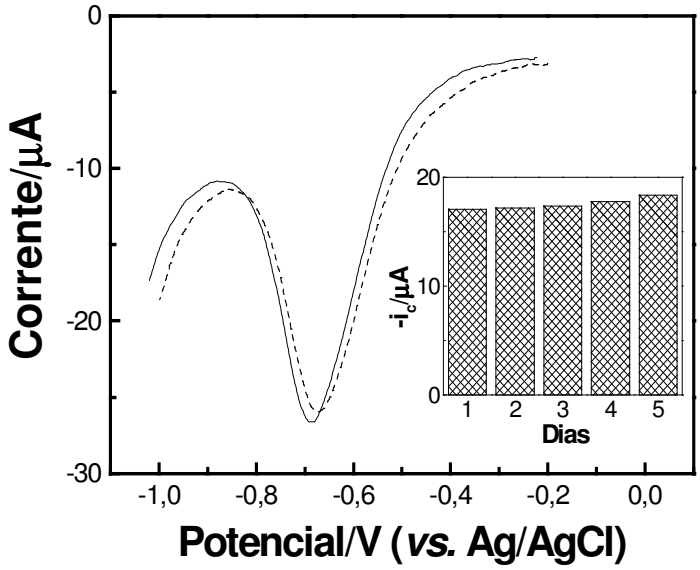


Figura 8 – Voltamogramas de um eletrodo de filme de carbono após sua utilização em análises de PQ. (---) representa o 1° dia e (—) corresponde ao 5° dia de experimentos. Detalhe: representação gráfica das correntes catódicas obtidas com o mesmo sensor durante cinco dias consecutivos. PQ 2,0 x 10^{-6} mol L^{-1} em KNO_3 0,1 mol L^{-1}.

Barroso-Fernandez e colaboradores [224] verificaram, ao imergir um eletrodo de grafite não modificado em uma solução de PQ 1,0 x 10^{-5} mol L^{-1}, um aumento na corrente de redução do PQ já nos primeiros minutos de experimento voltamétrico. Além disso, eles também observaram que a estabilização do sinal foi possível após oito minutos. Estes autores obtiveram somente uma melhora na durabilidade e sensibilidade quando o eletrodo de grafite foi modificado com Nafion® e mantido em uma solução NaCl 1,0 mol L^{-1} durante 16 h.

5.1.2.2. Interferências

Um estudo de interferência foi realizado na presença de alguns íons metálicos bem como do ácido húmico, utilizando uma solução de paraquat 3,40 x 10^{-7} mol L^{-1} em meio de nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1}. Os íons metálicos são facilmente encontrados em águas poluídas ao passo que o ácido húmico representa um dos principais componentes da matéria orgânica natural dos solos. Os íons metálicos Cd^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+} e Zn^{2+} foram adicionados na concentração de 3,40 x 10^{-4} mol L^{-1} assim como o ácido húmico foi adicionado à solução de paraquat nas concentrações de 3,06 x 10^{-6} e 3,06 x 10^{-5} mol L^{-1}. As razões de concentrações entre o herbicida e os prováveis interferentes são apresentadas na Tabela 2. As condições experimentais foram as mesmas utilizadas para a confecção da curva de calibração. O critério empregado para este estudo baseou-se na análise das alturas das correntes de pico do PQ obtidas a partir dos voltamogramas de onda quadrada, na medida em que o possível íon interferente foi acrescentado à solução.

Tabela 2 – Influência de alguns íons metálicos e do ácido húmico sobre o sinal de redução do PQ 3,40 x 10^{-7} mol L^{-1} em nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1}.

Interferente	**Razão C_{interf}/C_{PQ}**	**Δi_p (%)**
Cd^{2+}	1000	-41
Cu^{2+}	1000	+0,6
Pb^{2+}	1000	-29
Zn^{2+}	1000	-8,3
Ácido húmico	9	-9,1
	90	-27

onde C_{interf} = concentração do íon interferente, C_{PQ} = concentração do paraquat, Δi_p = variação na corrente de pico do paraquat.

De modo geral, as espécies escolhidas para o teste de interferência apresentaram variações significativas na altura de corrente de pico do paraquat, com exceção ao íon Cu^{2+}. Logo, as análises do PQ por voltametria de onda quadrada

empregando o filme de carbono como eletrodo de trabalho sofrem interferência dos íons Cd^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+} e do ácido húmico nas proporções indicadas na Tabela 2. Estudos realizados por Oliveira e colaboradores [169] e Zen e colaboradores [42] mostraram que as espécies escolhidas para este estudo também causaram alterações na magnitude da corrente de pico de redução do analito.

Recentemente, outros pesquisadores [225] também constataram um decréscimo na corrente catódica durante as análises de PQ, utilizando eletrodo de carbono modificado. Eles relatam que a presença de espécies inorgânicas e matéria orgânica, presentes em águas naturais, inibem a acumulação do herbicida na superfície do eletrodo causando a variação de sinal.

Conforme Oliveira e colaboradores [169] o paraquat pode sofrer interações eletrostáticas com alguns interferentes, dentre as quais, substâncias orgânicas presentes em águas de rio. Desta maneira, ocorre um decréscimo na concentração efetiva do herbicida presente na interface eletrodo/solução e conseqüentemente, uma diminuição da resposta voltamétrica. Esta explicação, possivelmente, pode justificar o decréscimo no sinal do PQ quando a solução do analito foi acrescida de ácido húmico.

Através da adição de EDTA 2,0 x 10^{-3} mol L^{-1} ainda verifica-se uma interferência dos metais em até -8,0% no sinal do herbicida. Lu e Sun [170] empregaram eletrodos modificados com filmes de Nafion® e também verificaram a diminuição do pico do paraquat na presença de EDTA, se bem que de forma mais discreta do que aquela observada em eletrodos não modificados. Estes autores usaram uma solução de EDTA 0,05 mol L^{-1}, condição mais favorável, considerando o compromisso entre a diminuição do sinal analítico e a presença do íon metálico.

5.1.2.3. Determinação de Paraquat em Amostras Ambientais

O desempenho do eletrodo de filme de carbono empregando a voltametria de onda quadrada na quantificação do PQ foi realizado através das análises de amostras de água potável e de rio. Foi verificado que estas amostras não

apresentaram quantidades detectáveis do analito e desta forma optou-se por sua utilização para testes de recuperação empregando uma solução de PQ 3,40 x 10^{-7} mol L^{-1}. As determinações foram realizadas pelo método de adição padrão nas mesmas condições experimentais da curva analítica. As amostras de água potável e de rio apresentaram valores de recuperação de 93% ($PQ_{recuperado}$ = 3,17 ± 0,10 x 10^{-7} mol L^{-1}) e 90% ($PQ_{recuperado}$ = 3,06 ± 0,15 x 10^{-7} mol L^{-1}), respectivamente. Estes valores (satisfatórios considerando-se a baixa concentração e a presença de uma matriz relativamente complexa) indicam que o herbicida não sofre grandes interferências de outras espécies presentes nas amostras de água utilizadas nos experimentos aqui descritos.

5.1.3. Conclusões Parciais

Este estudo descreve a quantificação voltamétrica do paraquat em amostras ambientais utilizando um novo sensor de filme de carbono. Experimentos preliminares, em diferentes eletrólitos, mostraram que em meio de nitrato de potássio tem-se a melhor condição para o processo de redução do herbicida. A associção do novo sensor à voltametria de onda quadrada possibilitou obter um baixo limite de detecção (2,5 x 10^{-8} mol L^{-1}) bem como análises simples e rápidas. Porém, verificou-se uma pequena interferência de outros compostos, presentes em amostras ambientais, no sinal analítico do paraquat. Possivelmente, este problema pode ser contornado pelo uso de filmes poliméricos como o Nafion® ou acetato de celulose. Estes resultados foram divulgados mediante publicação de artigo científico no periódico Tecno-Lógica da Universidade de Santa Cruz do Sul [35].

5.2. Quantificação de Paracetamol em Formulações Farmacêuticas Utilizando Análises em Fluxo com Detecção Amperométrica

5.2.1. Voltametria Cíclica

A Figura 9 apresenta os voltamogramas cíclicos para o estudo do comportamento eletroquímico do paracetamol sobre a superfície do filme de carbono em um intervalo de pH 2,0 até 12. Para estes experimentos, foi utilizada uma solução do analito 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}.

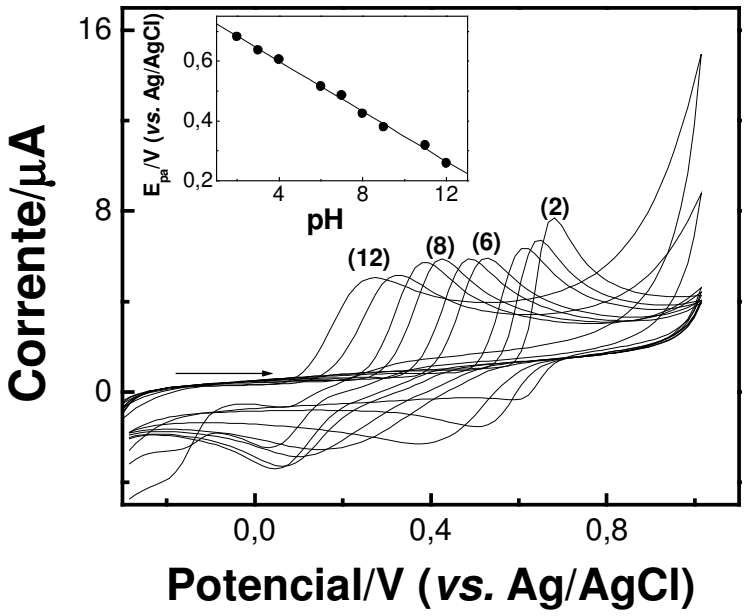


Figura 9 – Voltamogramas cíclicos de uma solução de paracetamol 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} em diferentes valores de pH (2,0 - 12). Área do eletrodo de filme de carbono: 0,17 cm^2. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1}.

Observa-se que o potencial de oxidação diminui com o aumento do valor de pH da solução, fato este melhor visualizado no detalhe da Figura 5. Este comportamento pode ser atribuído à hidrólise do fármaco formando compostos

reduzidos, tais como a p-hidroxianilina [226]. A mudança no sentido negativo do potencial de pico anódico (E_{pa}) com o aumento do valor de pH pode ser descrita conforme a equação abaixo:

$$E_{pa}\ (V/\ vs.\ Ag/AgCl) = +\ 0.76 - 0.042\ \{pH\} \quad \textbf{(5)}$$

O valor teórico da inclinação da curva de E_{pa} *vs.* pH é de 59 mV pH^{-1} para um processo envolvendo dois prótons e dois elétrons (equação de Nernst). Porém, o valor de 42 mV pH^{-1} descrito na equação 5, mostra que o mecanismo de oxidação do paracetamol é mais complexo. Este valor está bem próximo daquele encontrado por Gilmartin e Hart [227] de 46,5 mV pH^{-1}, em uma faixa de pH similar àquela utilizada neste experimento.

Para valores de pH acima de 10, o processo de oxidação torna-se cineticamente menos favorável e a adsorção do analito sobre a superfície do eletrodo ocorre mais intensamente. Este fato pode ser justificado devido à presença do grupo fenólico. Em um meio mais ácido (pH 2,0), o potencial de pico anódico aumenta significativamente assim como se verifica uma onda catódica pouco definida para o processo de redução da N-acetil-p-quinonaimina (NAPQI). Conforme Vanbenschoten e colaboradores [228] e Miner e colabradores [229], para estudos com voltametria cíclica e utilizando baixos valores de pH da solução eletrolítica, a espécie NAPQI protonada pode ser convertida para uma forma hidratada e eletroinativa, alterando o perfil catódico.

Os resultados obtidos anteriormente foram decisivos na escolha do valor de pH da solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}. O valor de pH 8,0 foi eleito para este estudo por apresentar uma melhor relação sinal/ruído bem como promover a oxidação do analito em um potencial relativamente baixo.

A Figura 10 apresenta os voltamogramas cíclicos de uma solução de paracetamol 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0) sobre os eletrodos de filme de carbono (linha sólida) e carbono vítreo (linha pontilhada). Observando os resultados, a resposta do eletrodo de filme de carbono é mais favorável à oxidação do analito em comparação àquela apresentada pelo eletrodo de carbono vítreo convencional. O filme de carbono exibe uma corrente de pico maior além de um potencial de pico anódico menos positivo (Epa ~ +0,4 V *vs.* Ag/AgCl).

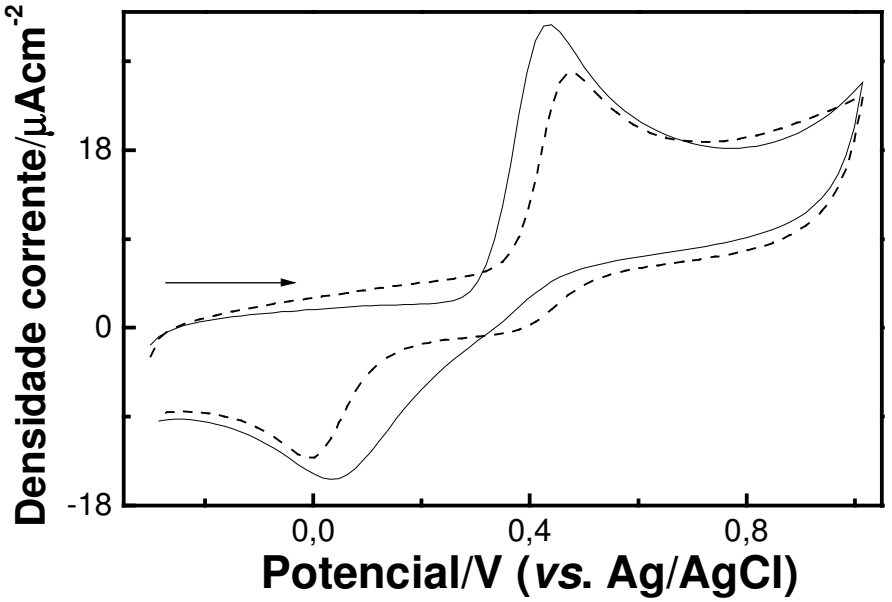


Figura 10 – Voltamogramas cíclicos utilizando os eletrodos de filme de carbono (linha cheia) e carbono vítreo (linha tracejada) numa solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0) contendo paracetamol 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Áreas dos eletrodos: filme de carbono: 0,17 cm^2 e carbono vítreo: 0,18 cm^2. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1}.

Investigou-se a variação da corrente com as velocidades de varredura (0,01 até 0,9 V s^{-1}) usando uma solução de paracetamol 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0). A Figura 11 mostra que houve um aumento nas correntes de oxidação e redução bem como os potenciais de pico deslocaram-se para regiões mais positivas e negativas conforme os processos de oxidação e redução, respectivamente. As correntes de pico de oxidação e redução variaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, com um coeficiente de correlação (r) > 0,999, sugerindo um processo controlado pela difusão.

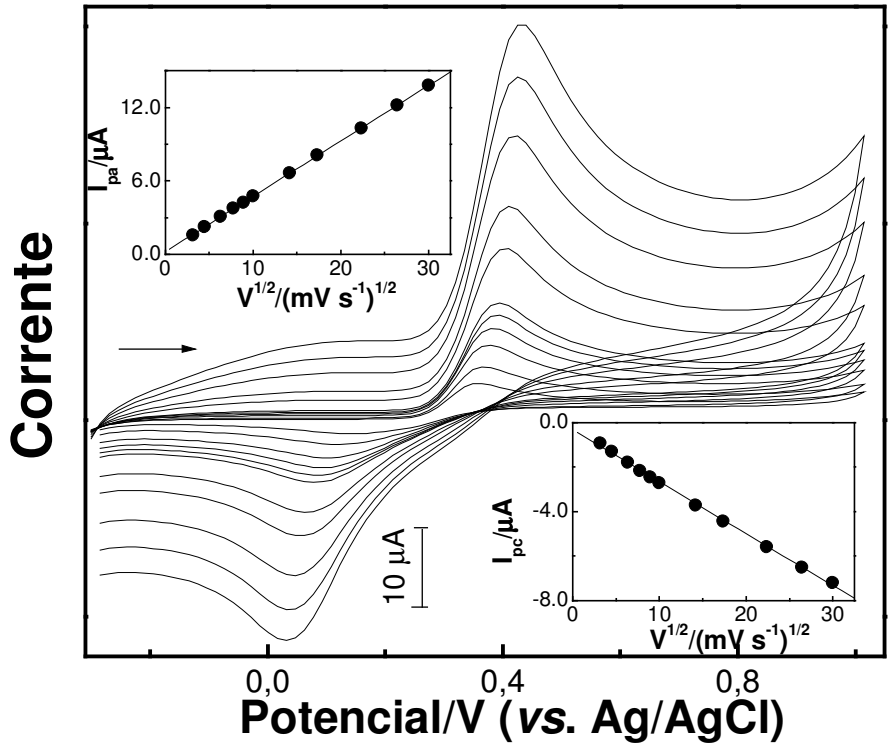


Figura 11 – Voltamogramas cíclicos de uma solução de paracetamol 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0) em diferentes velocidades de varredura. O detalhe mostra a relação entre as correntes anódicas e catódicas com a velocidade de varredura, $\nu^{1/2}$.

A Figura 12 apresenta os voltamogramas cíclicos resultantes de adições crescentes de paracetamol em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0) sobre o eletrodo de filme de carbono. O sinal obtido para cada concentração do fármaco foi muito estável e reprodutível. Além disso, verifica-se no detalhe da Figura 12 uma relação linear entre as correntes de oxidação e as concentrações de paracetamol em um intervalo compreendido entre 1,0 x 10^{-5} e 2,3 x 10^{-3} mol L^{-1}.

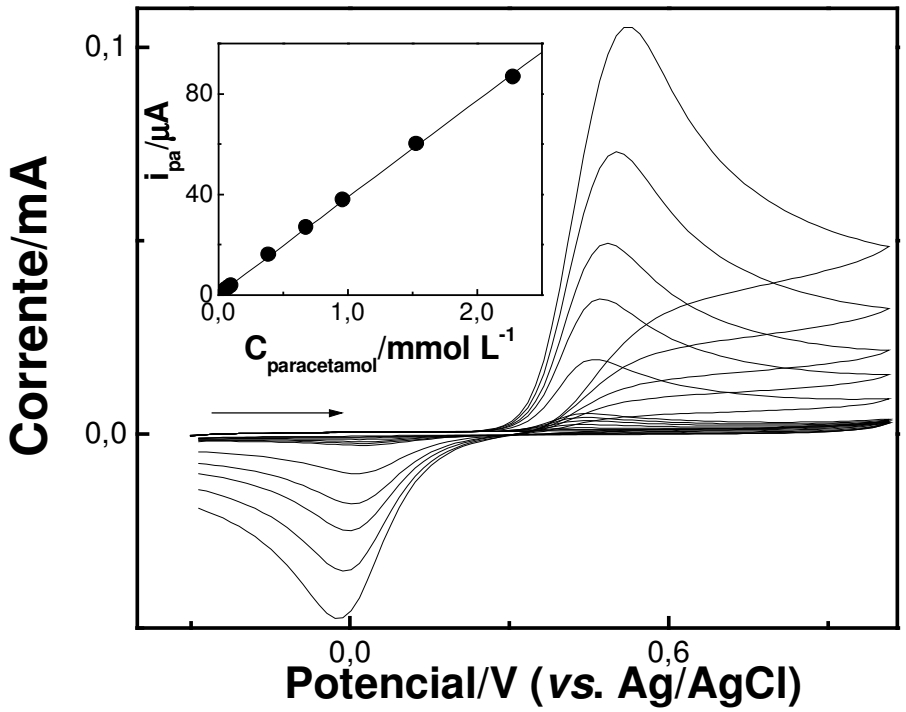


Figura 12 – Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de filme de carbono (A: 0,17 cm^2) em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0) contendo 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 x 10^{-5}; 1,0, 4,0 e 7,0 x 10^{-4}; 1,0, 1,5 e 2,3 x 10^{-3} mol L^{-1} de paracetamol. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1}. Parâmetros da regressão linear: inclinação de 38,54 ± 0,30 µA/mM e intercepto de 0,25 ± 0,27 µA.

5.2.2. Análises em Fluxo com Detecção Amperométrica

5.2.2.1. Curva Analítica, Estudos de Repetibilidade e Interferências

Para estabelecer as condições mais favoráveis para a determinação do analito, algumas variáveis envolvidas na operação FIA (potencial de trabalho, vazão e alça de amostragem) foram estudadas. Estes experimentos foram realizados

alterando uma variável de cada vez, mantendo constante todas as outras. Além disso, para a obtenção dos voltamogramas hidrodinâmicos, utilizou-se uma solução de paracetamol 1,0 x 10^{-5} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0).

O efeito do potencial de trabalho na resposta amperométrica do paracetamol foi investigado na faixa compreendida entre +0,4 e +0,8 V (*vs.* Ag/AgCl). Verifica-se que a corrente anódica aumenta significativamente com o aumento do valor de potencial até +0,6 V. Para valores de potenciais superiores, a corrente torna-se independente do potencial aplicado. O potencial de +0,6 V foi utilizado em todos os experimentos seguintes por corresponder ao valor máximo de sinal amperométrico observado, garantindo a completa oxidação do fármaco.

A influência da vazão (de 1,0 até 5,0 mL min^{-1}) e da alça de amostragem (de 50 até 300 μL) foi avaliada sobre o sinal analítico do paracetamol. A corrente de oxidação aumenta com a vazão até 3,0 mL min^{-1} e permanece virtualmente constante para vazões mais altas. A vazão de 2,0 mL min^{-1} foi eleita por combinar menor consumo de reagentes, melhor repetibilidade (para cinco injeções consecutivas de paracetamol 1,0 x 10^{-5} mol L^{-1}, obteve-se um desvio padrão relativo de 1,9% e 8,7% para as vazões de 2,0 e 3,0 mL min^{-1} respectivamente) e freqüência analítica elevada (50 determinações por hora). O sinal amperométrico aumenta quase linearmente com a variação da alça de amostragem de 50 até 150 μL. Porém, o aumento de corrente não é tão significativo para volumes maiores. A alça de 150 μL foi escolhida devido a melhor relação entre reprodutibilidade e freqüência analítica.

Na Tabela 3, encontram-se resumidos os parâmetros estudados e selecinados para a análise por injeção em fluxo. Com estes valores, voltou-se a atenção para a elaboração da curva analítica, procurando trabalhar em faixas de concentração que apresentassem comportamento linear.

Tabela 3 – Parâmetros avaliados e condições de trabalho selecionadas.

Parâmetros avaliados no modo FIA		
Parâmetro	**Faixa estudada**	**Valor selecionado**
Potencial (V) *vs.* Ag/AgCl	0,4 – 0,8	0,6
Vazão (mL min^{-1})	1,0 – 5,0	2,0
Alça de amostragem (μL)	50 – 300	150

Uma série de experimentos, em triplicata e sob as condições otimizadas, foi conduzida para obter a curva de calibração. Todas as soluções padrão foram convenientemente diluídas a partir de uma solução estoque de 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1}. A Figura 13 exibe uma seqüência de picos de corrente anódica para soluções padrão de paracetamol, cujos valores de concentração situaram-se entre 8,0 x 10^{-7} e 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Com este intervalo de concentração, verifica-se um excelente ajuste da regressão linear com coeficiente de correlação de 0,999 (detalhe da Figura 13).

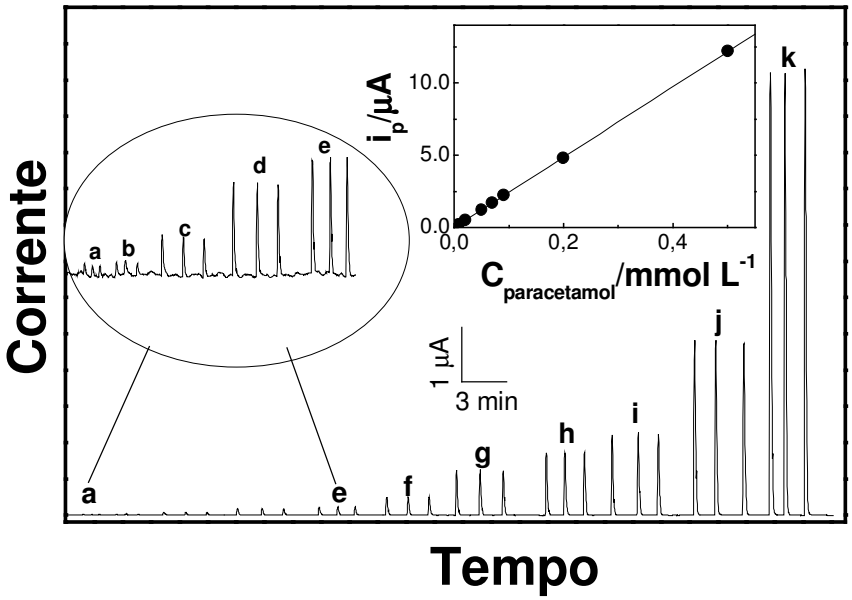


Figura 13 – Respostas amperométricas do filme de carbono para concentrações crescentes de paracetamol em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} : (a) 8,0 x 10^{-7}, (b) 1,0, (c) 3,0, (d) 7,0, (e) 9,0 x 10^{-6}, (f) 2,0, (g) 5,0, (h) 7,0, (i) 9,0 x 10^{-5}, (j) 2,0, (k) 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Potencial de trabalho: +0,6 V (*vs.* Ag/AgCl), vazão: 2,0 mL min^{-1}, alça: 150 µL. O detalhe mostra a curva de calibração correspondente.

A faixa linear de concentração para o fármaco apresentou uma inclinação de 24,34 ± 0,07 µA/mM e um intercepto de 0,004 ± 0,011µA. O limite de detecção foi estimado em 1,36 x 10^{-7} mol L^{-1} (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação) e o limite de quantificação foi calculado como 4,53 x 10^{-7} mol L^{-1}.

A Figura 14 apresenta injeções alternadas de 150 µL de soluções de paracetamol 5,0 x 10^{-6} (a) e 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} (b) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0). A repetibilidade do sinal amperométrico, para ambas as concentrações, mostra que não há efeito de memória durante as injeções. Além disso, foram obtidos desvios padrões relativos de 3,1 e 1,3% para soluções de paracetamol 5,0 x 10^{-6} e 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}, respectivamente.

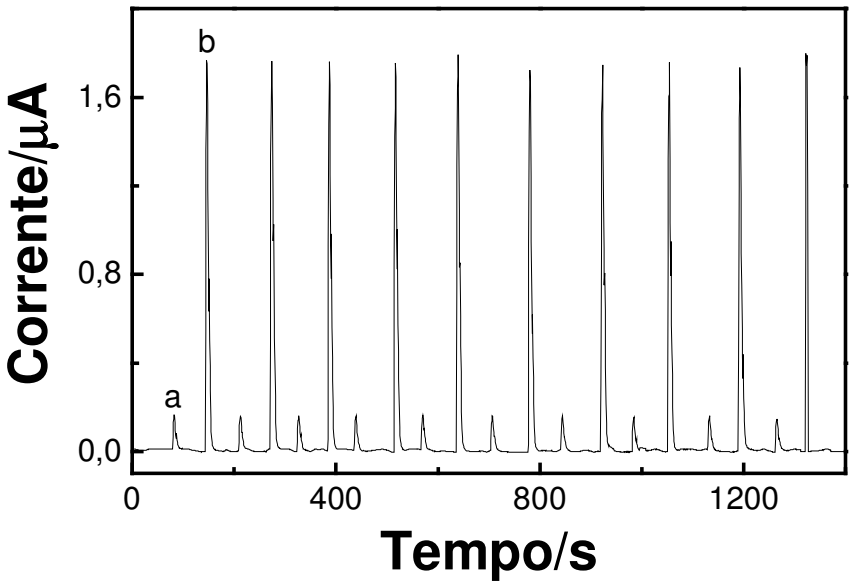


Figura 14 – Injeções alternadas de paracetamol (a) 5,0 x 10^{-6} e (b) 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0). Potencial de trabalho: +0,6 V (*vs.* Ag/AgCl), vazão: 2,0 mL min^{-1} e alça de amostragem: 150 µL.

O efeito de possíveis interferentes foi investigado pela adição de outros componentes em duas concentrações diferentes: 1,0 x 10^{-5} e 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Para este estudo, utilizou-se uma solução contendo paracetamol 1,0 x 10^{-5} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0). Cafeína, lactose, ácido cítrico, glicose e ácido ascórbico, componentes geralmente encontrados em formulações farmacêuticas, foram testados. Os quatro primeiros compostos causaram um aumento inferior a 5% na corrente de pico de oxidação do paracetamol, mesmo empregando uma concentração dez vezes superior a do analito. Porém, a presença de ácido ascórbico, na mesma concentração do paracetamol, foi suficiente para causar um aumento de 10% no sinal amperométrico do fármaco. Embora este composto não esteja presente nas amostras utilizadas neste estudo, o ácido ascórbico pode ser decomposto enzimaticamente através da ascorbato oxidase, e uma quantificação diferencial dos dois componentes pode ser realizada [230,231].

5.2.2.2. Determinação de Paracetamol em Amostras Farmacêuticas

O método desenvolvido para a análise rápida de paracetamol foi testado em comprimidos de cinco diferentes formulações farmacêuticas comerciais. A Figura 15 apresenta os sinais amperométricos referentes às soluções padrão do fármaco, com concentrações variando entre 1,0 e 8,0 x 10^{-5} mol L^{-1} (a-e), seguido das amostras reais (A_1-A_5) convenientemente diluídas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}. A proporcionalidade entre as correntes de oxidação e as concentrações dos padrões do analito é confirmada através da curva de calibração ilustrada no detalhe da Figura 15. Os resultados eletroquímicos obtidos com o novo sensor foram comparados com aqueles provenientes do método espectrofotométrico recomendado pela farmacopéia brasileira [182].

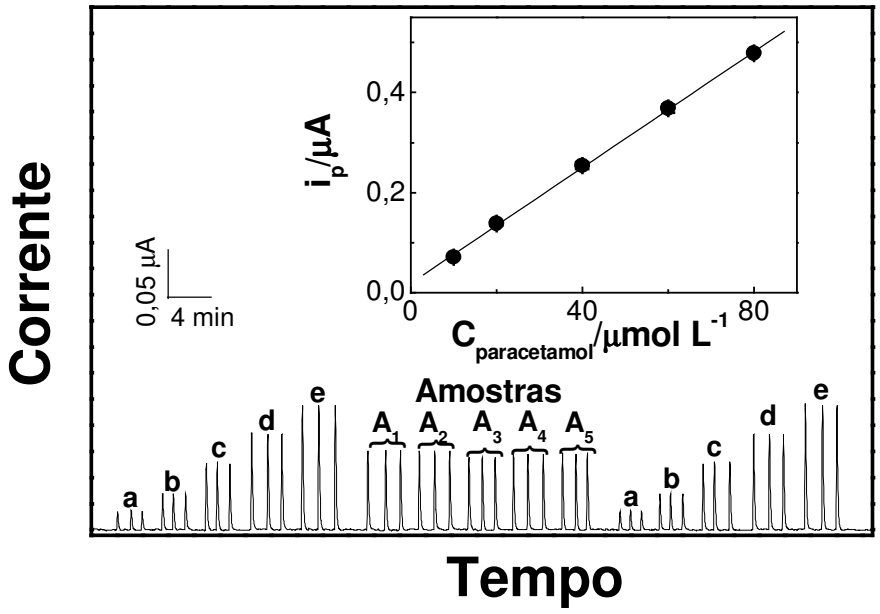


Figura 15 – Análises das amostras de paracetamol A_1 – A_5 em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0) usando eletrodo de filme de carbono. Detalhe: curva analítica após injeções consecutivas de soluções padrão de paracetamol (a) 1,0, (b) 2,0, (c) 4,0, (d) 6,0, (e) 8,0 x 10^{-5} mol L^{-1}. Potencial de trabalho: +0,6 V (*vs.* Ag/AgCl), vazão: 2,0 mL min^{-1}, alça de amostragem: 150 µL.

Os resultados das análises de todas as amostras farmacêuticas estão reunidos na Tabela 4. A composição de cada medicamento é especificada na segunda coluna. Os valores alcançados, através dos métodos amperométrico e espectrofotométrico [182], bem como aqueles encontrados nos rótulos dos produtos farmacêuticos estão bem próximos entre si. Além disso, os desvios padrões encontrados apresentam diferenças relativas satisfatórias.

Tabela 4 – Resultados obtidos para as análises de paracetamol em cinco formulações farmacêuticas através dos métodos amperométrico e espectrofotométrico na região do ultravioleta (254 nm) [182].

Amostra	Composição	Valor nominal (g)	Amperometria ± D.P.[a] (g)	Espectrofotometria ± D.P.[a] (g)	Δ[b] (%)	Δ[c] (%)	Δ[d] (%)
1	Paracetamol, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona,estearato de magnésio, dioctilsulfossucinato de sódio, carboximetilcelulose, macrogol, hidroxipropilmetilcelulose.	0,75	0,76 ± 0,01	0,78 ± 0,03	+1,3	+4,0	-2,6
2	Paracetamol, celulose microcristalina, estearato de magnésio, glicolato amido sódico, polividona.	0,75	0,74 ± 0,02	0,75 ± 0,03	-1,3	---	-1,3
3	Paracetamol, glicolato amido sódico, polividona, sorbato de potássio, ácido esteárico.	0,75	0,68 ± 0,02	0,70 ± 0,02	-9,3	-6,7	-2,8
4	Paracetamol, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona,estearato de magnésio, dioctilsulfossucinato de sódio.	0,50	0,47 ± 0,03	0,45 ± 0,01	-6,0	-10	+4,4
5	Paracetamol, cafeína, glicolato amido sódico, celulose, macrogol.	0,50	0,48 ± 0,03	0,46 ± 0,01	-4,0	-8,0	+4,3

(a) Média ± desvio padrão para 3 determinações; Diferença relativa entre: (b) valor nominal e o método amperométrico; (c) valor nominal e o método espectrofotométrico; (d) métodos amperométrico e espectrofotométrico.

5.2.3. Conclusões Parciais

O método amperométrico em fluxo proposto para a determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos é simples, sensível, rápido e de baixo custo. Os resultados obtidos foram satisfatórios e suficientemente confiáveis para que a associação do novo sensor amperométrico ao sistema em fluxo possa ser empregada como uma metodologia alternativa aos métodos oficiais recomendados pelas farmacopéias americana e brasileira [181,182].

Comparando os parâmetros analíticos alcançados com o método proposto com outros descritos na literatura, para diferentes técnicas eletroquímicas e/ou sensores, verifica-se que a faixa linear de concentração e o limite de detecção estimado apresentam valores comparáveis [190, 191,193] ou até mesmo melhores [192]. Um artigo científico descrevendo em detalhes o estudo por nós realizado, foi publicado no Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis [28].

5.3. Quantificação de Ambroxol em Formulações Farmacêuticas Utilizando Análises em Fluxo com Detecção Amperométrica

5.3.1. Voltametria Cíclica

O comportamento eletroquímico do ambroxol foi investigado utilizando o eletrodo de filme de carbono em solução de tampão fosfato no intervalo de pH 2,0 até 12. A Figura 16 apresenta os voltamogramas cíclicos de uma solução de ambroxol 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}.

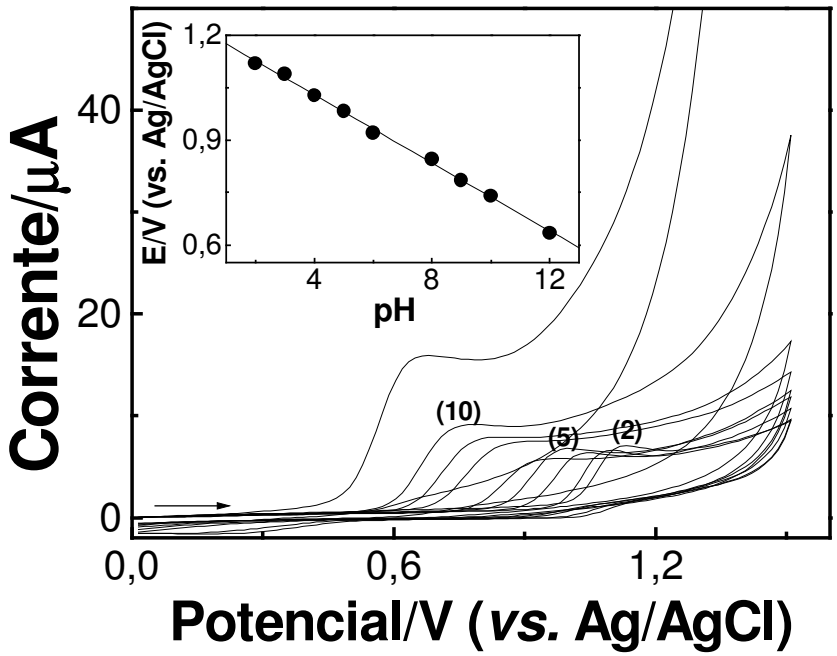


Figura 16 – Voltamogramas cíclicos de uma solução de ambroxol 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,0 – 12). Área do eletrodo de filme de carbono: 0,17 cm^2. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1}.

Em todas as condições de pH, a oxidação do fármaco mostra-se bastante irreversível, com uma onda de oxidação pronunciada, mas a de redução correspondente é particularmente desprezível no intervalo de potencial empregado

(0,0 – 1,3 V *vs.* Ag/AgCl). No detalhe da Figura 16, observa-se que o potencial anódico do ambroxol apresenta uma variação linear com o aumento de pH bem como se desloca para regiões menos positivas com um valor de inclinação negativo de 49 mV pH^{-1} (r = 0,998), indicando que o potencial de oxidação do fármaco é fortemente dependente do pH. Além disso, o coeficiente de transferência de elétrons αn (0,72 ± 0,09), calculado para diferentes valores de pH (2,0 – 12), está próximo daquele encontrado por Habib e Zayed [210], αn de 0,76 ± 0,04, para um processo catódico irreversível envolvendo a transferência de um elétron e um próton em solução tampão Britton-Robinson (BR).

O processo anódico irreversível do ambroxol também foi constatado por Demircigil e colaboradores [211] em um estudo utilizando solução tampão BR para diferentes valores de pH. Os autores ainda verificaram a presença de um segundo processo anódico, em potenciais mais positivos, que tornou-se menos nítido conforme o decréscimo do valor de pH. Eles propuseram um mecanismo para o processo de oxi-redução do analito baseado na formação de um dímero proveniente de cátions radicalares. Estes por sua vez, são oriundos da oxidação do grupo amino pertencente à molécula de ambroxol.

Um outro estudo voltamétrico foi realizado em solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 3,6 e 12) com adições crescentes do analito. Em meio alcalino, a oxidação do fármaco ocorre em regiões de potenciais menos positivos e com valores maiores de corrente. Porém, a repetibilidade do sinal voltamétrico é menor e a resposta para sucessivos voltamogramas cíclicos decresce rapidamente. Além disso, observa-se uma faixa linear de concentração mais estreita. Este comportamento foi verificado em diferentes soluções eletrolíticas (tampão ácido acético/acetato de sódio e ácidos sulfúrico e clorídrico). Dentre as soluções utilizadas, o ácido sulfúrico apresentou os melhores resultados voltamétricos. Para a escolha da melhor condição de pH, outros voltamogramas cíclicos foram obtidos com uma solução de ácido sulfúrico/sulfato de sódio.

A Figura 17 exibe os resultados obtidos com uma solução de ambroxol $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em eletrólito ácido sulfúrico/sulfato de sódio (0,1 mol L^{-1}, pH 1 – 4).

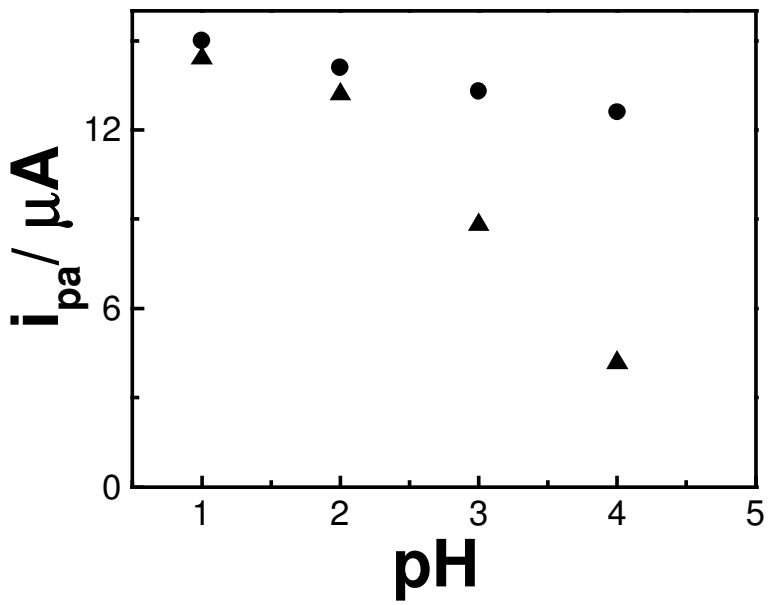


Figura 17 – Voltamogramas cíclicos em solução de ácido sulfúrico/sulfato de sódio (0,1 mol L^{-1}, pH 1-4) contendo ambroxol 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1}. Os símbolos representam: (•) 1° ciclo e (▲) 11° ciclo.

Um pequeno decréscimo na corrente de pico anódica, após 11 ciclos, é constatado somente em baixos valores de pH (pH 1,0). Conforme se pode observar ainda na Figura 17, com o aumento do pH da solução de ácido sulfúrico/sulfato de sódio ocorre uma diminuição considerável do sinal voltamétrico no 11° ciclo. Em valor de pH 4,0, por exemplo, verifica-se um decréscimo de 67% do valor inicial da corrente de oxidação do fármaco. A razão para esta diminuição de sinal não é óbvia. Provavelmente, neste meio menos ácido, o produto gerado durante a oxidação do ambroxol permaneça sobre o sensor, ocasionando um bloqueio de sua superfície. Em virtude dos resultados obtidos anteriormente, o ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1} foi eleito como eletrólito para os experimentos seguintes.

A Figura 18 mostra os voltamogramas cíclicos resultantes de adições crescentes de ambroxol em solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1} sobre o eletrodo de filme de carbono. O sinal obtido para cada concentração do analito foi muito

estável e reprodutível. No detalhe da Figura 18 verifica-se uma resposta linear para o intervalo de concentração compreendido entre 1,0 x 10^{-4} e 2,0 x 10^{-3} mol L^{-1}.

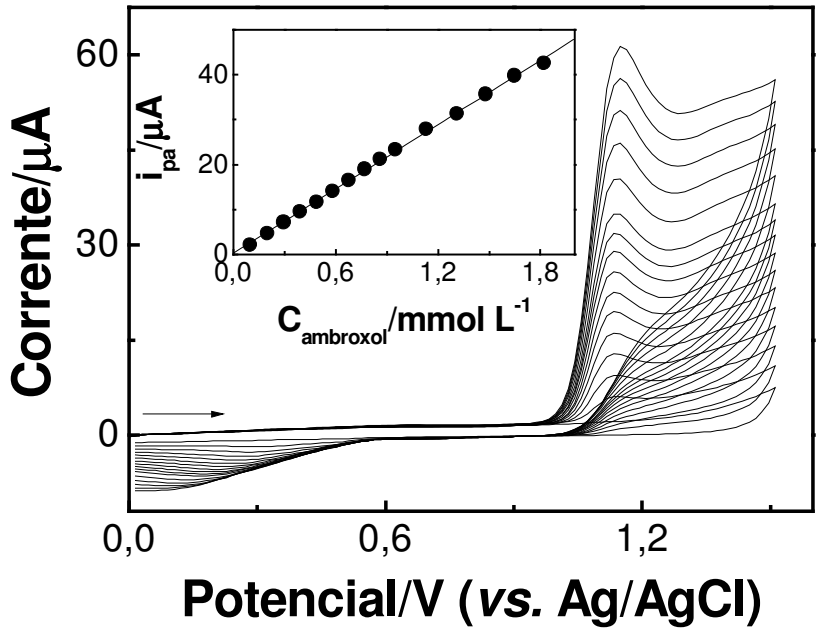


Figura 18 – Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de filme de carbono (A: 0,17 cm^2) em solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1} em diferentes concentrações de ambroxol (1,0 x 10^{-4} – 2,0 x 10^{-3} mol L^{-1}). Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1}. Parâmetros da regressão linear: inclinação de 23,87 ± 0,23 µA/mM e intercepto de 0,25 ± 0,23 µA.

A variação da corrente anódica com a velocidade de varredura (ν, de 0,01 até 0,9 V s^{-1}) foi investigada na mesma solução eletrolítica de ácido sulfúrico. Conforme o aumento da velocidade de varredura o potencial de pico desloca-se para valores mais positivos, confirmando a irreversibilidade do processo. As correntes anódicas (i_{pa}) variam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($\nu^{1/2}$), com um valor de inclinação de 0,38 µA $\nu^{-1/2}$ (r = 0,999), sugerindo um processo controlado pela difusão. Além disso, a variação logarítmica entre a corrente de oxidação e a velocidade de varredura apresenta um valor de inclinação de 0,47 µA ν^{-1} (r = 0,999), devido ao componente de difusão, próximo do valor teórico de 0,50, correspondendo a um processo difusional [232]. Os valores de inclinação aqui obtidos estão concordando com aqueles encontrados por Demircigil e colaboradores [211] de 0,37

(variação de i_{pa} com $\nu^{1/2}$) e de 0,46 (variação logarítmica de i_{pa} com ν), em solução tampão BR.

A oxidação eletroquímica do ambroxol também foi estudada utilizando outros dois diferentes materiais eletródicos em ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1}. Os resultados obtidos para os sensores de carbono vítreo, platina e o filme de carbono são ilustrados na Figura 19. Para efeito de comparação, são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos sob condições experimentais idênticas, na ausência (linhas tracejadas) e presença do analito (linhas sólidas).

Para o eletrodo de platina, não é possível verificar um pico anódico bem definido (curva C). Para os eletrodos de filme de carbono (curva A) e carbono vítreo (curva B), observa-se uma onda anódica durante a oxidação do ambroxol, com início em potenciais acima de +0,95 V (*vs.* Ag/AgCl). Além disso, para estes dois sistemas, verifica-se uma onda catódica menor correspondente à varredura reversa, no potencial em torno de +0,30 V (*vs.* Ag/AgCl). Porém, a magnitude da densidade de corrente anódica para o filme de carbono é maior do que para o eletrodo de carbono vítreo. Isto indica que o resistor de filme de carbono apresenta um desempenho eletroquímico mais favorável para a oxidação do fármaco.

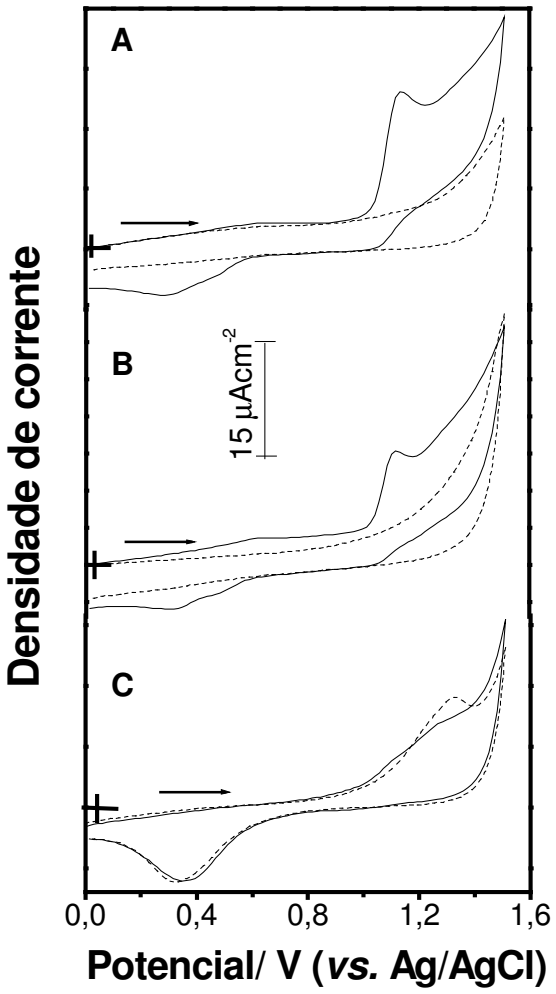


Figura 19 – Voltamogramas cíclicos para os eletrodos de filme de carbono (A), carbono vítreo (B) e platina (C) em solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1} na ausência (linha tracejada) e presença (linha sólida) ambroxol 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Áreas dos eletrodos: (A) 0,17, (B) 0,18 e (C) 0,07 cm^2. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1}.

5.3.2. Análises em Fluxo com Detecção Amperométrica

5.3.2.1. Curva Analítica, Estudos de Repetibilidade e Interferências

Para estabelecer as melhores condições de análise em fluxo na determinação amperométrica do ambroxol, a influência de parâmetros tais como vazão e alça de amostragem foram estudados, utilizando uma solução do fármaco 5,0 x 10^{-6} mol L^{-1} em eletrólito ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1}. Considerando os estudos anteriores de voltametria cíclica (Figura 18) e os experimentos hidrodinâmicos (variando o potencial entre 1,0 e 1,30 V), um potencial de trabalho

+1,15 V (*vs.* Ag/AgCl) foi selecionado para todos os experimentos em FIA envolvendo ambroxol.

O efeito da vazão (de 1,0 até 5,0 mL min^{-1}) na resposta amperométrica foi investigado, utilizando uma alça de amostragem de 100 μL. Houve um aumento na corrente anódica até uma vazão de 4,0 mL min^{-1}. Para valores maiores de vazão, a corrente de oxidação não apresentou variações consideráveis. Quando este parâmetro atingiu valores acima de 2,0 mL min^{-1}, a repetibilidade do sinal amperométrico diminuiu. Desvio padrão relativo de 1,0% foi obtido para 2,0 mL min^{-1} comparado a 2,5%, correspondendo a vazão de 3,0 mL min^{-1}. Considerando a melhor repetibilidade e uma freqüência analítica de 50 determinações por hora, a vazão de 2,0 mL min^{-1} foi eleita a mais favorável.

O volume da alça de amostragem foi avaliado em uma faixa de 50 até 300 μL. O sinal amperométrico aumentou quase linearmente com alças de 50 até 150 μL. Uma alça de 100 μL foi adotada por representar um compromisso entre a frequência e a sensibilidade analítica, utilizando menor volume de amostra.

Na Tabela 5, encontram-se resumidos os parâmetros estudados e selecinados para a análise por injeção em fluxo.

Tabela 5 – Parâmetros avaliados e condições de trabalho selecionadas.

Parâmetros avaliados e otimizados para analisar ambroxol no modo FIA		
Parâmetro	**Faixa estudada**	**Valor selecionado**
Potencial (V) *vs.* Ag/AgCl	1,0 – 1,3	1,15
Vazão (mL min^{-1})	1,0 – 5,0	2,0
Alça de amostragem (μL)	50 – 300	100

Utilizando as melhores condições FIA para a oxidação do ambroxol, uma série de experimentos em triplicata foi realizada empregando uma solução eletrolítica de ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1}. A linearidade entre a corrente de oxidação e a concentração de ambroxol foi constatada em um amplo intervalo ($5,0 \times 10^{-7}$ – $3,5 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}), conforme é mostrado na Figura 20. A faixa linear de concentração

apresentou uma inclinação de 18,76 ± 0,11 μA/mM e intercepto 0,025 ± 0,011 μA, com coeficiente de correlação de 0,999. O limite de detecção estimado foi 7,61 x 10^{-8} mol L^{-1} (três vezes o desvio do branco/inclinação) e o limite de quantificação calculado de 2,53 x 10^{-7} mol L^{-1}.

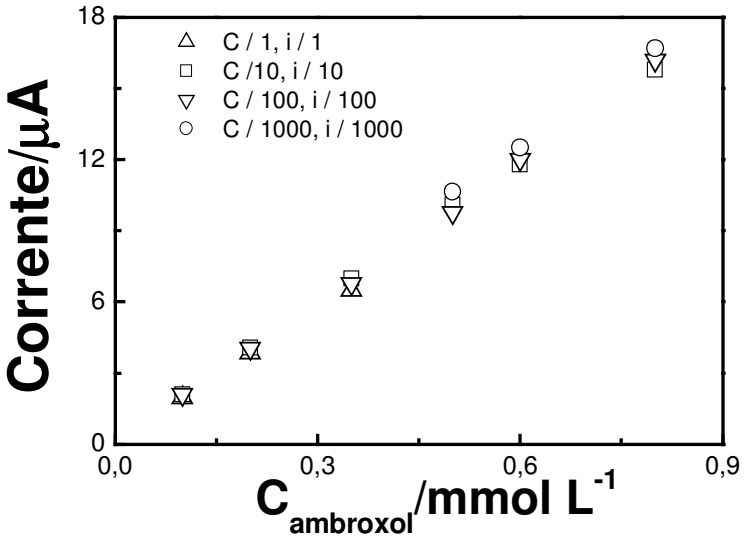


Figura 20 – Curvas de calibração construídas a partir das respostas amperométricas obtidas após injeções de soluções de ambroxol em solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1} para diferentes intervalos de concentração: (o) 5,0; 6,0 e 8,0 x 10^{-7}, (∇) 1,0; 2,0; 3,5; 5,0; 6,0 e 8,0 x 10^{-6}, ( ) 1,0; 2,0; 3,5; 5,0; 6,0 e 8,0 x 10^{-5}, (Δ) 1,0; 2,0 e 3,5 x 10^{-4} mol L^{-1}. Potencial de trabalho: +1,15 V (*vs.* Ag/AgCl), vazão: 2,0 mL min^{-1} e alça de amostragem: 100 μL.

A Figura 21 ratifica o fato de que mesmo em baixas concentrações, 5,0 x 10^{-7} até 5,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, os valores de corrente de oxidação do ambroxol mostram-se muito favoráveis (mesmo nestas baixas concentrações, a relação sinal/ruído continua elevada). Outro aspecto que chama atenção é a elevada estabilidade da linha base, condição não verificada quando sensores convencionais são utilizados.

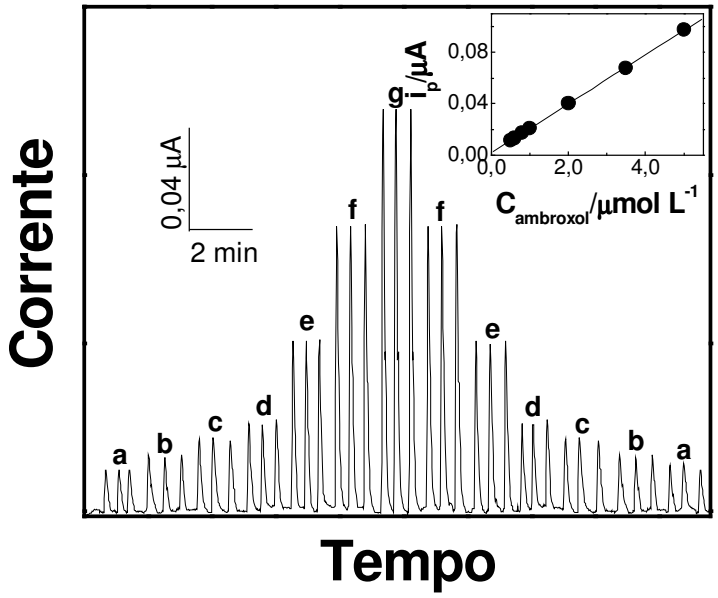


Figura 21 – Resultados FIA após injeções de soluções de ambroxol (a) 5,0, (b) 6,0, (c) 8,0 x 10^{-7}, (d) 1,0, (e) 2,0, (f) 3,5, (g) 5,0 x 10^{-6} mol L^{-1} em ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1}, utilizando eletrodo de filme de carbono. Alça de amostragem: 100 µL, vazão: 2,0 mL min^{-1} e potencial de trabalho: +1,15 V.

Os estudos de repetibilidade foram conduzidos empregando soluções de ambroxol 6,0 x 10^{-6} (a) e 6,0 x 10^{-5} mol L^{-1} (b) em ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1}. A Figura 22 apresenta o resultado de uma série de 40 injeções alternadas destas soluções. Para a série de concentrações utilizadas, os desvios padrões relativos foram de 3,0 e 1,5% respectivamente. Estes resultados mostram que não há efeito de memória entre as sucessivas injeções bem como ressalta mais uma vez o bom desempenho do eletrodo de filme de carbono durante os experimentos em fluxo.

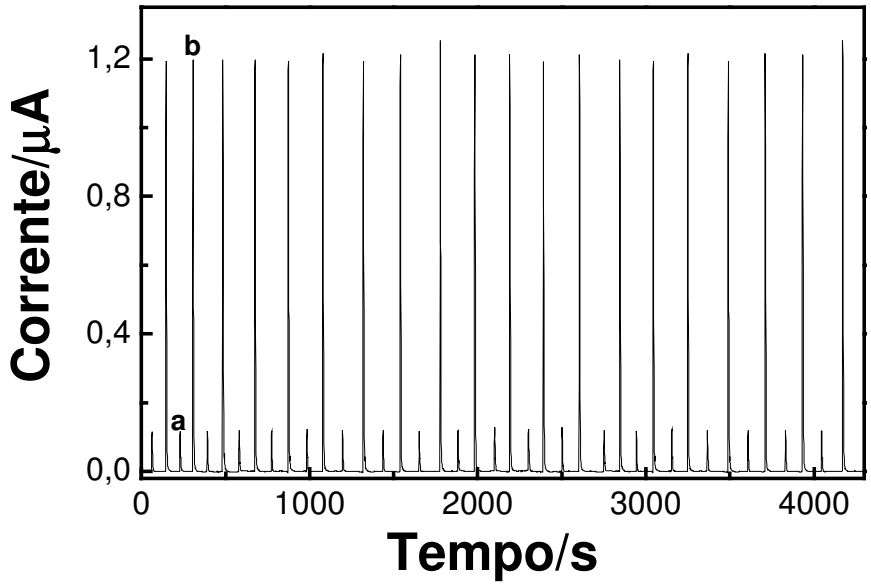


Figura 22 – Sinais registrados para injeções alternadas de ambroxol (a) 6,0 x 10^{-6} e (b) 6,0 x 10^{-5} mol L^{-1} em ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1} sobre a superfície do filme de carbono. Potencial de trabalho: +1,15 V, alça de amostragem: 100 µL e vazão: 2,0 mL min^{-1}.

Para estimar o efeito de potenciais interferentes presentes em amostras farmacêuticas, a composição de cada amostra de xarope foi avaliada (Tabela 5). Dentre eles, os ácidos benzóico e cítrico foram, inicialmente, selecinados para este estudo. Para avaliar seus efeitos, utilizou-se uma solução de ambroxol 1,0 x 10^{-5} mol L^{-1} em eletrólito suporte de ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1}. Não se verifica mudança no sinal amperométrico quando ácido benzóico 1,0 x 10^{-5} mol L^{-1} é adicionado à solução de ambroxol (razão 1:1). Em um outro experimento, com uma solução do excipiente correspondente a 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} (dez vezes mais concentrada em relação a do fármaco), observa-se um aumento de apenas 2% na resposta amperométrica. A mesma estratégia foi empregada para o ácido cítrico. A primeira adição deste excipiente à solução de ambroxol (razão 1:1) não provoca alteração considerável no sinal de corrente. Porém, quando uma solução de ácido cítrico 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} é adicionada, observa-se um aumento de ~7% no sinal anódico. Testes adicionais foram realizados com outros constituintes das amostras de xarope e nenhuma mudança considerável na resposta foi constatada.

5.3.2.2. Determinação de Ambroxol em Amostras Farmacêuticas

Para avaliar a aplicabilidade do sensor de filme de carbono, quatro diferentes produtos farmacêuticos comerciais contendo ambroxol e outras substâncias, foram analisados. A Figura 23 apresenta os resultados de FIA obtidos para as amostras de xaropes (A_1-A_4) e para injeções de soluções padrão em diferentes concentrações, variando de 6,0 x 10^{-6} até 3,0 x 10^{-5} mol L^{-1} (a-e). A proporcionalidade entre a corrente anódica e a concentração dos padrões pode ser confirmada observando a curva de calibração ilustrada no detalhe da Figura 23. Esta curva foi utilizada para a quantificação do fármaco nas amostras comerciais de xarope. Para efeito de comparação, as concentrações de ambroxol também foram determinadas mediante análises espectrofotométrica [210,211] e titulométrica [219]. A titulação potenciométrica é a metodologia recomendada pela farmacopéia britânica para a quantificação de ambroxol assim como a espectrofotometria foi adotada também devido à sua simplicidade e rapidez.

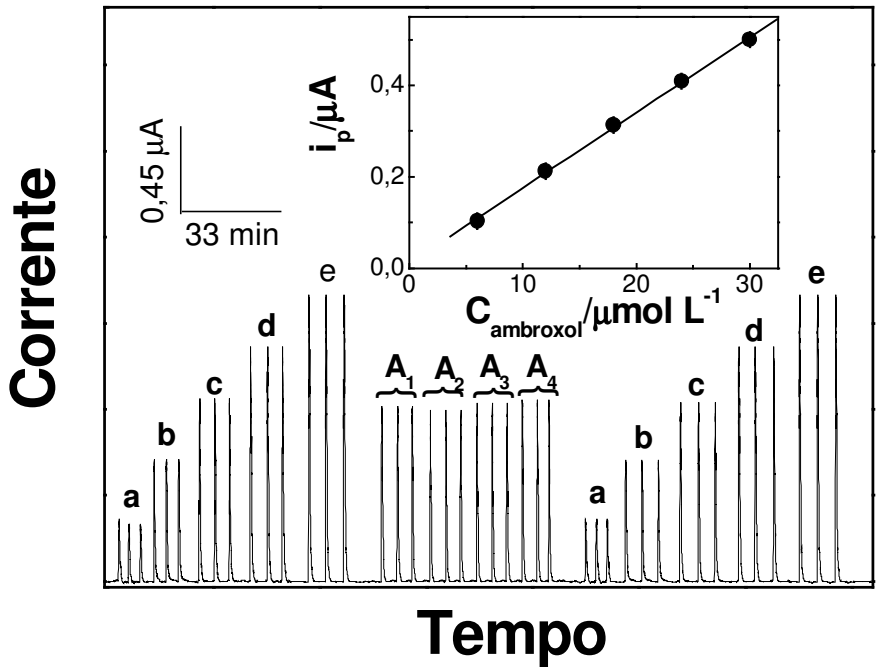


Figura 23 – Resultados de FIA para a análise de ambroxol em quatro diferentes amostras de xarope em ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1}, utilizando eletrodo de filme de carbono. Detalhe: curva analítica construída para soluções padrão de ambroxol (a) 6,0 x 10^{-6}, (b) 1,2, (c) 1,8, (d) 2,4, (e) 3,0 x 10^{-5} mol L^{-1}. Potencial de trabalho: +1,15 V, alça de amostragem: 100 µL e vazão: 2,0 mL min^{-1}.

Os resultados das análises de todos os produtos farmacêuticos estão sumarizados na Tabela 6, sendo possível comparar os valores obtidos utilizando os métodos amperométrico, titulométrico [219] e o espectrofotométrico [210,211]. Nesta tabela constam os desvios padrões relativos para cada amostra, calculados a partir de três medidas independentes, bem como a composição de cada produto (segunda coluna).

As diferenças relativas entre as médias dos valores obtidos variaram entre -0,7 e +4,7, calculadas através da comparação das três metodologias empregadas neste estudo. A concordância dos resultados alcançados entre o método proposto e os demais foi satisfatória. Estes resultados também são coerentes com as concentrações do analito especificadas pelos fabricantes dos medicamentos (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados experimentais obtidos por FIA, titulação potenciométrica [219] e espectrofotometria (307,5 nm) [210,211], após análises de ambroxol em diferentes produtos farmacêuticos comerciais.

Amostra	Composição	Valor nominal (mg/5 mL)	Amperometria ± D.P.[a]	Titulação ± D.P.[a]	Espectrofotometria ± D.P.[a]
1	Ambroxol, sorbitol, ácido cítrico, metilparabeno, propilparabeno, glicerol.	30	30,1 ± 0,3	29,7 ± 0,4	29,8 ± 0,3
2	Ambroxol, sorbitol, glicerol, ácido benzóico, mentol, sacarina, propileno glicol.	30	30,6 ± 0,2	31,4 ± 0,8	30,4 ± 0,4
3	Ambroxol, glicerol, sorbitol, mentol, ácido benzóico, aroma, propileno glicol, ácido tartárico.	15	15,3 ± 0, 2	15,5 ± 0,4	14,8 ± 0,3
4	Ambroxol, ácido cítrico, aroma, metilparabeno, sorbitol, propilparabeno, glicerol.	15	15,5 ± 0,3	15,2 ± 0,2	15,1 ± 0,2

[a]Média ± desvio padrão para 3 determinações.

5.3.3. Conclusões Parciais

Os resultados obtidos neste estudo mostraram pela primeira vez a potencialidade das análises em fluxo em associação com a detecção amperométrica para a quantificação rápida e sensível de ambroxol em formulações farmacêuticas. A célula eletroquímica confeccionada no próprio laboratório proporcionou sinais amperométricos estáveis e reprodutíveis assim como foi possível obter uma faixa de

concentração linear de 5,0 x 10^{-7} até 3,5 x 10^{-4} mol L^{-1} em meio ácido. Utilizando o novo sensor de filme de carbono, uma alta sensibilidade (0,11 A mol^{-1} L cm^{-2}) foi obtida durante os experimentos voltamétricos. Este estudo foi publicado no periódico Talanta na forma de artigo científico [29].

6. CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento do presente trabalho de pesquisa foram realizados estudos envolvendo a utilização do eletrodo de filme de carbono, construído a partir de resistores, visando aplicações analíticas. A potencialidade deste sensor foi apresentada através do desenvolvimento de métodos voltamétricos para a quantificação de substâncias orgânicas (paraquat, paracetamol e ambroxol) em amostras ambientais e farmacêuticas.

O eletrodo de filme de carbono associado à voltametria de onda quadrada mostrou desempenho favorável para a determinação de paraquat em baixas concentrações. O limite de detecção de 2,5 x 10^{-8} mol L^{-1} e limite de quantificação de 8,3 x 10^{-8} mol L^{-1} são adequados quando comparados ao valor estipulado pela agência de proteção ambiental americana (US-EPA) de 5,35 x 10^{-7} mol L^{-1} ou 100 μg L^{-1}. Além disso, este sensor apresentou perfis voltamétricos, em eletrólito nitrato de potássio, perfeitamente comparáveis com aqueles descritos na literatura para diferentes materiais de eletrodos (duas ondas de redução e duas ondas anódicas correspondentes). Um estudo da variação da corrente com as velocidades de varredura (10 – 900 mV s^{-1}) mostrou que o processo de redução é praticamente independente da velocidade de varredura, sendo que para baixas velocidades este processo torna-se menos reversível.

A associação do sensor de filme de carbono à detecção amperométrica em fluxo possibilitou a realização de análises de forma simples e rápida para a quantificação de paracetamol em formulações farmacêuticas. Uma ampla faixa linear de concentração (8,0 x 10^{-7} – 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1}) e sensibilidade elevada (0,143 A mol^{-1} L cm^{-2}) foram alcançadas utilizando este transdutor sem a necessidade de modificação química de sua superfície. Um estudo de repetibilidade (D.P.R. de 3,1 e 1,3% para 20 injeções consecutivas de soluções do analito 5,0 x 10^{-6} e 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}, respectivamente) mostrou não haver efeito de memória entre as injeções realizadas.

Durante as determinações de paracetamol nas cinco amostras de medicamento, verificou-se que os resultados foram concordantes com aqueles obtidos pelo método espectrofotométrico, com diferenças relativas variando entre -1,3 e +4,4%. Nenhuma etapa de pré-tratamento das amostras foi necessária e sua aplicação pode ser diretamente estendida a formulações farmacêuticas mais complexas. Durante um estudo preliminar de pH (2 – 12) em solução tampão fosfato,

obteve-se um valor de inclinação de -42 mV pH^{-1}, valor este próximo daquele mencionado na literatura, indicando um processo de oxidação mais complexo.

A determinação eletroquímica de ambroxol em produtos farmacêuticos mostrou ser mais apropriada utilizando eletrodo de filme de carbono em comparação a outros materiais covencionais (carbono vítreo e platina). A oxidação do fármaco apresentou resultados melhores em meio ácido assim como foi possível observar um único pico anódico, correspondendo a um processo irreversível, em potencial ~ 1,1 V (vs. Ag/AgCl). Verificou-se um valor de inclinação de 0,47 $\mu A\ \nu^{-1}$ (r = 0,999) para o estudo da variação logarítmica da corrente anódica com a velocidade de varredura, sugerindo um processo controlado pela difusão.

A potencialidade do sensor proposto foi melhor evidenciada durante os experimentos em FIA. Um limite de detecção de 7,6 x 10^{-8} mol L^{-1} e uma frequêcia analítica de 50 determinações por hora foram obtidos durante as análises amperométricas de ambroxol. Os resultados obtidos para as amostras comerciais de xarope empregando este sistema, quando comparados aos procedimentos titulométricos, apresentaram diferenças relativas variando de -2,5 a +2,0%. Estes valores mostraram-se satisfatórios e suficientemente confiáveis para que a metodologia proposta possa ser empregada como alternativa ao método da farmacopéia britânica existente.

Adicionalmente, o tempo gasto na determinação de ambroxol pelo método proposto, mesmo levando em conta a elaboração da curva analítica e a realização de medidas em triplicata, é menor que o tempo necessário para efetuar apenas uma única titulação potenciométrica, com a vantagem de evitar o risco de maiores contaminações. O método além de ser simples, sensível e rápido dispensa pré-tratamento das amostras tais como filtração, extração ou derivatização.

De modo geral, os eletrodos de filme de carbono são caracterizados por uma grande versatilidade, boa repetibilidade e baixo custo. A facilidade de preparação destes sensores possibilita o seu emprego até como eletrodos descartáveis, podendo ser interessante em aplicações na área de controle de qualidade. Estes sensores apresentam uma maior faixa de potencial (para ambos os limites anódico e catódico) em comparação a outras formas de eletrodo de carbono, quando tratados eletroquimicamente em meio ácido. A Tabela 7 exibe um resumo de algumas características de cada sistema estudado. Vantagens como ampla faixa linear de concentração e baixo limite de detecção podem ser confirmados pela associação do

novo sensor com as técnicas de voltametria de onda quadrada e FIA com detecção amperométrica.

Tabela 7 – Características gerais para os sistemas eletroquímicos estudados.

Sistema	**Intervalo linear de concentração (mol L^{-1})**	**Limite de detecção (mol L^{-1})**	**Potencial de trabalho (*vs.* Ag/AgCl)**
Paraquat/KNO_3 0,1 mol L^{-1}/voltametria de onda quadrada	$8,6 \times 10^{-8} – 1,9 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-8}$	-0,68
Paracetamol/tampão fosfato (pH 8,0) 0,1 mol L^{-1}/FIA-amperometria	$8,0 \times 10^{-7} – 5,0 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-7}$	+0,60
Ambroxol/H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}/FIA-amperometria	$5,0 \times 10^{-7} – 3,5 \times 10^{-4}$	$7,6 \times 10^{-8}$	+1,15

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estudos desenvolvidos com o eletrodo de filme de carbono, construídos a partir de resistores, apresentaram uma forma de carbono relativamente nova para aplicações analíticas. Além disso, a presente tese mostrou algumas possibilidades da utilização deste material como eletrodo de trabalho na determinação de compostos orgânicos nas áreas ambiental e farmacêutica. Desta forma, novas pesquisas com o sensor proposto deverão ainda ser realizadas. A seguir, são registradas algumas potenciais vertentes:

✓ Modificação da superfície do eletrodo, por exemplo, com filmes poliméricos, catalíticos ou metais eletrodepositados, para aumentar a seletividade ou ampliar a gama de analitos. Desta forma, pode-se obter condições que favoreçam a pré-concentração de paraquat e minimizem possíveis interferentes.

✓ Determinação de paraquat em amostras ambientais ou alimentícias utilizando análise por injeção (FIA ou BIA). Desta maneira, a sensibilidade e a freqüência analítica do método ainda podem ser melhoradas. Este sensor pode ser empregado na quantificação de outros pesticidas de interesse ambiental.

✓ Construção de biossensores amperométricos a partir de tecidos vegetais, tendo os resistores como materiais de substrato, para a quantificação de fármacos em formulações farmacêuticas. Na literatura, os sensores de filme de carbono foram apenas modificados biologicamente com enzimas isoladas para a determinação de diferentes analitos em amostras alimentícias.

✓ Associação das técnicas de voltametria de onda quadrada ou detecção amperométrica com o modo BIA para a quantificação de diferentes analitos. Desta forma, pode-se obter valores melhores quanto ao limite de detecção, faixa linear de concentração e repetibilidade de sinal.

✓ Aperfeiçoamento da construção e aplicação de microeletrodos de filme de carbono. Ao longo desta tese foram efetuados estudos preliminares (não descritos) os quais não foram conclusivos. O tema poderá ser retomado no futuro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Stradiotto, N.R.; Yamanaka, H.; Zanoni, M.V.B., Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14, (2), 159-173.

[2] Filipe, O.M.S.; Brett, C.M.A., Characterization of carbon film electrodes for electroanalysis by electrochemical impedance. *Eletroanalysis* **2004**, 16, (12), 994-1001.

[3] Reisberg, S.; Dang, L.A.; Nguyen, Q.A.; Piro, B.; Noel, V.; Nielsen, P.E.; Le, L.A.; Pham, M.C., Label-free DNA electrochemical sensor based on a PNA-functionalized conductive polymer. *Talanta* **2008,** 76, (1), 206-210.

[4] Prabakar, S.J.R.; Narayanan, S.S., Amperometric determination of hydrazine using a surface modified nickel hexacyanoferrate graphite electrode fabricated following a new approach. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, 617, (2), 111-120.

[5] ShangGuan, X.D.; Zhang, H.F.; Zheng, J.B., Electrochemical behavior and differential pulse voltammetric determination of paracetamol at a carbon ionic liquid electrode. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, (3), 1049-1055.

[6] Richter, E.M.; Munoz, R.A.A.; Bertotti, M.; Angnes, L., Heat-transference of toner masks onto conductive substrates: A rapid and easy way to produce microelectrode ensembles. *Electrochem. Commun.* **2007**, 9, (5), 1091-1096.

[7] Lowinsohn, D.; Richter, E.M.; Angnes, L.; Bertotti, M., Disposable gold electrodes with reproducible area using recordable CDs and toner masks. *Electroanalysis* **2006**, 18, (1), 89-94.

[8] Angnes, L.; Richter, E.M.; Augelli, M.A.; Kume, G.H., Gold electrodes from recordable CDs. *Anal. Chem.* **2000**, 72, (21) 5503-5506.

[9] Wilson, G.S.; Gifford, R., Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20, (12), 2388-2403.

[10] Lojou, E.; Bianco, P., Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *J. Electroceram.* **2006**, 616, (1), 79-91.

[11] Tudorache, M.; Bala, C., Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, (3), 565-578.

[12] Dominguez Renedo, O.; Alonso-Lomillo, M.A.; Arcos Martinez, M.J., Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta* **2007**, 73, (2), 202-219.

[13] Williams, G.; D'Silva, C., Field-based heavy metal analyser for the simultaneous determination of multiple cations on-site. *Analyst* **1994**, 119, (11), 2337-2341.

[14] Herdan, J.; Feeney, R.; Kounaves, S.P.; Flannery, A.F.; Storment, C.W.; Kovacs, G.T.A.; Darling, R.B., Field evaluation of an electrochemical probe for in situ screening of heavy metals in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, (1), 131-136.

[15] Matos, R.C.; Augelli, M.A.; Lago, C.L.; Angnes, L., Flow injection analysis-amperometric of ascorbic and uric acids using arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 404, (1), 151-157.

[16] Felix, F.S.; de Barros, R.C.M.; Ferreira, N.G.; Lichtig, J.; Masini, J.C., Determinação de manganês em material particulado atmosférico de ambientes de trabalho utilizando eletrodo de diamante dopado com boro e voltametria de onda quadrada com redissolução catódica. *Quim. Nova* **2005**, 28, (6), 1000-1005.

[17] Brett, C.M.A.; Angnes, L.; Liess, H.D., Carbon film resistors as electrodes: Voltammetric properties and application in electroanalysis. *Electroanalysis* **2001**, 13, (8-9), 765-769.

[18] Ruzicka, J.; Hansen, E.H., Flow Injection Analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta* **1975**, 78, (1), 145-157.

[19] Stewart, K.K., Flow-Injection Analysis: A review of its early history. *Talanta* **1981**, 28, (11), 789-797.

[20] Brajanoski, G.; Hoogmartens, J.; Alleggaert, K.; Adams, E., Determination of amikacin in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* **2008**, 867, (1), 149-152.

[21] de Silva, J.A.F., Detecção Eletroquímica em eletroforese capliar. *Quim. Nova* **2003**, 26, (1), 56-64.

[22] Trojanowicz, M., *Flow Injection Analysis: Instrumentation and Applications*, World Scientific, London, 2000.

[23] Calatayud, J.M., *Flow Injection Analysis of Pharmaceutical: Automation in the Laboratory*, Taylor & Francis, London, 1996.

[24] Quintino, M.S.M.; Araki, K.; Toma, H.E.; Angnes, L., New hydrazine sensors based on electropolymerized *meso*-tetra (4-sulphonatephenyl) porphyrinate manganese (III)/silver nanomaterial. *Talanta* **2008**, 74, (4), 730-735.

[25] Kozan, J.V.B.; Silva, R.P.; Serrano, S.H.P.; Lima, A.W.O., Angnes, L., Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing *peroxidases* naturally immobilized on coconut (*Cocus nucifera* L.) fibers. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 591, (2), 200-207.

[26] Richter, E.M.; de Jesus, D.P.; Neves, C.A.; do Lago, C.L.; Angnes, L., Aplicações eletroanalíticas com eletrodos de prata confeccionados a partir de CDs graváveis. *Quim. Nova* **2003**, 26, (6), 839-843.

[27] Munoz, R.A.A.; Matos, R.C.; Angnes, L., Gold electrodes from compact discs modified with platinum for amperometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical formulations. *Talanta* **2001**, 55, (4), 855-860.

[28] Felix, F.S.; Brett, C.M.A.; Angnes, L., Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 43, (5), 1622-1627.

[29] Felix, F.S.; Brett, C.M.A.; Angnes, L., Flow injection analysis using carbn film resistor electrodes for amperometric determination of ambroxol. *Talanta* **2008**, 76, (1), 128-133.

[30] Quintino, M.S.M.; Angnes, L., Bia-amperometric quantification of salbutamol in pharmaceutical products. *Talanta* **2004**, 62, (2), 231-236.

[31] de Souza, D.; Machado, S.A.S.; Avaca, L.A., Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Quim. Nova* **2003**, 26, (1), 81-89.

[32] Barek, J.; Fogg, A.G.; Muck, A.; Zima, J., Polarography and voltammetry at mercury electrodes. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, 31, (4), 291-309.

[33] de Souza, D.; Codognoto, L.; Malagutti, A.R.; Toledo, R.A.; Pedrosa, V.A.; Oliveira, R.T.S.; Mazo, L.H.; Avaca, L.A.; Machado, S.A.S., Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: Aplicações. *Quim. Nova* **2004**, 27, (5), 790-797.

[34] Ozkan, S.A.; Uslu, B.; Aboul-Enein, H.Y., Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2003**, 33, (3), 155-181.

[35] Felix, F.S.; Maciel, J.M.; Brett, C.M.A.; Angnes, L., Estudos eletroquímicos de paraquat utilizando eletrodos de filme de carbono. Aplicação à análise de águas. *Tecno-Lógica, Santa Cruz do Sul* **2006**, 10, (2), 9-13.

[36] Guiberteau, A.; Duran-Meras, I.; Galeano, T.; Laranjinho, T.J.F.; Mora, N.M.; Suarez, M.F.; Salinas, F., Voltammetric study of the hydrolysis product of bendiocarb at the glassy carbon electrode. *Mikrochim. Acta* **2001**, 137, (3-4), 135-140.

[37] Manisankar, P.; Viswanathan, S.; Pusphalatha, A.M.; Rani, C., Electrochemical studies and square wave stripping voltammetry of five common pesticides on poly 3,4-ethylenedioxythiophene modified wall-jet electrode. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 528, (2), 157-163.

[38] Lopes, I.C.; de Souza, D.; Machado, S.A.S.; Tanaka, A.A., Voltammetric detection of paraquat pesticide on a phthalocyanine-based pyrolitic graphite electrode. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, (8), 1907-1914.

[39] Du D.; Wang, M.H.; Zhang, J.M.; Cai, H.; Tu, H.Y.; Zhang, A.D., Application of multiwalled carbon nanotubes for solid-phase extraction of organophosphate pesticide. *Electrochem. Commun.* **2008**, 10, (1), 85-89.

[40] de Oliveira, U.M.F.; Lichtig, J.; Masini, J.C., Evaluation of a Nafion coated glassy carbon electrode for determination of paraquat by differential pulse voltammetry. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, 15, (5), 735-741.

[41] Navaratne, A.; Susantha, N., An Electroanalytical sensor for the detection of gramaxone (paraquat). *Anal. Lett.* **2000**, 33, (8), 1491-1499.

[42] Zen, J.M.; Jeng, S.H.; Chen, H.J., Determination of paraquat by square-wave voltammetry at a perfluorosulfonated ionomer/clay-modified electrode. *Anal. Chem.* **1996**, 68, (3), 498-502.

[43] Alvarez, E.; Sevilla, M.T.; Pinilla, J.M.; Hernandez, L., Cathodic stripping voltammetry of paraquat on a carbon paste electrode modified with Amberlite XAD-2 resin. *Anal. Chim. Acta* **1992**, 260, (1), 19-23.

[44] http://www.epa.gov/nerlcwww/m_549_2.pdf, Determination of diquat and paraquat in drinking water by liquid-solid extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, June 1997, acesso em 17/07/08.

[45] Paixão, P.; Costa, P.; Bugalho, T.; Fidalgo, C.; Pereira, L.M., Simple method for determination of paraquat in plasma and serum of human patientsby high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **2002**, 775, (1), 109-113.

[46] Castro, R.; Moyano, E.; Galceran, M.T., Determination of quaternary ammonium pesticides by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2001**, 914, (1-2), 111-121.

[47] Lee, H.S.; Kim, K.; Kim, J.H.; Do, K.S.; Lee, S.K., On-line sample preparation of paraquat in human serum samples using high-performance liquid chromatography with column switching. *J. Chromatogr. B* **1998**, 716, (1-2), 371-374.

[48] Lima, A.W.O.; Nascimento, V.B.; Pedrotti, J.J.; Angnes, L., Coconut-based plant tissue reactor for biosensing of catechol in flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta* **1997**, 354, (1-3), 325-331.

[49] Lima, A.W.O.; Vidsiunas, E.K.; Nascimento, V.B.; Angnes, L., Vegetable tissue from *Iatania* sp.: an extraordinary source of naturally immobilized enzymes for the detection of phenolic compounds. *Analyst* **1998**, 123, (11), 2377-2382.

[50] Lima, A.W.O.; Bora, P.S.; Richter, E.M.; Angnes, L., Application of a new continuous flow spectrophotometric method for the characterization of polyphenol oxidase naturally immobilized on coconut fiber. *J. Food Biochem.* **2003**, 27, (3), 237-254.

[51] Richter, E.M.; de Jesus, D.P.; Munoz, R.A.A.; do Lago, C.L.; Angnes, L., Determination of anions, cátions, and sugars in coconut water by capillary. Electrophoresis. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, (6A), 1134-1139.

[52] Munoz, R.A.A.; Richter, E.M.; de Jesus, D.P.; do Lago, C.L., L. Angnes, Determination of inorganic ions in ethanol fuel by capillary electrophoresis. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, 15, (4), 523-526.

[53] Richter, E.M.; Fornaro A.; do Lago, C.L.; Angnes, L., Avaliação da composição química de águas do sistema Guarapiranga: estudo de caso nos anos de 2002 e 2003. *Quim. Nova* **2007**, 30, (5), 1147-1152.

[54] Nogueira, T.; do Lago, C.L., Determination of caffeine in coffee products by dynamic complexation with 3,4-dimethoxycinnamate and separation by CZE. *Electrophoresis* **2007**, 28, (19), 3570-3574.

[55] Dollimore, D.; Lerdkanchanaporn, S., Thermal Analysis. *Anal. Chem.* **1998**, 70, (12), 27R-35R.

[56] Zhou, T.S; Hu, Q.; Yu, H.; Fang, Y.Z., Separation and determination of β-agonists in serum by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 441, (1), 23-28.

[57] Ensafi, A.A.; Hajian, R., Determination of rutin in pharmaceutical compounds and tea using cathodic adsorptive stripping voltammetry. *Electroanalysis* **2006**, 18, (6), 579-585.

[58] Temerk, Y.M.; Ibrahim, H.S.M.; Schuhmann, W., Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of the antitumor drug rutin in pharmaceutical, human urine, and blood serum. *Microchim. Acta* **2006**, 153, (1-2), 7-13.

[59] dos Santos, L.B.O.; Abate, G.; Masini, J.C., Determination of atrazine using square wave voltammetry with the hanging mercury drop electrode (HMDE). *Talanta* **2004**, 62, (4), 667-674.

[60] Felix, F.S.; Lichtig, J.; dos Santos, L.B.O.; Masini, J.C., Determination of Cd, Pb and Ni by square wave stripping voltammetry in particulate matter collected in workplace atmosphere of some brazilian industrial foundries. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, (4), 801-807.

[61] Gao, Z.N.; Han, X.X.; Yao, H.Q.; Liang, B.; Liu, W.Y., Electrochemical oxidation of isoniazid catalyzed by (FcM)TMA at the platinum electrode and its practical analytical application. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 385, (7), 1324-1329.

[62] Ziyatdinova, G.K.; Budnikov, G.K.; Pogorel'tsev, V.I., Determination of captopril in pharmaceutical forms by stripping voltammetry. *J. Anal. Chem.* **2006**, 61, (8), 798-800.

[63] Wang, X.X.; Yang, N.J.; Wan, Q.J., Cyclic voltammetry response of nicotinic acid and nicotinamide on a polycrystalline gold electrode. *Electrochim. Acta* **2006**, 52, (1), 361-368.

[64] Viswanathan, S.; Liao, W.C.; Huang, C.C.; Hsu, W.L.; Ho, J.A.A., Rapid analysis of L-dopa in urine samples using gold nanoelectrode ensembles. *Talanta* **2007**, 74, (2), 229.

[65] Hajjizadeh, M.; Jabbari, A.; Heli, H.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Shafiee, A.; Karimian, K., Electrocatalytic oxidation and determination of deferasirox and deferiprone on a nickel oxyhydroxide-modified electrode. *Anal. Biochem.* **2008**, 373, (2), 337-348.

[66] Hajjizadeh, M.; Jabbari, A.; Heli, H.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Haghgoo, S., Electrocatalytic oxidation of some anti-inflammatory drugs on a nickel hydroxide-modified nickel electrode. *Electrochim. Acta* **2007**, 53, (4), 1766-1774.

[67] Manea, F.; Radovan, C.; Schoonman, J., Amperometric determination of thiourea in alkaline media on a copper oxide-copper electrode. *J. Appl. Electrochem.* **2006**, 36, (10), 1075-1081.

[68] Kuban, P.; Houserova, P.; Kuban, P.; Hauser, P.C.; Kuban, V., Sensitive capillary electrophoretic determination of mercury species with amperometric detection at a copper electrode after cation exchange preconcentration. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, (7), 1070-1076.

[69] Bas, B.; Jakubowska, M., The renovated silver ring electrode in determination of lead traces by differential pulse anodic stripping voltammetric. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 615, (1), 39-46.

[70] Matsuura, H.; Sato, Y.; Sawaguchi, T.; Mizutani, F., Rapid and highly-sensitive determination of acetylcholinesterase activity based on the potential-dependent adsorption of thiocholine on silver electrodes. *Sens. Actuators B* **2003**, 91, (1-3), 148-151.

[71] Hsu, C.L.; Chang, K.S.; Kuo, J.C., Determination of hydrogen peroxide residues in aseptically packaged beverages using an amperometric sensor based on a palladium electrode. *Food Control* **2008**, 19, (3), 223-230.

[72] Hidayat, A., Hibbert, D.B.; Alexander, P.W., Amperometric detection of amines using cobalt electrodes after separation by ion-moderated partition chromatography. *Talanta* **1997**, 44, (2), 239-248.

[73] Uslu B., Dogan, B., Ozkan, S.A., Aboul-Enein, Y., Electrochemical behavior of vardenafil on glassy carbon electrode: Determination in tablets and human serum. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 552, (1-2), 127-134.

[74] Medeiros, R.A.; de Carvalho, A.E.; Rocha-Filho, R.C.; Fatibello-Filho, O., Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode. *Talanta* **2008**, 76, (3), 685-689.

[75] Goyal, R.N.; Singh, S.P., Voltammetric determination of paracetamol at C-60-modified glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta* **2006**, 51, (15), 3008-3012.

[76] Uslu, B.; Ozkan, S.A., Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. *Anal. Lett.* **2007**, 40, (5) 817-853.

[77] www.cdcc.sc.usp.br/elementos/carbono.html, acesso em 04/08/08.

[78 www.arch.mcgill.ca/prof/sijpkes/arch374/winter2002/psbmonro/index.htm, Carbon structures. The building blocks of our world, acesso em 04/08/08.

[79] Rivas, G.A.; Rubianes, M.D.; Rodriguez, M.C.; Ferreyra, N.E.; Luque, G.L.; Pedano, M.L.; Miscoria, S.A.; Parrado, C., Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. *Talanta* **2007**, 74, (3), 291-307.

[80] Gonçalves, E.S.; Rezende, M.C.; Ferreira, N.G., Dynamics of defects and surface structure formation in reticulated vitreous carbon. *Braz. J. Phys.* **2006**, 36, (2A), 264-266.

[81] Hupert, M.; Muck, A.; Wang, J.; Stoher, J.; Cvackova, Z.; Haymond, S.; Show, Y.; Swain, G.M., Conductive diamond thin-films in electrochemistry. *Diamond Relat. Mater.* **2003**, 12, (10-11), 1940-1949.

[82] Uslu, B.; Dogan, B.; Ozkan, S.A., Electrochemical studies of ganciclovir at glassy carbon electrodes and its direct determination in serum and pharmaceutics by square wave and differential pulse voltammetry. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 537, (1-2), 307-312.
[83] Dogan, B.; Ozkan, S.A., Electrochemical behavior of carvedilol and its adsorptive stripping determination in dosage forms and biological fluids. *Electroanalysis* **2005**, 17, (22), 2074-2083.
[84] Uslu, B.; Ozkan, S.A., Anodic voltammetry of abacavir and its determination in pharmaceuticals and biological fluids. *Electrochim. Acta* **2004**, 49, (25), 4321-4329.
[85] Michalkiewicz, S., Voltammetric determination of coenzyme Q(10) in pharmaceutical dosage forms. *Bioelectrochemistry* **2008**, 73, (1), 30-36.
[86] Turchan, M.; Jara-Ulloa, P.; Bollo, S.; Nunez-Vergara, L.J.; Squella, J.A.; Alvarez-Lueje, A., Voltammetric behaviour of bromhexine and its determination in pharmaceuticals. *Talanta* **2007**, 73, (5), 913-919.
[87] Barroso, M.F.; Paiga, P.; Vaz, M.C.V.F.; Delerue-Matos, C., Study of the voltammetric behaviour of metam and its application to amperometric flow system. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 383, (5), 880-885.
[88] Huang, F.; Jin, G.; Liu, Y.; Kong, J., Sensitive determination of phenylephrine and chlorprothixene at poly(4-aminobenzene sulfonic acid) modified glassy carbon electrode. *Talanta* **2008**, 74, (5), 1435-1441.
[89] Yang, G.J.; Qu, X.L.; Shen, M.; Wang, C.Y.; Qu, Q.S.; Hu, X.Y., Preparation of glassy carbon electrode modified by hydrophobic gold nanoparticles and its application for the determination of ethamsylate in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. *Sens. Actuators B* **2007**, 128, (1), 258-265.
[90] Quintino, M.S.M.; Araki, K.; Toma, H.E.; Angnes, L., Amperometric quantification of sodium metabisulfite in pharmceutical formulations utilizing tetraruthenated porphyrin film modified electrodes and batch injection analysis. *Talanta* **2006**, 68, (4), 1281-1286.
[91] Du, D.; Ye, X.P.; Zhang, J.D.; Liu, D.L., Cathodic electrochemical analysis of methyl parathion at bismuth-film-modified galssy carbon electrode. *Electrochim. Acta* **2008**, 53, (13), 4478-4484.
[92] Pinter, J.S.; Brown, K.L.; Deyoung, P.A.; Peaslee, G.F., Amperometric detection of hydrazine by cyclic voltammetry and flow injection analysis using ruthenium modified glassy carbon electrodes. *Talanta* **2007**, 71, (3), 1219-1225.

[93] Xu, C.L.; Wu, K.B.; Hu, S.H.; Cui, D.F., Electrochemical detection of parathion at a glassy-carbon electrode modified with hexadecane. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 373, (4-5), 284-288.

[94] Friedrich, J.M.; Ponce-de-León, C.; Reade, G.W.; Walsh, F.C., Reticulated vitreous carbon as an electrode material. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, 561, (1-2), 203-217.

[95] Wang, J., Reticulated vitreous carbon – A new versatile electrode material. *Electrochim. Acta* **1981**, 26, (12), 1721-1726.

[96] Wieck, H.J.; Shea, C.; Yacynych, A.M., Reticulated vitreous carbon electrode materials chemically modified with immobilized enzyme. *Anal. Chim. Acta* **1982**, 142, (10), 277-279.

[97] Wieck, H.J.; Heider, G.H.; Yacynych, A.M., Chemically modified reticulated vitreous carbon electrode with immobilized enzyme as a detector in flow-injection determination of glucose. *Anal. Chim. Acta* **1984**, 158, (1), 137-141.

[98] Szucs, A.; Loix, A.; Nagy, J.B.; Lamberts, L., Fullerene film electrodes in aqueous-solutions. Part 1. Preparation and electrochemical characterization. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, 397, (1-2), 191-203.

[99] Goyal, R.N.; Gupta, V.K.; Bachheti, N.; Sharma, R.A., Electrochemical sensor for the determination of dopamine in presence of high concentration of ascorbic acid using a fullerene-C-60 coated gold electrode. *Electroanalysis* **2008**, 20, (7), 757-764.

[100] Goyal, R.N.; Singh, S.P., Voltammetric determination of paracetamol at C-60-modified glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta* **2006**, 51, (15), 3008-3012.

[101] Goyal, R.N.; Singh, S.P., Voltammetric determination of atenolol at C-60-modified glassy carbon electrodes. *Talanta* **2006**, 69, (4), 932-937.

[102] Csiszar, M.; Szucs, A.; Tolgyesi, M.; Mechler, A.; Nagy, J.B.; Novak, M., Electrochemical reactions of cytochrome C on electrodes modified by fullerene films. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 497, (1-2), 69-74.

[103] Goyal, R.N.; Bachheti, N.; Tyagi, A.; Pandey, A.K., Differential pulse voltammetric determination of methylprednilsolone in pharmaceuticals and human biological fluids. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 605, (1), 34-40.

[104] Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, 354, (6348), 56-58.

[105] Souza, A.G.; Fagan, S.B., Functionalization of carbon nanotubes. *Quim. Nova* **2007**, 30, (7), 1695-1703.

[106] Rivas, G.A.; Rubianes, M.D.; Rodriguez, M.C.; Ferreyra, N.F.; Luque, G.L.; Pedano, M.L.; Miscoria, S.A.; Parrado, C., Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. *Talanta* **2007**, 74, (3), 291-307.

[107] Huang, K.J.; Liu, X.; Xie, W.Z.; Yuan, H.X., Voltammetric behavior of ofloxacin and its determination using a multi-walled carbon nanotubes-Nafion film coated electrode. *Microchim. Acta* **2008**, 162, (1-2), 227-233.

[108] Yi, H.C.; Zheng, D.Y.; Hu, C.G.; Hu, S.S., Functionalized multiwalled carbon nanotubes through in situ electropolymerization of brilliant cresyl blue for determination of epinephrine. *Electroanalysis* **2008**, 20, (10), 1143-1146.

[109] Salimi, A.; Izadi, M.; Hallaj, R.; Rashidi, M., Simultaneous determination of ranitidine and metronidazole at glassy carbon electrode modified with single wall carbon nanotubes. *Electroanalysis* **2007**, 19, (16), 1668-1676.

[110] Wu, K.B.; Wang, H.; Chen, F.; Hu, S.S., Electrochemistry and voltammetry of procaine using a carbon nanotube film coated electrode. *Bioelectrochemistry* **2006**, 68, (2), 144-149.

[111] Yan, X.M.; Shi, B.Y.; Lu, J.J.; Feng, C.H.; Wang, D.S.; Tang, H.X., Adsorption and desorption of atrazine on carbon nanotubes. *J. Coll. Interf. Sci.* **2008**, 321, (1), 30-38.

[112] Pleskov, Y.V., Electrochemistry of diamond: A review. *Russ. J. Electrochem.* **2002**, 38, (12), 1275-1291.

[113] Compton, R.G.; Foord, J.S.; Marken, F., Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes. *Electroanalysis* **2003**, 15, (17), 1349-1363.

[114] de Barros, R.D.M.; Ribeiro, M.C.; An-Sumodjo, P.T.; Julião, M.S.D.; Serrano, S.H.P., Boron-doped CVD diamond films. Part 1. History, production and characterization. *Quim. Nova* **2005**, 28, (2), 317-325.

[115] Suryanarayan, V.; Zhang, Y.; Yoshihara, S.; Shirakashi, T., Voltammetric assay of naproxen in pharmaceutical formulations using boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **2005**, 17, (11), 925-932.

[116] Codognoto, L.; Tanimoto, S.T.; Pedrosa, V.A.; Suffredini, H.B.; Machado, S.A.S.; Avaca, L.A., Electroanalytical determination of carbaryl in natural waters on boron doped diamond electrode. *Electroanalysis* **2006**, 18, (3), 253-258.

[117] de Oliveira, I.R.; Studart, A.R.; Silva Júnior, F.A. ; Pandolfelli, V.C., Artigo revisão: Estabilização de suspensões aquosas contendo grafite. *Cerâmica* **2000**, 46, (300), 186-195.

[118] Kachoosangi, R.T.; Banks, C.E.; Compton, R.G., Simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid using edge plane pyrolytic graphite electrodes. *Electroanalysis* **2006**, 18, (8), 741-747.

[119] Siswana, M.P.; Ozoemena, K.I.; Nyokong, T., Electrocatalysis of asulam on cobalt phthalocyanine modified multi-walled carbon nanotubes immobilized on a basal plane pyrolytic graphite electrode. *Electrochim. Acta* **2006**, 52, (1), 114-122.

[120] Svancara, I.; Vytras, K.; Barek, J.; Zima, J., Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, 31, (4), 311-345.

[121] Guo, X.X.; Song, Z.J.; Tian, X.J.; Song, J.F., Single-sweep voltammetric determination of tamoxifen at carbon paste electrode. *Anal. Lett.* **2008**, 41, (7), 1225-1235.

[122] Chicharro, M.; Zapardiel, A.; Bermejo, E.; Madrid, E.; Rodriguez, C., Flow injection analysis of aziprotryne using an electrochemical sensor based on cobalt phthalocyanine modified carbon paste electrode. *Electroanalysis* **2002**, 14, (13), 892-898.

[123] Korfhage, K.M.; Ravichandran, K.; Baldwin, R.P., Phthalocyanine-containing chemically modified electrodes for electrochemical detection im liquid-chromatography flow-injection systems. *Anal. Chem.* **1984**, 56, (8), 1514-1519.

[124] Baldwin, R.P.; Thomsen, K.N., Chemically modified electrodes in liquid-chromatography detection – A review. *Talanta* **1991**, 38, (1), 1-16.

[125] Wijesuriya, D.C.; Rechnitz, G.A., Biosensors based on plant and animal – tissues. *Biosens. Bioelectron.* **1993**, 8, (3-4), 155-160.

[126] Li, B.X.; Zhang, Z.J.; Jin, Y., Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17, (6-7), 585-589.

[127] Wang, J.; Lin, M.S., Mixed plant-tissue carbon paste bioelectrode. *Anal. Chem.* **1988**, 60, (15), 1545-1548.

[128] Fatibello, O.; Vieira, I.D., Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Quim. Nova* **2002**, 25, (3), 455-464.

[129] Uchiyama, S.; Rechnitz, G.A., Biosensors using flower petal structures. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, 222, (1-2), 343-346.

[130] Lupetti, K.O.; Zanotto-Neto, G.; Fatibello, O., Sweet potato tissue-epoxy resin composite biosensor for hydroquinone determination in photographic process wastewater. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, 17, (7), 1329-1333.

[131] de Carvalho, R.M.; Kubota, L.T.; Rohwedder, J.J., Carbon fibers: Electroanalytical applications as electrodic material. *Quim. Nova* **1999**, 22, (4), 591-599.

[132] Correia, A.N.; Mascaro, L.H.; Machado, S.A.S.; Mazo, L.H.; Avaca, L.A., Ultramicroelectrodes. Part 1. Theoretical revision and outlook. *Quim. Nova* **1995**, 18, (5), 475-480.

[133] Rees, N.V. Compton, R.G., Hydrodynamic microelectrode voltammetry. *Russ. J. Electrochem.* **2008**, 44, (4), 368-389.

[134] He, Y.N.; Chen, H.Y., Differential pulse adsorptive anodic stripping voltammetric determination of pipemidic acid in tablets at a carbon fiber microdisk electrode. *Electroanalysis* **1997**, 9, (18), 1426-1428.

[135] de la Huebra, M.J.G.; Hernandez, P.; Ballesteros, Y.; Hernandez, L., Determination of linuron in soil by stripping voltammetry with a carbon fiber microelectrode. *Talanta* **2001**, 54, (6), 1077-1085.

[136] Nascimento, V.B.; Angnes, L., Screen-printed electrodes. *Quim. Nova* **1998**, 21, (5), 614-629.

[137] Tudorache, M.; Bala, C., Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, (3), 565-578.

[138] Renedo, O.D.; Alonso-Lomillo, M.A.; Martinez, M.J.A., Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta* **2007**, 73, (2), 202-219.

[139] Bergamini, M.F.; Santos, A.L.; Stradiotto, N.R.; Zanoni, M.V.B., Flow injection amperometric determination of procaine in pharmaceutical formulation using a screen-printed carbon electrode. J*. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 43, (1), 315-319.

[140] de Albuquerque, Y.D.T.; Ferreira, L.F., Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrodes. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 596, (2), 210-221.

[141] Pauliukaite, R.; Brett, C.M.A., Characterization and application of bismuth-film modified carbon film electrodes. *Electroanalysis* **2005**, 17, (15-16), 1354-1359.

[142] Florescu, M.; Brett, C.M.A., Development and evaluation of electrochemical glucose enzyme biosensors based on carbon film electrodes. *Talanta* **2005**, 65, (2), 306-312.

[143] Gouveia-Caridade, C.; Brett, C.M.A., Electrochemical impedance characterization of Nafion-coated carbon film resistor electrodes for electroanalysis. *Electroanalysis* **2005**, 17, (7), 549-555.

[144] de Luca, S.; Florescu, M.; Ghica, M.E.; Lupu, A.; Palleschi, G.; Brett, C.M.A.; Compagnone, D., Carbon film electrodes for oxidase-based enzyme sensors in food analysis. *Talanta* **2005**, 68, (2), 171-178.

[145] Pauliukaite, R.; Ghica, M.E.; Brett, C.M.A., A new, improved sensor for ascorbate determination at copper hexacyanoferrate modified carbon film electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 381, (4), 972-978.

[146] Pauliukaite, R.; Florescu, M.; Brett, C.M.A., Characterization of cobalt-and copper hexacyanoferrate-modified carbon film electrodes for redox-mediated biosensors. *J. Solid State Electrochem.* **2005**, 9, (5), 354-362.

[147] Gouveia-Caridade, C.; Brett, C.M.A., The influence of Triton-X-100 surfactant on the electroanalysis of lead and cadmium at carbon film electrodes – An electrochemical impedance study. J*. Electroanal. Chem.* **2006**, 592, (1), 113-120.

[148] Barsan, M.M.; Pinto, E.M.; Brett, C.M.A., Electrosynthesis and electrochemical characterization of phenazine polymers for application in biosensors. *Electrochim. Acta* **2008**, 53, (11), 3973-3982.

[149] Pauliukaite, R.; Schoenleber, M.; Vadgama, P.; Brett, C.M.A., Development of electrochemical biosensors based on sol-gel enzyme encapsulation and protective polymer membranes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 309, (4), 1121-1131.

[150] Ghica, M.E.; Pauliukaite, R.; Marchand, N.; Devic, E.; Brett, C.M.A., An improved biosensor for acetaldehyde determination using a bienzymatic at poly(neutral red) modified carbon film electrodes. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 591, (1), 80-86.

[151] Ghica, M.E.; Brett, C.M.A., Development of novel glucose and pyruvate biosensors at poly(neutral red) modified carbon film electrodes. Application to natural samples. *Electroanalysis* **2006**, 18, (8), 748-756.

[152] Barsan, M.M.; Brett, C.M.A., An alcohol oxidase biosensor using PNR redox mediator at carbon film electrodes. *Talanta* **2008**, 74, (5), 1505-1510.

[153] Ghica, M.E.; Brett, C.M.A., Development and applications of a bienzymatic amperometric glycerol biosensor based on a poly(neutral red) modified carbon film electrode. *Anal. Lett.* **2008**, 39, (8), 1527-1542.

[154] Pauliukaite, R.; Doherty, A.P.; Murnaghan, K.D.; Brett, C.M.A., Characterization and application of carbon film electrodes in room temperature ionic liquid media. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, 616, (1-2), 14-26.

[155] Haley, T.J., Review of the toxicology of paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium chloride). *Clin. Toxicol.* **1979**, 14, (1), 1-46.

[156] Mallat, E.; Barzen, C.; Abuknesha, R.; Gauglitz, G.; Barcelo, D., Fast determination of paraquat residues in water by an optical immunosensor and validation using capillary electrophoresis-ultraviolet detection. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 427, (2), 165-171.

[157] Aramendia, M.A.; Borau, V.; Lafont, F.; Marinas, A.; Marinas, J.M.; Moreno J.M; Porras, J.M.; Urbano, F.J., Determination of diquat and paraquat in olive oil by ion-pair liquid chromatography-electro spray ionization mass spectrometry (MRM). *Food Chem.* **2006**, 97, (1), 181-188.

[158] Posecion, N.C.; Ostrea, E.M.; Bielawski, D.M., Quantitative determination of paraquat in meconium by sodium borohdride-nickel chloride chemical reduction and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J. Chromatogr. B* **2008**, 862, (1-2), 93-99.

[159] Infante, C.M.C.; Morales-Rubio, A.; de la Guardia, M., A multicommuted flow system with solenoid micro-pumps for paraquat determination in natural waters. *Talanta* **2008**, 75, (5), 1376-1381.

[160] Acedo-Valenzuela, M.I.; Galeno-Diaz, T.; Mora-Diez, N.; Silva-Rodriguez, A., Determination of neutral and cationic herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 519, (1), 65-71.

[161] Walcarius, A.; Lamberts, L., Square wave voltammetric determination of paraquat and diquat in aqueous solution. *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 406, (1-2), 59-68.

[162] Saad, B.; Ariffin, M.; Saleh, M.I., Flow injection potentiometric determination of paraquat in formulations and biological samples. *Talanta* **1998**, 47, (5), 1231-1236.

[163] Dezeeuw, R.A.; Wijsbeek, J.; Franke, J.P.; Bogusz, M.; Klys, M., Multicenter evaluation of ultrafiltration, dialysis, and thermal coagulation as sample pretreatment methods for the colorimetric determination of paraquat in blood and tissues. *J. Forensic Sci.* **1986**, 31, (2), 504-510.

[164] Bacigalupo, M.A.; Meroni, G.; Mirasoli, M.; Parisi, D.; Longhi, R., Ultrasensitive quantitative determination of paraquat: Application to river, ground, and drinking water analysis in an agricultural area. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, (2), 216-219.

[165] Luque, M.; Rios, A.; Valcarcel, M., Sensitive determination of paraquat and diquat at the sub-ng ml^{-1} level by continuous amperometric flow methods. *Analyst* **1998**, 123, (11), 2383-2387.

[166] de Souza, D.; da Silva, M.R.C.; Machado, S.A.S., The employ of multiple voltammetric pulses for the study of the adsorption of bipyridilium pesticides in river sediment. *Electroanalysis* **2006**, 18, (23), 2305-2313.

[167] Yanezsedeno, P.; Pingarron, J.M.; Diez, L.M.P., Determination of methylviologen (paraquat) by differential pulse polarography. *Mikrochim. Acta* **1985**, 3, (3-4), 279-287.

[168] Macias, J.M.P.; Hernandez, L.H.; Sobrino, J.M.M.; Escribano, M.T.S., Determination of paraquat by cathodic stripping voltammetry after accumulation through the formation of an ion-pair on a hanging mercury drop electrode. *Electroanalysis* **1993**, 5, (1), 79-83.

[169] de Oliveira, U.M.F.; Lichtig, J.; Masini, J.C., Evaluation of a Nafion coated glassy carbon electrode for determination of paraquat by differential pulse voltammetry. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, 15, (5), 735-741.

[170] Lu, T.H.; Sun, I.W., Electrocatalytic determination of paraquat using a Nafion film coated glassy carbon electrode. *Talanta* **2000**, 53, (2), 443-451.

[171] Lopes, I.C.; de Souza, D.; Machado, S.A.S.; Tanaka, A.A., Voltammetric detection of paraquat pesticide on a phthalocyanine-based pyrolitic graphite electrode. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, (8), 1907-1914.

[172] El Mhammedi, M.A.; Bakasse, M.; Bachirat, R.; Chtaini, A., Square wave voltammetry for analytical determination of paraquat at carbon paste electrode modified with fluoroapatite. *Food Chem.* **2008**, 110, (4), 1001-1006.

[173] de Souza, D.; Machado, S.A.S.; Pires, R.C., Multiple square wave voltammetry for analytical determination of paraquat in natural water, food, and beverages using microelectrodes. *Talanta* **2006**, 69, (5), 1200-1207.

[174] de Souza, D.; Machado, S.A.S., Electrochemical detection of the herbicide paraquat in natural water and citric fruit juices using microelectrodes. *Anal. Chim. Acta* **2005,** 546, (1), 85-91.

[175] Souza, D.; Codognoto, L.; Machado, S.A.S.; Avaca, L.A., Electroanalytical determination of the herbicide paraquat in natural water and commercial tea samples with gold electrodes obtained from recordable compact disc. *Anal. Lett.* **2005**, 38, (2), 331-341.

[176] Walcarius, A.; Rozanska, S.; Bessiere, J.; Wang, J., Screen-printed zeolite-modified carbon electrodes. *Analyst* **1999**, 124, (8), 1185-1190.

[177] Quintino, M.S.M.; Araki, K.; Toma, H.E.; Angnes, L., Batch injection analysis utilizing modified electrodes with tetraruthenated porphyrin films for acetaminophen quantification. *Electroanalysis* **2002**, 14, (23), 1629-1634.

[178] Martin, F.L.; McLean, A.E.M., Comparison of paracetamol-induced hepatotoxicity in the rat in vivo with progression of cell injury in vitro in rat liver slices. *Drug Chem. Toxicol.* **1998**, 21, (4), 477-494.

[179] Mugford, C.A.; Tarloff, J.B., The contribution of oxidation and deacetylation to acetaminophen nephrotoxicity in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett.* **1997**, 93, (1), 15-22.

[180] Jemnitz, K.; Veres, Z.; Monostory, K.; Kobori, L.; Vereczkey, L., Interspecies differences in acetaminophen sensitivity of human, rat, and mouse primary hepatocytes. *Toxicol. In vivo* **2008**, 22, (4), 961-967.

[181] The United States Pharmacopoeia, *The National Formulary – USP 23, NF – 18*, Twinbrook Parkway, Rockville 1995, 16.

[182] Farmacopéia Brasileira, 3ª ed., Organização Andrei Ed. S.A., São Paulo 1977, 656.

[183] Damiani, P.C.; Ribone, M.E.; Olivieri, A.C., Rapid-determination of paracetamol in blood-serum samples by first-derivative UV absorption –spectroscopy. *Anal. Lett.* **1995**, 28, (12), 2219-2226.

[184] Freycon, P.; Accominotti, M.; Vallon, J.J., Elimination of salicyclic interference in the UV determination of blood paracetamol. *Anal. Lett.* **1981**, 14, (20), 1767-1782.

[185] Mohamed, F.A.; Abdallah, M.A.; Shammat, S.M., Selective spectrophotometric determination of p-aminophenol and acetaminophen. *Talanta* **1997**, 44, (1), 61-68.

[186] Llorent-Martinez, E.J.; Satinsky, D.; Solich, P.; Ortega-Barrales, P.; Molina-Diaz, A., Fluorimetric SIA optosensing in pharmaceutical analysis: Determination of paracetamol. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 45, (2), 318-321.

[187] Hewavitharana, A.K.; Lee, S., Dawson, P.A.; Markovich, D.; Shaw, P.N., Development of an HPLC-MS/MS method for the selective determination of paracetamol metabolites in mouse urine. *Anal. Biochem.* **2008**, 374, (1), 106-111.

[188] di Girolamo, A.; O'Neill, W.M.; Wainer, I.W., A validated method for the determination of paracetamol and its glucuronide and sulphate metabolites in the urine of HIV+/AIDS patients using wavelength-switching UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, 17, (6-7), 1191-1197.

[189] ElMouelhi, M.; Buszewski, B., Application of solid-phase extraction t the isolation and determination of paracetamol and its metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1990**, 8, (8-12), 651-653.

[190] ShangGuan, X.D.; Zhang, H.F.; Zheng, J.B., Electrochemical behavior and differential pulse voltammetric determination of paracetamol at a carbon ionic liquid electrode. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, (3), 1049-1055.

[191] Kachoosangi, R.T.; Wildgoose, G.G.; Compton, R.G., Sensitive adsorptive stripping voltammetric determination of paracetamol at multiwalled carbon nanotube modified basal plane pyrolytic graphite electrode. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 618, (1), 54-60.

[192] Cervini, P.; Cavalheiro, E.T.G., Determination of paracetamol at a graphite-polyurethane composite electrode as an amperometric flow detector. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, 19, (5), 836-841.

[193] Ozcan, L.; Sahin, Y., Determination of paracetamol based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode. *Sens. Actuators B* **2007**, 127, (2), 362-369.

[194] Vieira, I.C.; Lupetti, K.O.; Fatibello, O., Determination of paracetamol in pharmaceutical products using a a carbon paste biosensor modified with crude extract of zucchini (Cucurbita pepo). *Quim. Nova*, **2003**, 26, (1), 39-43.

[195] Qureshi, S.Z.; Saeed, A.; Rahman, N., Spectrophotometry method for the determination of acetaminophen in drug formulations by oxidative coupling with m-cresol. *Chem. Anal.* **1992**, 37, (2), 227-229.

[196] Verma, K.K.; Jain, A.; Stewart, K.K., Flow-injection spectrophotometric determination of acetaminophen in drug formulations. *Anal. Chim. Acta* **1992**, 261, (1-2), 261-267.

[197] Ramos, M.L.; Tyson, J.F.; Curran, D.J., Determination of acetaminophen by flow injection with on-line chemical derivatization: Investigations using visible and FTIR spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 364, (1-3), 107-116.

[198] Chu, Q.C.; Jiang, L.M.; An, X.H.; Ye, J.N., Rapid determination of acetaminophen and p-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 606, (2), 246-251.

[199] Satinsky, D.; dos Santos, L.M.L.; Sklenarova, H.; Solich, P.; Montenegro, M.C.B.S.M.; Araújo, A.N., Sequential injection chromatographic determination of ambroxol hydrochloride and doxycycline in pharmaceutical preparations. *Talanta* **2005**, 68, (2), 214-218.

[200] Reynold J.E.F. (Ed.) Martindale, *The Extra Pharmacopoeia*, 29th ed., The Pharmaceutical Press, London, 1989.

[201] Su, F.L.; Wang, F.; Gao, W.; Liu, H.D., Determination of ambroxol in human plasma by high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI) *J. Chromatogr. B* **2007**, 853, (1-2), 364-368.

[202] Kim, H.; Yoo, J.Y.; Han, S.B.; Lee, H.J.; Lee, K.R., Determination of ambroxol in human plasma using LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 32, (2), 209-216.

[203] Hadad, G.M.; El-Gindy, A.; Mahmoud, W.M.M., HPLC and chemometrics-assisted UV-spectroscopy methods for the simultaneous determination of ambroxol and doxycycline in capsule. *Spectrochim. Acta A* **2008**, 70, (3), 655-663.

[204] Pospisilova, M.; Polasek, M.; Jokl, V., Determination of ambroxol or bromhexine in pharmaceuticals by capillary isotachophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, 24, (3), 421-428.

[205] Kim, J.; Noh, J.; Chung, H.; Woo, Y.A.; Kemper, M.S.; Lee, Y., Direct, non-destructive quantitative measurement of an active pharmaceutical ingredient in an intact capsule formulation using Raman spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 598, (2), 280-285.

[206] Hwang, M.S.; Cho, S.; Chung, H.; Woo, Y.A., Nondestructive determination of the ambroxol content in tablets by Raman spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 38, (2), 210-215.

[207] Dincer, Z.; Basan, H.; Goger, N.G., Quantitative determination of ambroxol in tablets by derivative UV spectrophotometric method and HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 31, (5), 867-872.

[208] Indrayanto, G.; Handajani, R., Quantitative-determination of ambroxol hydrochloride in syrups by RP-HPLC and UV spectroscopy. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1994**, 20, (9), 1639-1647.

[209] Colombo, L.; Marcucci, F.; Marini, M.G.; Pierfederici, P.; Mussini, E., Determination of ambroxol in biological-material by gas-chromatography with electron-capture detection. *J. Chrom. Biom. Appl.* **1990**, 530, (1), 141-147.

[210] Habib, I.H.I.; Zayed, S.I.M., Adsorptive stripping voltammetric determination of ambroxol. *Pharmazie* **2005**, 60, (3), 193-196.

[211] Demircigil, B.T.; Uslu, B.; Ozkan, Y.; Ozkan, S.A.; Senturk, Z., Voltammetric oxidation of ambroxol and application to its determination in pharmaceuticals and in drug dissolution studies. *Electroanalysis* **2003**, 15, (3), 230-234.

[212] Satinsky, D.; Huclova, J.; Ferreira, R.L.C.; Montenegro, M.C.B.S.M.; Solich, P., Determination of ambroxol hydrochloride, methylparaben and benzoic acid in pharmaceutical preparations based on sequential injection technique coupled with monolithic column. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 40, (2), 287-293.

[213] Satana, E.; Basan H.; Goger, N.G., Determination of ambroxol hydrochloride in tablets using flow-injection UV spectrophotometry and HPLC. *J. Anal. Chem.* **2008**, 63, (5), 451-454.

[214] PerezRuiz, T.; MartinezLozano, C.; Sanz, A.; SanMiguel, M.T., Automatic extraction-spectrophotometric method for the determination of ambroxol in pharmaceutical preparations. *Talanta* **1996**, 43, (7), 1029-1034.

[215] Pedrotti, J.J.; Angnes,L; Gutz, I.G.R, Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junction. *Electroanalysis* **1996**, 8, (7), 673-675.

[216] Bergamin, H.; Zagatto, E.A.G.; Krug, F.J.; Reis, B.F., Merging zones in flow injection analysis: Part 1. Double proportional injector and reagent consumption. *Anal. Chim. Acta* **1978**, 101, (1), 17-23.

[217] Krug, F.J.; Bergamin, H.; Zagatto, E.A.G., Commutation in flow-injection analysis. *Anal. Chim. Acta* **1986**, 179, 103-118.

[218] Indrayanto, G.; Handayani, R., Quantitative determination of ambroxol hydrochloride in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, 11, (8), 781-784.

[219] British Pharmacopoeia, Vol. I, The Stationery Office, London, 2005, 106.

[220] Bird, C.L.; Kuhn, A.T.; Electrochemistry of the viologens. *Chem. Soc. Rev.* **1981**, 10, (1), 49-82.

[221] Walcarius, A.; Lamberts, L.; Derouane, E.G., The methyl viologen incorporated zeolite modified carbon-paste electrode: Part 1. Electrochemical-behavior in aqueous-media-effects of supporting electrolyte and immersion time. *Eletrochim. Acta* **1993**, 38, (15), 2257-2266.

[222] Monk, P.M.S.; Turner, C.; Akhtar,S.P., Electrochimical behaviour of methyl viologen in a matrix of paper. *Electrochim. Acta* **1999**, 44, (26), 4817-4826.

[223] Miller, J.C.; Miller, J.N., *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, 1998.

[224] Barroso-Fernandez, B.; Lee-Alvarez, M.T.; Seliskar, C.J.; Heineman, W.R., Electrochemical behavior of methyl viologen at graphite eletrodes modified with Nafion sol-gel composite. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 370, (2-3), 221-230.

[225] El Mhanunedi, M.A.; Bakasse, M.; Chtaini, A., Square-wave voltammetric determination of paraquat at carbon paste electrode modified with hydroxyapatite. *Electronalysis* **2007**, 19, (16), 1727-1733.

[226] Wangfuengkanagul, N.; Chailapakul, O., Electrochemical analysis of acetaminophen using a boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 28, (5), 841-847.

[227] Gilmartin, M.A.T.; Hart, J.P., Rapid detection of paracetamol using a disposable, surface-modified screen-printed carbon electrode. *Analyst* **1994**, 119, (11), 2431-2437.

[228] VanBenschoten, J.J.; Lewis, J.Y.; Heineman, W.R.; Roston, D.A.; Kissinger, P.T., Cyclic voltammetry experiment. *J.Chem. Educ.* **1983**, 60, (9), 772-776.

[229] Miner, D.J.; Rice, J.R.; Riggin, R.M.; Kissinger, P.T., Voltmmetry of acetaminophen and its metabolites. *Anal. Chem.* **1981**, 53, (14), 2258-2263.

[230] Wang, J.; Naser, N.; Ozsoz, M., Plant tissue-based amperometric electrode for eliminating ascorbic-acid interferences. *Anal. Chim. Acta* **1990**, 234, (2), 315-320.

[231] Matos, R.C.; Augelli, M.A.; Pedrotti, J.J.; Lago, C.L.; Angnes, L., Amperometric differential determination of ascorbic acid in beverages and vitamin C tablets using a flow cell containing an array of gold microelectrodes modified with palladium. *Eletroanalysis* **1998**, 10, (13), 887-890.

[232] Gosser-Jr, D.K., *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*, VCH Publishers Inc., New York, 1993.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Quantificação de adrenalina em formulações farmacêuticas utilizando biossensores tissulares

1. Introdução

Paralelamente às investigações realizadas nesta tese com os novos sensores, um estudo foi desenvolvido visando a quantificação de adrenalina ou epinefrina [1-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilaminoetanol] em formulações farmacêuticas utilizando biossensores amperométricos. Este fármaco é um importante neurotransmissor e é extensivamente empregado no tratamento de asma brônquica, hipertensão e glaucoma [1]. Várias técnicas têm sido exploradas para a determinação de epinefrina em fluidos biológicos e amostras farmacêuticas, incluindo espectrofotometria [2,3], fluorimetria [4], cromatografia líquida [5,6], eletroforese capilar [7,8], quimiluminescência [9] e biamperometria [10]. Uma vez que a maioria destas técnicas apresenta um custo elevado ou requer etapas de derivatização que consomem muito tempo, os métodos eletroquímicos surgem como um caminho alternativo vantajoso pela simplicidade proporcionada com o uso dos sensores voltamétricos. Dentre eles, os biossensores amperométricos desenvolvidos a partir de tecidos vegetais apresentam características interessantes tais como disponibilidade de plantas facilitada, simplicidade de construção, atividade catalítica estável durante semanas e presença de cofatores, visto que as enzimas encontram-se imobilizadas em seu ambiente natural.

Neste estudo, fibras de coco de uma palmeira (*Livistona chinensis*) são exploradas como fonte natural de polifenol oxidase (PFO) para a construção dos sensores tissulares. Os biossensores constituídos de fibras de coco, grafite e óleo mineral nas proporções de 15, 50 e 35% em massa, respectivamente, foram adaptados ao sistema em fluxo. O material enzimático contido no mesocarpo fibroso do coco catalisa a oxidação da adrenalina para adrenoquinona, como produto primário. Este produto é reduzido eletroquimicamente (E_{red} = -0,10 V *vs.* Ag/AgCl) sobre a superfície da pasta de carbono e a corrente resultante é usada para a quantificação do fármaco. Além do sistema proposto, um reator tissular (~0,08 g de fibras de coco) associado ao sistema de injeção em fluxo (FIA) foi explorado também para a determinação espectrofotométrica do analito, com a formação de um segundo produto (adrenocromo) [1], monitorado em 486 nm (Figura 1). A preparação dos

biossensores e dos bioreatores utilizados neste estudo foi de modo muito similar àquela descrita anteriormente por Lima [11].

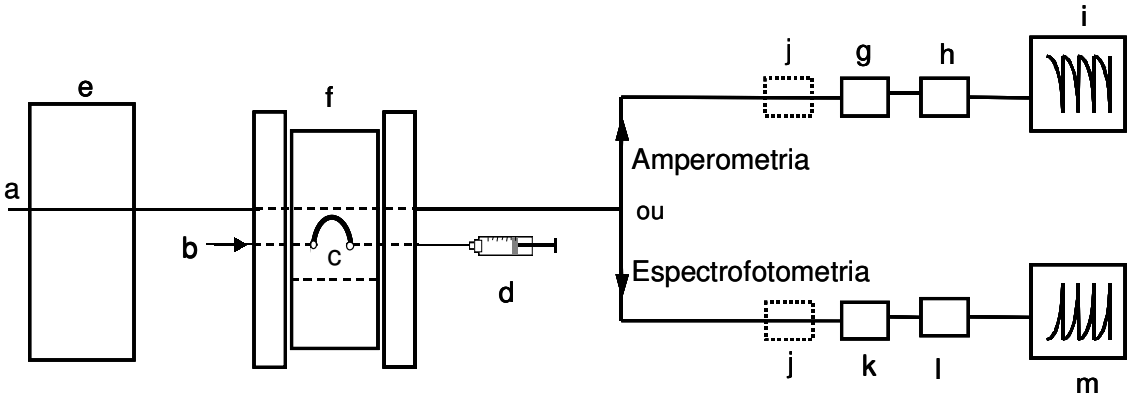


Figura 1 – Representação esquemática para os sistemas FIA propostos na determinação de adrenalina: (a) solução transportadora, (b) amostras farmacêuticas, (c) alça de amostragem, (d) seringa, (e) bomba peristáltica, (f) injetor comutador, (g) célula eletroquímica, (h) potenciostato, (i) sinal amperométrico, (j) reator tissular, (k) célula de quartzo, (l) espectrofotômetro, (m) sinal espectrofotométrico.

2. Resultados e Discussão

Para estabelecer as condições mais favoráveis para a determinação amperométrica de adrenalina em amostras farmacêuticas, algumas variáveis (alça de amostragem e vazão) envolvidas na operação FIA foram estudadas em solução tampão acetato de sódio/ácido acético 0,10 mol L^{-1} (pH 4,4). Embora estudos preliminares mostraram resultados melhores em solução tampão 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0), o eletrólito tampão acetato foi empregado em todos os experimentos descritos aqui com o intuito de contornar problemas relacionados com a interferência de outras espécies, presentes nos produtos farmacêuticos, sobre o sinal amperométrico. Um estudo de interferentes será descrito a seguir. O potencial de trabalho de -0,10 V (*vs.* Ag/AgCl) foi mantido por corresponder ao valor máximo de corrente obtida durante os experimentos voltamétricos.

Variando a alça de amostragem de 50 até 200 μL, a melhor relação entre sensibilidade e freqüência analítica (60 determinações por hora) foi alcançada quando uma alça de 100 μL foi utilizada. A melhor repetibilidade foi obtida para uma vazão de 2,0 mL min^{-1}, quando este parâmetro foi avaliado dentro da faixa de 0,5 e 5,0 mL min^{-1}.

Nas condições otimizadas, uma série de experimentos em quadruplicata foi conduzida para a elaboração da curva de calibração do fármaco utilizando o biossensor tissular. A faixa linear de concentração foi observada dentro do intervalo de 5,0 x 10^{-5} a 3,5 x 10^{-4} mol L^{-1}, conforme é mostrado na Figura 2. A linearidade entre os sinais de corrente obtidos por FIA e a concentração do analito é representada pela equação $i = -0,0011 + 0,0010\ c$, r = 0,998, no qual *i* corresponde à corrente catódica (em μA) e *c* é a concentração de adrenalina (em μmol L^{-1}), conforme detalhe da Figura 2. Limite de detecção de 1,5 x 10^{-5} mol L^{-1} (três vezes o desvio padrão do branco) foi estimado assim como o limite de quantificação foi calculado em 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}. Estudos de repetibilidade forneceram um desvio padrão relativo de 3,1% para uma média de dez injeções consecutivas de uma solução padrão de adrenalina 3,5 x 10^{-4} mol L^{-1}.

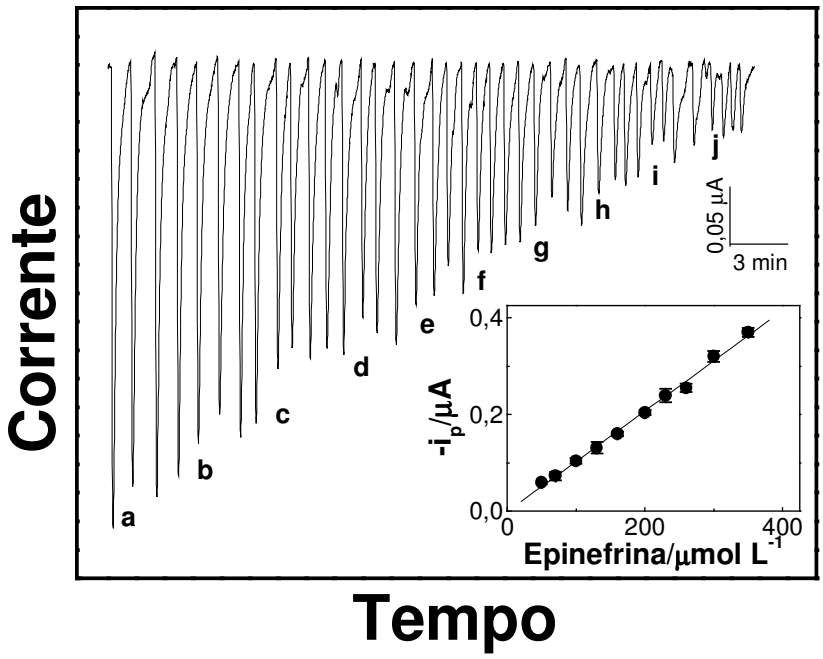


Figura 2 – Resultados FIA para o biossensor após injeções de soluções de adrenalina (a) 3,5, (b) 3,0, (c) 2,6, (d) 2,3, (e) 2,0, (f) 1,6, (g) 1,3, (h) 1,0, (i) 0,7, (j) 0,5 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,4). O detalhe mostra a curva de calibração. E_{red}: -0,10 V (*vs.* Ag/AgCl), vazão: 2,0 mL min^{-1} e alça: 100 µL.

O efeito de possíveis interferentes foi investigado pela adição de sulfito, metabissulfito e ácido benzóico, principais componentes de amostras de inalação de adrenalina, em uma solução do analito 1,3 x 10^{-4} mol L^{-1}. Estes excipientes foram adicionados na concentração de 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} assim como todas as soluções foram preparadas em tampão acetato de sódio/ácido acético 0,1 mol L^{-1} (pH 4,4). A presença de ácido benzóico não provocou uma mudança considerável na corrente de redução do fármaco. Porém, a adição de sulfito e metabissulfito promoveram um decréscimo no sinal amperométrico de 29 e 90%, respectivamente. Para contornar estas interferências, as amostras farmacêuticas foram borbulhadas com nitrogênio durante dez minutos na presença de solução tampão (0,1 mol L^{-1}, pH 4,4). Com este procedimento, o sulfito e o metabissulfito foram eliminados na forma de H_2SO_3.

Para avaliar a aplicabilidade do biossensor tissular, três produtos de inalação comerciais foram analisados. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos com o método proposto bem como aquele recomendado pela farmacopéia brasileira [12]. Os desvios padrões relativos alcançados com a amperometria estão situados entre -4,2 e +3,0%, comparados aos valores encontrados nos rótulos dos medicamentos de 136,5 mmol L^{-1}.

Tabela 1 – Resultados obtidos para as análises de adrenalina em formulações farmacêuticas através dos métodos amperométrico associado ao biossensor, espectrofotométrico, conforme farmacopéia brasileira [12], e espectrofotométrico associado ao bioreator.

Amostra	Adrenalina (mmol L^{-1})			Δ (%)		
	Farmacopéia (λ = 280 nm)[a]	Biossensor (E_{red} = -0,10 V)[b]	Bioreator (λ = 486 nm)[a]	c	d	e
1	168,2 ± 0,4	136,7 ± 0,6	138,9 ± 2,5	+23,2	+0,1	+1,8
2	163,1 ± 0,5	140,6 ± 2,5	133,9 ± 4,1	+19,5	+3,0	-1,9
3	167,0 ± 0,2	130,7 ± 0,8	131,8 ± 2,9	+22,3	-4,2	-3,4

(a) Média ± desvio padrão para 3 determinações e (b) Média ± desvio padrão para 4 determinações. Δ: diferença relativa entre o valor nominal e: (c) o método espectrofotométrico-UV (farmacopéia brasileira), (d) o método amperométrico com biossensor e (e) o método espectrofotométrico com bioreator.

O método espectrofotométrico na região do ultravioleta (λ = 280 nm) e na presença de ácido clorídrico 0,01 mol L^{-1}, recomendado pela farmacopéia brasileira [12], apresentou valores muito superiores àqueles mencionados pelo fabricante (Tabela 1). Este fato ocorreu, principalmente, devido à interferência causada pelo ácido benzóico presente nas amostras de inalação, exibindo uma banda de absorbância em 280 nm. Um estudo espectrofotométrico mostrou uma perfeita soma das bandas de absorção individual de adrenalina e ácido benzóico quando comparado à mistura destas espécies. Uma alternativa utilizada foi a introdução de

um bioreator, construído a partir dos tecidos de coco de uma palmeira (*L. chinenis*), antes da célula espectrofotométrica.

A Figura 3 mostra que a adrenalina pode ser monitorada espectrofotometricamente com o reator tissular explorando três comprimentos de onda diferentes: 280, 300 e 486 nm. Nestes experimentos, uma solução do analito 1,5 x 10^{-4} mol L^{-1} preparada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0) circulou pelo sistema em fluxo durante vinte minutos. O arranjo experimental foi aquele empregado por Lima [11] que favorece a rápida reposição do oxigênio bem como a concentração do fármaco pode ser considerada constante ao longo de todo processo reativo.

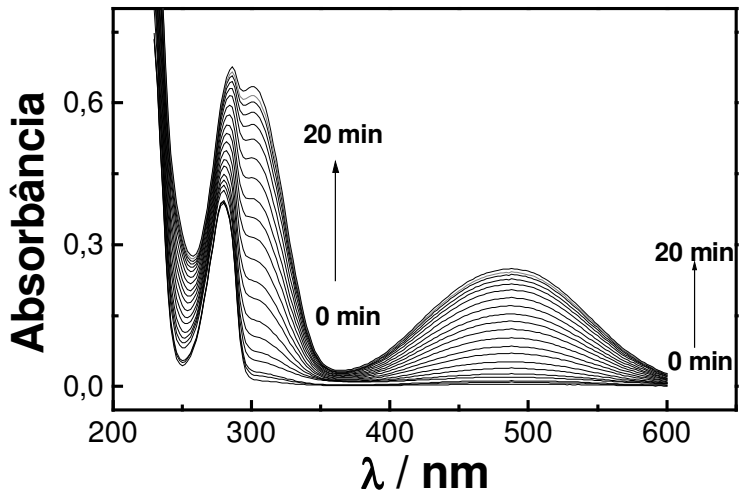


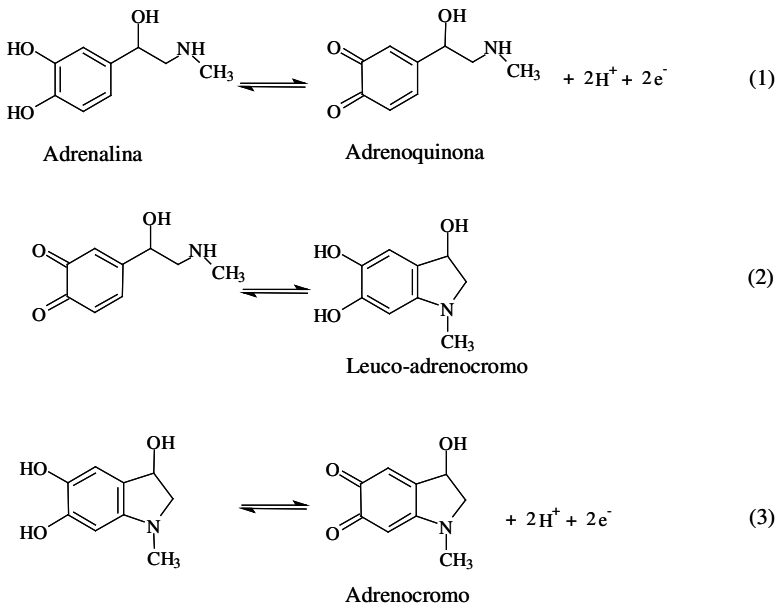
Figura 3 – Espectros de absorção dos produtos de oxidação da adrenalina 1,5 x 10^{-4} mol L^{-1} em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0) na presença PFO, em função do tempo.

Na Figura 3, em torno de 300 nm, observa-se um aumento gradual na absorbância ao longo do tempo. Esta banda de absorção refere-se à oxidação enzimática da adrenalina para a formação da leuco-adrenocromo. Este produto, na presença da PFO proveniente dos tecidos de uma palmeira, é ainda oxidado formando a adrenocromo, de coloração azul-esverdeada, em 486 nm [1,13-15]. Análises espectrofotométricas em 280 ou 300 nm podem ser facilmente afetadas pela presença de outras espécies aromáticas que absorvem neste comprimento de

onda como por exemplo o ácido benzóico, encontrado nas amostras farmacêuticas utilizadas neste estudo. Portanto, optou-se por trabalhar em comprimento de onda correspondente a 486 nm.

Verifica-se ainda na Figura 3 um aumento da intensidade de absorção em 280 nm. Esta variação pode ser justificada pela presença de uma nova espécie (leuco-adrenocromo) em 300 nm que surge gradativamente e altera o perfil do espectro de absorção em 280 nm. Além disso, reações subseqüentes com a formação de dímeros ou polímeros são constatadas na literatura para sistemas similares.

De modo simplificado, o processo envolvendo a oxidação do analito pode ser representado pelas reações abaixo:



A quantificação de adrenalina em amostras comerciais de inalação foi monitorada em 486 nm (adrenocromo) para uma faixa de concentração compreendida entre 2,0 x 10^{-5} e 2,0 x10^{-4} mol L^{-1}, empregando uma alça de 100 µL (Figura 4). O detalhe da Figura 4 mostra um excelente ajuste da regressão linear ($A = 4{,}86 \times 10^{-4} + 0{,}157\ c$, r = 0,999, no qual A corresponde à absorbância e c é a concentração de epinefrina em mmol L^{-1}) com um limite de detecção estimado em 3,1 x 10^{-6} mol L^{-1} (três vezes o desvio padrão do branco).

A Tabela 1 traz também os resultados obtidos com o bioreator para as três amostras farmacêuticas de adrenalina. A comparação com o valor nominal (136,5 mmol L^{-1}) exibiu boa concordância, com erros relativos variando de -3,4 até +1,8%.

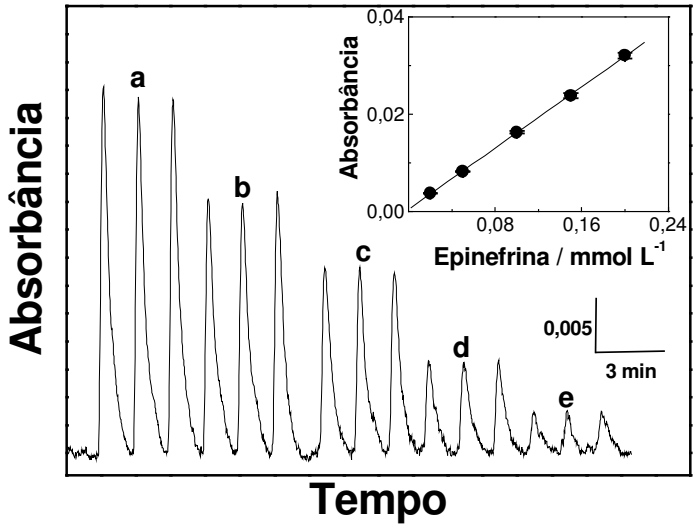


Figura 4 – Experimentos em FIA utilizando reator de tecido de planta (*L. chinensis*) após injeções de soluções de adrenalina: (a) 2,0, (b) 1,5, (c) 1,0, (d) 0,5, (e) 0,2 x 10^{-4} mol L^{-1} em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}.

3. Conclusões

O material enzimático (polifenol oxidase) naturalmente imobilizado nas fibras de uma palmeira (*L. chinensis*) apresentou um comportamento muito favorável para a determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas, tanto na forma de sensores amperométricos quanto no emprego de reatores tubulares associados a FIA com detecção espectrofotométrica. Os biossensores e bioreatores são de construção fácil e rápida, baixo custo e são perfeitamente adequados aos sistemas em fluxo. Os reatores tissulares empregados nas análises espectrofotométricas apresentaram aspectos interessantes, principalmente nos casos em que a adrenalina não pôde ser determinada diretamente em 280 nm, conforme indicado na

farmacopéia brasileira. A biotransformação do analito em outros compostos com bandas de absorção em diferentes comprimentos de onda (300 e 486 nm) permitiu obter uma maior seletividade durante as análises.

Quando os tecidos de coco são utilizados, há quatro possibilidades para a quantificação de adrenalina em amostras farmacêuticas: biossensor amperométrico com detecção da adrenoquinona em -0,10 V (*vs.* Ag/AgCl), bioreator associado à amperometria e posicionado próximo ao transdutor, bioreator associado à espectrofotometria com monitoramento da leuco-adrenocromo em 300 nm ou em 486 nm (adrenocromo). Um artigo científico descrevendo em detalhes este estudo foi publicado no periódico Biosensors and Bioelectronics [16].

4. Referências Bibliográficas

[1] Teixeira, M.F.S; Marcolino-Junior, L.H.; Fatibello, O., Flow injection spectrophotometric determination of adrenaline in pharmaceutical formulations using a solid-phase reactor containing lead (IV) dioxide immobilized in a polyester resin. *Farmaco* **2002**, 57, (3), 215-219.

[2] Nagaraja, P.; Vasantha, R.A.; Sunitha, K.R., A new sensitive and selective spectrophotometric method for the determination of catechol derivates and its pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, 25, (3-4), 417-424.

[3] Nevado, J.J.B.; Gallego, J.M.L.; Laguna, P.B., Flow-injection spectrophotometric determination of adrenaline and dopamine with sodium hydroxide. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, 14, (5), 571-577.

[4] Guo, Y.M.; Yang, J.H.; Wu, X.; Du, A.Q., A sensitive fluorimetric method for the determination of epinephrine. *J. Fluoresc.* **2005**, 15, (2), 131-136.

[5] Baranowska, I.; Plonka, J., Determination of biogenic amines and vitamins in urine samples with HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, 31, (19), 2974-2987.

[6] Mateva, L.V.; Petrov, S.S.; St Lozanov, V.; Elenkova, A.P.; Zacharieva, S.; Mitev, V.I., Simultaneous determination of free polyamines catecholamines and metanephrines in plasma and urine. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, 31, (14), 2128-2140.

[7] Yu, H.; He, F.Y.; Lu, Y.; Hu, Y.L.; Zhong, H.Y.; Xia, X.H., Improved separation efficiency of neurotransmitters on a native printed capillary electrophoresis microchip simply by manipulating electroosmotic flow. *Talanta* **2008**, 75, (1), 43-48.

[8] Sanger-van de Griend, C.E.; Ek, A.G.; Widahl-Nasman, M.E.; Andersson, E.K.M., Method development for the enantiomeric purity determination of low concentrations of adrenaline in local anaesthetic solutions by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41, (1), 77-83.

[9] Wolyniec, E.; Niedzwiedzka, U.; Kojlo, A., Flow-injection chemiluminescence determination of catecholamines. *Instrum. Sci. Technol.* **2007**, 35, (2), 219-231.

[10] Mateo, J.V.G.; Kojlo, A.; Flow-injection biamperometric determination of epinephrine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, 15, (12), 1821-1828.

[11] Lima, A.W.O., *Desenvolvimento de métodos analíticos em sistemas de soluções em fluxo empregando polifenol oxidase naturalmente imobilizada sobre tecidos vegetais.* Tese de doutorado **1998**, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

[12] Farmacopéia Brasileira, 3ª ed., Organização Andrei Ed. S.A., São Paulo 1977, 419.

[13] Chen, S.M.; Peng, K.T., The electrochemical properties of dopamine, epinephrine,norepinephrine, and their electrocatalytic reactions on cobalt (II) hexacyanoferrate films. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, 547, (2), 179-189.

[14] Giulivi, C.; Cadenas, E., Oxidation of adrenaline by ferrylmyoglobin. *Free Radical Biol. Med.* **1998**, 25, (2), 175-183.

[15] Cosa G.; Scaiano, J.C., Reactivity of adrenaline toward alkoxyl radicals and carbonyl triplet states. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, (24), 4609-4614.

[16] Felix, F.S.; Yamashita, M.; Angnes, L., Epinephrine quantification in pharmaceutical formulations utilizing plant tissue biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, (12), 2283-2289.

APÊNDICE B – Determinação de salbutamol em xaropes utilizando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C^4D)

1. Introdução

Um outro estudo foi realizado para a determinação de fármaco (salbutamol) em produtos farmacêuticos empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato. Salbutamol (ou albuterol, α^1-[(terc-butilamino)metil]-4-hidroxi-m-xileno-α-α'-diol) é um agonista β_2-adrenérgico seletivo e muito indicado como broncodilatador no tratamento de asma [1]. Muitas metodologias analíticas têm sido descritas na literatura para a quantificação de salbutamol. Entre as técnicas utilizadas, a espectrofotometria [2], a cromatografia [3], a quimiluminescência [4], a potenciometria [5], a condutometria [6], a amperometria [7] são citadas. Algumas destas técnicas são de alto custo ou necessitam de reações prévias.

Eletroforese capilar (EC) tem provado ser uma poderosa opção para a análise de uma extensa variedade de compostos geralmente iônicos ou ionizáveis. Em EC, separações mais rápidas podem ser executadas com melhor seletividade, alta eficiência, sensibilidade suficiente para a maioria das aplicações e baixo consumo de amostra e reagentes. Diferentes β-agonistas têm sido analisados pela EC direta [8,9], utilizando microextração na fase líquida [10], ou empregando ciclodextrinas [11,12] ou um outro seletor quiral [13].

Neste estudo, as análises de salbutamol foram realizadas em um equipamento de EC com detecção condutométrica sem contato (C^4D, do inglês C*apacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*), desenvolvido pelo grupo do professor Claudimir L. do Lago, operando em 600 kHz e 2,0 V pico a pico (Figura 1). A temperatura no interior do equipamento foi mantida em aproximadamente 25 °C. Os detalhes de construção e do instrumento podem ser encontrados na literatura [14].

Figura 1 – Equipamento de EC-C^4D construído pelo grupo do professor Claudimir L. do Lago e utilizado nas análises de salbutamol em formulações farmacêuticas.

Um capilar de sílica fundida (Agilent Technologies, São Paulo) com 50 µm de diâmetro interno, 375 µm de diâmetro externo, 63 cm de comprimento e 53 cm do início do capilar ao detector foi empregado durante os experimentos. O capilar foi condicionado antes de cada ciclo de análises com fluxo constante de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L^{-1} por 20 min e, pelo mesmo período, com água deionizada e eletrólito de corrida. Para a estabilização da linha base e do sinal de condutância aplicou-se um potencial de corrida de +28 kV. A introdução das amostras e soluções padrão de salbutamol no capilar foi realizada de forma hidrodinâmica com um desnível de 10 cm durante 25 s (modo CZE, C*apillary Zone Electrophoresis*).

2. Resultados e Discussão

Salbutamol possui dois valores de pKa, 9,3 e 10,3 [15]. Abaixo de pH 9,3, ele está predominantemente com carga positiva, enquanto que acima de pH 10,3, está predominantemente aniônico. Desta maneira, este fármaco pode assumir carga positiva, negativa ou a forma zwiteriônica durante as análises eletroforéticas. Baseado nesta informação, Carvalho [16] explorou em sua dissertação de mestrado diferentes sistemas envolvendo EC-C^4D na detecção de salbutamol. Inicialmente, os experimentos foram realizados no modo CZE e utilizando eletrólito tampão borato

5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (pH 9,0). Verificou-se que a mobilidade aparente do fluxo eletroosmótico (FEO) e do analito foram similares, indicando que em tais condições a carga líquida do fármaco foi praticamente nula (está na forma zwiteriônica, próxima ao ponto isoelétrico). A co-eluição observada com o FEO inviabilizou a quantificação do salbutamol.

Outros experimentos com o tampão borato (3,0 x 10^{-2} mol L^{-1} e pH 9,4) foram realizados no modo MEKC (*micellar electrokinetic capillary electrophoresis*). Devido à maior condutividade do eletrólito, observou-se uma melhor relação sinal/ruído acompanhado da redução do potencial de separação do analito. Uma conseqüência desta mudança foi um aumento no tempo de corrida (4 min-CZE para 9 min-MEKC).

Empregando o eletrólito tampão fosfato 4,5 x 10^{-3} mol L^{-1} (pH 12,1) e um surfactante catiônico (brometo de cetiltrimetilamônio), como inversor de fluxo eletroosmótico no modo CZE, foi possível realizar a detecção simultânea do salbutamol e do sulfato. Nestas condições, constatou-se também a possibilidade da quantificação de possíveis açúcares, como a galactose, presentes em amostras de xarope infantil. Porém, o tempo de análise foi ainda maior em comparação às metodologias propostas anteriormente.

Os melhores resultados na detecção de salbutamol (menor tempo de análise e melhor sensibilidade) no modo CZE foram obtidos em tampão acetato 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} (pH 4,9) e na presença do padrão interno TEA (tetraetilamônio, 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1}).

Para estabelecer as condições mais favoráveis com o eletrólito de corrida tampão acetato de sódio/ácido acético em EC-C^4D durante os nossos estudos, avaliou-se o efeito da concentração (1,0 – 3,0 x 10^{-2} mol L^{-1}) e do pH (4,4 – 5,4) desta solução utilizando um potencial de separação de +28 kV. Os melhores resultados (altura de pico maior e perfil de pico bem definido) foram alcançados para um valor de pH correspondente a 4,9. Quando houve um aumento da concentração, verificou-se um decréscimo na altura de pico do analito bem como um perfil de sinal pouco simétrico e uma linha base mais ruidosa. Certamente o efeito Joule, que ocorre quando a capacidade de dissipação de calor do capilar é ultrapassada, contribuiu para este comportamento. Considerando a melhor sensibilidade e o menor tempo de análise, tampão acetato de sódio/ácido acético 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} (pH 4,9) foi utilizado como eletrólito de corrida e TEA 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1} como padrão interno nos experimentos seguintes.

A Figura 2 ilustra eletroferogramas obtidos para soluções padrão de salbutamol no intervalo linear de concentração de 7,0 x 10^{-5} a 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1} (a-f) bem como de uma amostra de xarope comercial convenientemente diluída (g).

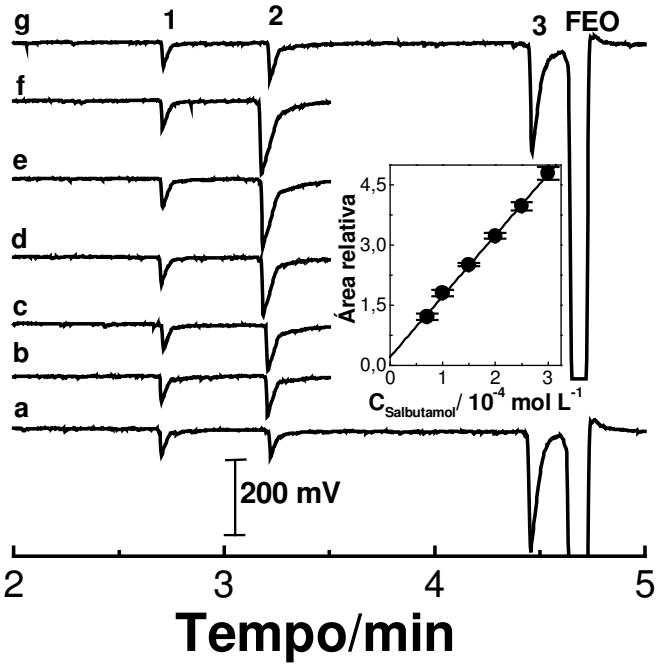


Figura 2 – Eletroferogramas de soluções padrão de salbutamol (pico 2): (a) 0,7, (b) 1,0, (c) 1,5, (d) 2,0, (e) 2,5 , (f) 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1} e (g) amostra de xarope, utilizando eletrólito tampão acetato 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} e TEA 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1} como padrão interno (pico 1). Pico 3: pico desconhecido. $E_{aplicado}$ = +28 kV, injeção hidrodinâmica (10 cm e 25 s). O detalhe mostra a curva de calibração.

A linearidade entre a concentração do analito e a área de pico correspondente pode ser observada no detalhe da Figura 2. A equação de regressão referente a este intervalo linear é $y = (0,21 \pm 0,05) + (1,51 \pm 0,03)\ c$, com r = 0,999, no qual *c* representa a concentração de salbutamol em 10^{-4} mol L^{-1}. O limite de detecção foi estimado em 1,0 x 10^{-5} mol L^{-1} (três vezes o desvio padrão do branco) e o limite de quantificação calculado como 3,3 x 10^{-5} mol L^{-1}.

Para 10 injeções consecutivas de uma solução padrão de salbutamol 7,0 x 10^{-5} mol L^{-1}, o desvio padrão calculado foi de 4,7 %. Para análises de amostras de xarope e considerando três dias diferentes, a reprodutibilidade apresentou desvios padrões relativos situados entre 1,5 e 2,5 %.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos para as três formulações farmacêuticas analisadas por EC-C^4D bem como o valor nominal indicado nas embalagens dos produtos comerciais. Em vista da falta de método padrão descrito na literatura ou nas farmacopéias para a análise de salbutamol em xaropes, a comparação dos resultados com um segundo método analítico não foi possível.

Tabela 1 – Resultados obtidos para a análise de três diferentes amotras de xarope contendo sulfato de salbutamol como princípio ativo.

Amostra	Composição	Valor nominal (mg/5 mL)	EC-C^4D ± D.P.[a] (mg/5 mL)
1	Salbutamol,sacarina sódica, propilparabeno, metilparabeno,aroma, ácido cítrico, ciclamato de sódio e água	2,4	2,20 ± 0,19
2	Salbutamol, ácido cítrico, açúcar, glicerina propilparabeno, citrato de sódio e água	2,4	2,35 ± 0,02
3	Salbutamol, sacarina sódica, propilparabeno, metilparabeno, aroma, ácido cítrico, ciclamato de sódio e água	2,4	2,30 ± 0,04

[a] Média ± desvio padrão de três determinações.

O teste de significância (hipótese nula) foi aplicado para os resultados apresentados na Tabela 2, com um valor crítico de *t* igual a 4,3 para um nível de confiança de 95 % e 2 graus de liberdade. Os valores de *t* experimentais situaram-se entre 1,8 e 4,3, sugerindo não haver evidências de diferenças significativas entre os valores comparados.

3. Conclusões

O método proposto baseado em EC-C^4D mostrou-se adequado para a quantificação de salbutamol em formulações farmacêuticas. Este método apresentou interessantes vantagens que são características da própria técnica tais como pequeno volume de resíduo gerado, baixo custo e tempo de análise muito favorável (aproximadamente 3 min), possibilitando a aplicação rotineira da metodologia. Além disso, não foi necessário o emprego de solventes orgânicos ou etapas prévias de separação, extração ou filtração.

Devido à ausência de uma metodologia oficial descrita para a análise de sulfato de salbutamol em xaropes, os resultados obtidos neste estudo foram comparados somente com os valores nominais fornecidos pelos fabricantes, exibindo boa concordância.

Em condições apropridas (eletrólito de corrida, pH e o emprego de um inversor de fluxo eletroosmótico) e no modo CZE é possível a determinação simultânea do salbutamol e do seu contra-íon, o sulfato, além de determinados açúcares encontrados em amostras farmacêuticas infantis. Estes resultados foram divulgados mediante publicação de artigo científico no periódico Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [17].

4. Referências Bibliográficas

[1] Satinsky, D.; Karlicek, R.; Svoboda, A., Using on-line solid phase extraction for flow-injection spectrophotometric determination of salbutamol. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 455, (1), 103-109.

[2] Dave, H.N.; Mashru, R.C.; Thakkar, A.R., Simultaneous determination of salbutamol sulphate, bromhexine hydrochloride and etofylline in pharmaceutical formulations with the use of four rapid derivative spectrophotometric methods. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 597, (1), 113-120.

[3] Erram, S.V.; Fanska, C.B.; Asif, M.; Determination of albuterol sulfate and its related substances in albuterol sulfate inhalation solution, 0.5% by RP-HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 40, (4), 864-74.

[4] Sanchez, M.A.; Rocha, F.R.P., A flow-based analytical procedure for salbutamol determination exploiting chemiluminescence in a liquid-core waveguide. *Anal. Lett.* **2008**, 41, (9), 1579-1591.

[5] Abdel-Ghani, N.T.; Risk, M.S.; El-Nashar, R.M., Potentiometric flow injection determination of salbutamol. *Anal. Lett.* **2002**, 35, (1), 39-52.

[6] Issa, Y.M.; Shoukry, A.F.; El-Nashar, R.M., Conductimetric determination of reproterol HCl and pipazethate HCl and salbutamol sulphate in their pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, 26, (3), 379-386.

[7] Quintino, M.S.M.; Angnes, L., Bi-amperometric quantification of salbutamol in pharmaceutical products. *Talanta* **2004**, 62, (2), 231-236.

[8] Chen, Y.; Wang, W.; Duan, J.P.; Chen, H.Q.; Chen, G.N., Separation and determination of clenbuterol, cimaterol and salbutamol by capillary electrophoresis with amperometric detection. *Electroanalysis* **2005**, 17, (8), 706-712.

[9] Sirichai, S.; Khanatharana, P., Rapid analysis of clenbuterol, salbutamol, procaterol, and fenoterol in pharmaceuticals and human urine by capillary electrophoresis. *Talanta* **2008**, 76, (5), 1194-1198.

[10] Yamini, Y.; Reimann, C.T.; Vatanara, A; Jonsson, J.A., Extraction and preconcentration salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1124, (1-2), 57-67.

[11] Servais, A.C.; Fillet, M.; Mol, R.; Somsen, G.W.; Chiap, P.; de Jong, G.J.; Crommen, J., On-line coupling of cyclodextrin mediated nonaqueous capillary electrophoresis to mass spectrometry for the determination of salbutamol enantiomers in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 40, (3), 752-757.

[12] Wei, S.L.; Guo, H.F.; Lin, J.M., Chiral separation of salbutamol and bupivacaine by capillary electrophoresis using dual neutral cyclodextrins as selectors and its application to pharmaceutical preparations and rat blood samples assay. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, 832, (1), 90-96.

[13] Gotti, R.; Furlanetto, S.; Andrisano, V.; Cavrini, V.; Pinzauti, S., Design of experiments for capillary electrophoretic enantioresolution of salbutamol using dermatan sulfate. *J. Chromatogr. A* **2000**, 875, (1-2), 411-422.

[14] da Silva, J.A.F.; do Lago, C.L., An oscillometric detector for capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **1998**, 70, (20), 4339-4343.

[15] Malkkilaine, L.; Hartikainen, E., Electrokinetic behaviour of salbutamol and its decomposition products and determination of salbutamol by micellar electrokinetic capillary cromatography. *J. Chromatogr. A* **1996**, 724, (1-2), 297-306.

[16] Carvalho, A.Z., *Aplicação de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato à determinação de epécies neutras.* Dissertação de mestrado **2003**, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

[17] Felix F.S.; Quintino, M.S.M.; Carvalho, A.Z.; Coelho, L.H.G.; do Lago, C.L.; Angnes, L., Determination of salbutamol in syrups by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-C^4D). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 40, (5), 1288-1292.

APÊNDICE C – Estudo do comportamento térmico e cinético do salbutamol em produtos farmacêuticos

1. Introdução

A análise térmica é o grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou de uma reação é medida como função do tempo ou da temperatura enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura [1]. A termogravimetria (TG), a termogravimetria derivada (DTG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC, D*ifferential Scanning Calorimetry*) são as técnicas termoanalíticas mais comumente aplicadas no desenvolvimento de diferentes compostos [2,3].

A aplicação de métodos cinéticos baseados em TG vem sendo amplamente relatada na literatura com a finalidade de elucidar mecanismos de reação no estado sólido [4-7]. Uma das maneiras utilizadas para avaliar a cinética de decomposição por TG é o método isotérmico. Neste método, são traçados gráficos da fração decomposta (α) em função do tempo (t), mantendo as temperaturas constantes (T) na região de interesse. Desta forma, a energia de ativação (E_a, barreira de energia requerida para converter reagentes em produtos) pode ser determinada baseada na equação de Arrhenius (equação 1). Além deste parâmetro cinético, é possível avaliar a estabilidade do produto, ou seja, a extensão em que ele retém, dentro dos limites especificados e dentro do período de armazenagem e de uso, as mesmas propriedades e características que possuía na ocasião em que foi fabricado [8].

$$K(T) = A\, e^{-E/RT} \qquad \text{(equação 1)}$$

em que *A* representa o fator de freqüência (s^{-1}), *E* a energia de ativação (J mol^{-1}), *R* a constante geral dos gases (8,314 J mol^{-1} K^{-1}) e *T* a temperatura absoluta (K).

Neste estudo, as técnicas termoanalíticas (TG/DTG/DSC) foram utilizadas para avaliar o comportamento térmico e cinético (método isotérmico) do salbutamol em padrão e produto farmacêutico comercial. Estudos de interação do salbutamol com outros compostos tais como ciclodextrina [9], leucina [10], lactose [11],

polietilenoglicol [12] e utilizando técnicas termogravimétricas têm sido relatados na literatura.

Os experimentos termogravimétricos foram realizados em uma termobalança modelo TGA-50 e em uma célula calorimétrica modelo DSC-50, ambos da marca Shimadzu. Os cálculos isotérmicos foram efetuados para a primeira etapa de decomposição térmica do fármaco, utiizando um intervalo de 5% de variação de massa.

2. Resultados e Discussão

Para avaliar a decomposição térmica do salbutamol, as curvas TG/DTG foram obtidas na faixa de temperatura de 25 a 600 °C assim como as curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura compreendida entre 25 e 500 °C. Estes experimentos foram realizados em uma atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de 10 °C min^{-1}. A Figura 1 mostra as curvas de TG (a), DTG (b) e DSC (c) para o padrão de salbutamol.

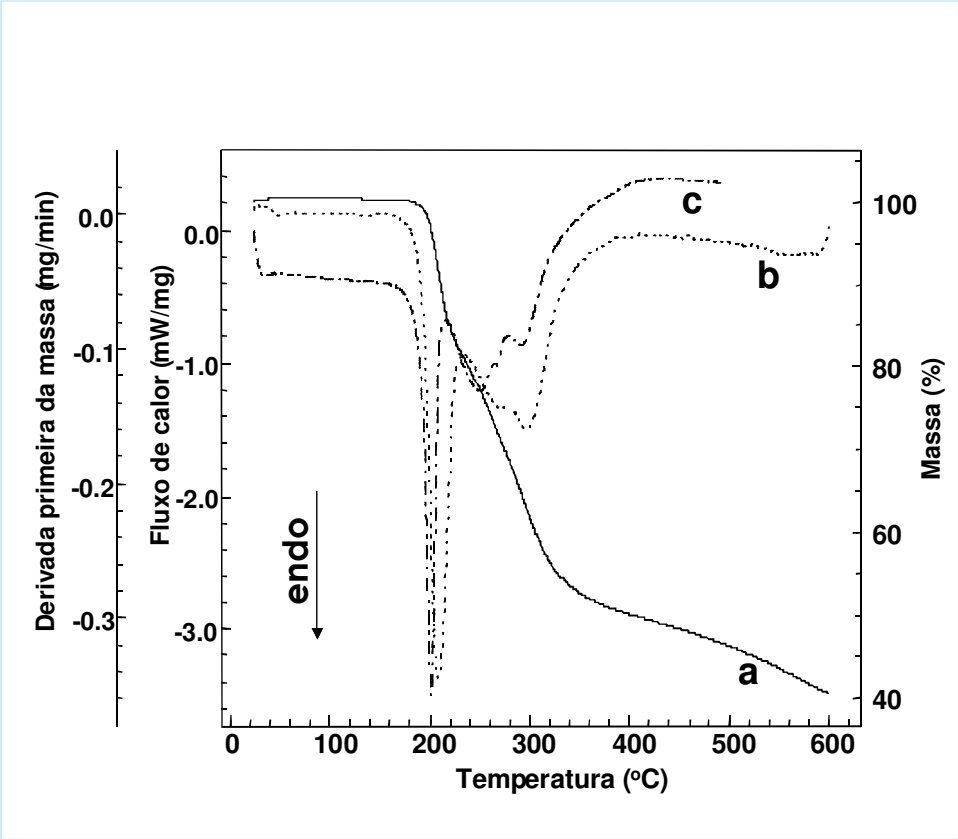


Figura 1 – Curvas termogravimétricas: TG (a), DTG (b) e DSC (c) do padrão de salbutamol em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de 10 °C min^{-1}.

A curva DSC da Figura 1 apresenta um evento endotérmico bem definido em 201 °C com uma variação de entalpia de 212 J g^{-1}, característico do processo de fusão do salbutamol, seguida da decomposição térmica do fármaco. Este processo também foi obervado por Larhrib e colaboradores [13] com temperatura de fusão igual a 200 °C. Nas curvas de TG/DTG observa-se um patamar em ~180 °C, indicando que até esta temperatura o padrão de salbutamol é termicamente estável. Entre 180 e 600 °C, verifica-se três sucessivas perdas de massa: a primeira ocorre em 204 °C e Δm_1 = 18% (correspondendo ao início da decomposição térmica do padrão), a segunda perda em 299 °C e Δm_2 = 3,7% (decomposição e carbonização do padrão) e a última em 580 °C e Δm_3 = 10,7% (referente à eliminação de material carbonáceo).

A Figura 2 ilustra as curvas de TG (a), DTG (b) e DSC (c) para a amostra farmacêutica comercial, contendo salbutamol e outras substâncias tais como lactose,

amido de milho e estearato de magnésio, nas mesmas condições experimentais do padrão (Figura 1).

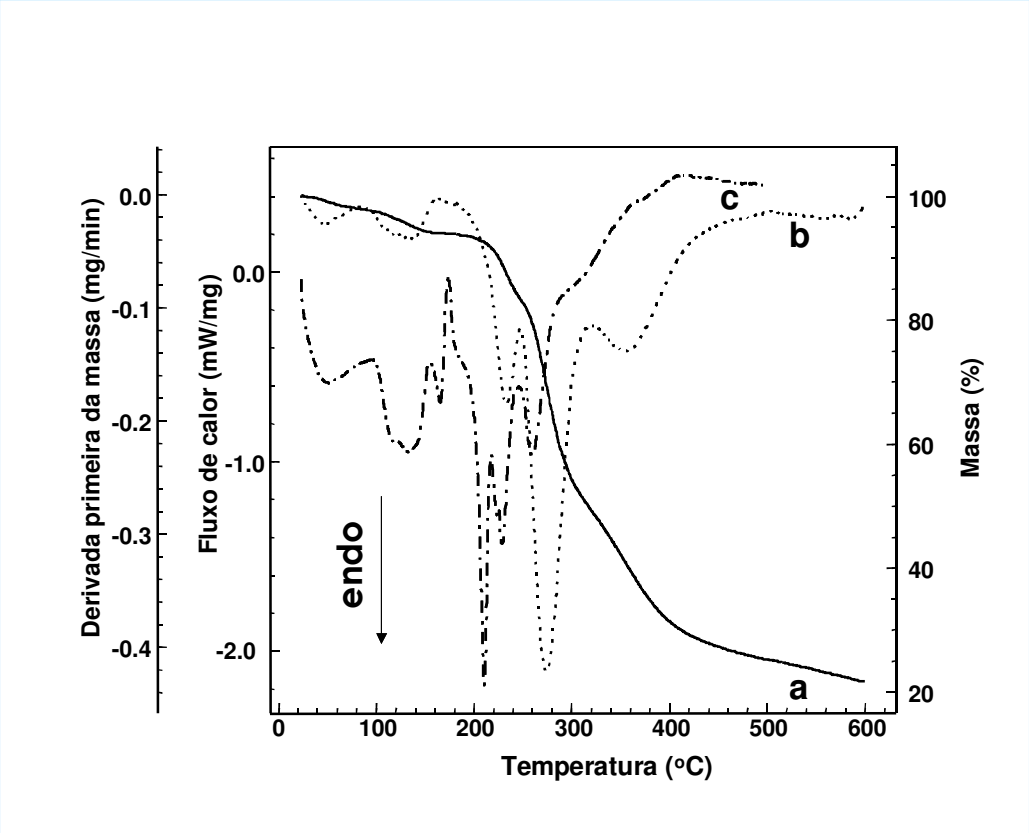


Figura 2 – Curvas termogravimétricas: TG (a), DTG (b) e DSC (c) da amostra farmacêutica de salbutamol em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de 10 °C min^{-1}.

A curva DSC mostra dois eventos endotérmicos, com temperaturas de pico de 53 e 133 °C, caracterizados pela desidratação do estearato de magnésio. Além disso, um terceiro evento endotérmico é observado em 165 °C, correspondendo à desidratação da lactose. O evento exotérmico observado em 174 °C refere-se à transição cristalina da lactose, passando da forma α para a forma β. Após este evento, verifica-se um pico endotérmico em 211 °C caracterizado pela fusão da lactose que estabiliza a decomposição do salbutamol e dos demais excipientes. Após este evento, a decomposição térmica da amostra comercial ocorre lentamente devido à carbonização e eliminação gradativa de material carbonáceo (a partir de

350 °C). Os comportamentos da lactose e do estearato aqui descritos foram também constatados por Araújo [14] em estudos termoanalíticos realizados nas mesmas condições experimentais.

A partir das curvas de TG/DTG (Figura 2), verifica-se cinco etapas de perda de massa em diferentes temperaturas para o produto de formulação farmacêutico comercial. As primeiras perdas, em 46 °C com Δm_1 = 3,3% e 139 °C com Δm_2 = 4,0%, referem-se à desidratação do produto. As demais etapas, em 234 °C (Δm_3 = 8,9%), 276 °C (Δm_4 = 31,3%) e 355 °C (Δm_5 = 27,4%), correspondem à decomposição térmica, carbonização e eliminação do material carbonáceo da amostra.

Comparando-se as curvas TG/DTG do padrão e amostra comercial de salbutamol, verifica-se que o evento relacionado com a decomposição térmica apresentou um deslocamento para temperaturas mais altas (de 204 para 276 °C). Este comportamento mostra uma forte interação do fármaco com os excipientes em virtude do programa de aquecimento utilizado neste estudo.

Para obter um dos parâmetros cinéticos do salbutamol (E_a) no modo isotérmico, as curvas termogravimétricas foram obtidas nas faixas de temperatura de 150 a 180 °C e 180 a 200 °C para o padrão (Figura 3a) e amostra comercial (Figura 3b), respectivamente, com razão de aquecimento de 5 °C min^{-1} e atmosfera dinâmica de ar (50 mL min^{-1}).

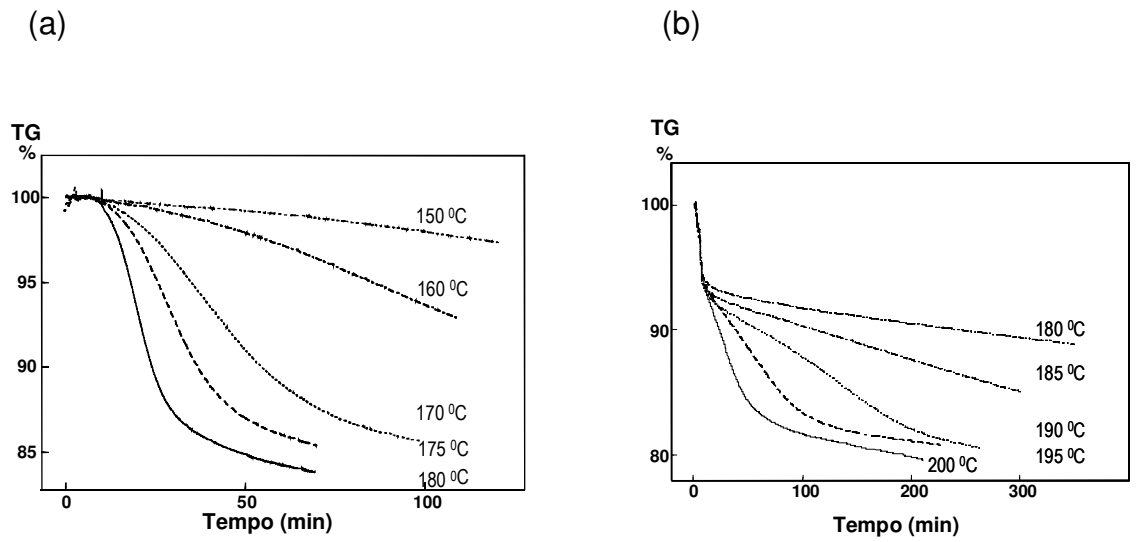


Figura 3 – Curvas isotérmicas de salbutamol em diferentes temperaturas: (a) padrão: 150, 160, 170, 175 e 180 °C e (b) amostra: 180, 185, 190, 195 e 200 °C. Atmosfera de ar (50 mL min^{-1}).

A partir das curvas isotérmicas foi possível obter os gráficos de ln t (min) *vs* 1/T (K^{-1}) para padrão (Figura 4a) e produto farmacêutico comercial (Figura 4b), considerando uma perda de massa de 5%. A energia de ativação E_a foi definida multiplicando-se a constante geral dos gases *R* (8,314 J mol^{-1} K^{-1}) pelos coeficientes angulares oriundos das equações das retas (Figura 4). Através dos gráficos ln t *vs* 1/T tem-se a determinação da estabilidade do salbutamol, ou seja, a velocidade em que a degradação do fármaco ocorre em uma formulação.

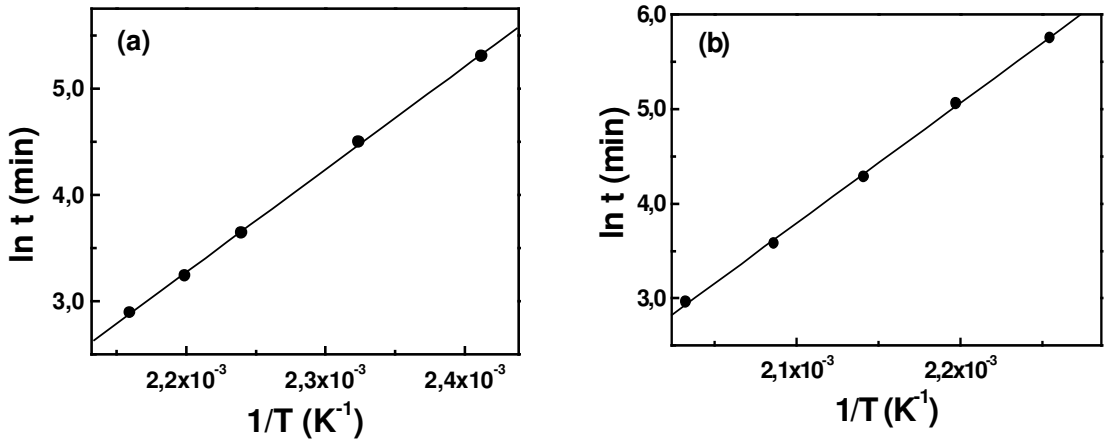


Figura 4 – Gráficos ln t *vs* 1/T utilizando os dados das isotermas para 5% de perda de massa: (a) padrão e (b) amostra de salbutamol.

Para o padrão de salbutamol a equação correspondente é *ln t = 15601,6(1/T) – 31,6*, com r = 0,999, e para a amostra farmacêutica tem-se a equação *ln t = 30265,8(1/T) – 61,0*, com r = 0,999. Os valores de E_a calculados foram de 130 e 252 kJ mol^{-1} para padrão e amostra de salbutamol, respectivamente. Considerando a temperatura ambiente (T = 25 °C) e os gráficos da Figura 4, o salbutamol permanece estável termicamente durante 2000 anos (somente o princípio ativo) e por mais de 10000 anos em formulações farmacêuticas. Estes resultados evidenciam mais uma vez que os excipientes, presentes nas amostras utilizadas neste estudo, dificultam a degradação e aumentam a estabilidade do fármaco.

3. Conclusões

O estudo do comportamento térmico do salbutamol mostrou que a presença de outros compostos nos produtos farmacêuticos comerciais altera o perfil de decomposição térmica do fármaco. Conseqüentemente, há um aumento na estabilidade térmica do medicamento constatado pela necessidade de tempos

maiores para o processo de decomposição realizado no modo isotérmico (Figuras 3 e 4). Alem disso, os valores diferentes de energia de ativação obtidos para o padrão e amostra comercial de salbutamol (130 e 252 kJ mol^{-1}, respectivamente) mostraram que a presença de excipientes na formulação do medicamento pode alterar parâmetros cinéticos de um fármaco.

A aplicação das técnicas termoanalíticas tem se mostrado como uma importante ferramenta na área farmacêutica, principamente no estudo de estabilidade e prazo de validade dos produtos. Uma vez que os experimentos termogravimétricos são realizados em tempos relativamente curtos (em torno de seis horas), eles se sobressaem das metodologias padrões propostas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária [15], desenvolvidas durante seis meses (estudo de estabilidade acelerada) ou em até doze meses (estudo de estabilidade a longo prazo). Um artigo científico descrevendo em detalhes este estudo foi publicado no periódico Journal of Thermal Analysis and Calorimetry [16].

4. Referências Bibliográficas

[1] Ozawa, T., Thermal analysis – review and prospect. *Termochim. Acta* **2000**, 355, (1-2), 35-42.

[2] Dollimore, D.; Phang, P., Thermal Analysis. *Anal. Chem.* **2000**, 72, (12), 27-36.

[3] Araújo, A.A.S., Storpirtis, S.; Mercuri, L.P.; Carvalho, F.M.S. dos Santos, M.; Matos, J.R., Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. *Int. J. Pharm.* **2003**, 260, (2), 303-314.

[4] Vora, A.; Riga, A.; Dollimore, D.; Alexander, K., Thermal stability of folic acid in the solid-state. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2004**, 75, (3), 709-717.

[5] Cheng, Y.; Huang, Y.; Alexander, K.; Dollimore, D., A thermal analysis study of methyl salicylate. *Thermochim. Acta* **2001**, 367, 23-28.

[6] Cheng, Y.; Huang, Y.; Alexander, K.; Dollimore, D., The thermal analysis study of the drug captopril. *Thermochim. Acta* **2001**, 367, 43-58.

[7] Burnham, L.; Dollimore, D.; Alexander, K.S, Kinetic study of the drug acetazolamide using thermogravimetry. *Thermochim. Acta* **2002**, 392, 127-133.

[8] Prista, L.N.; Alves, A.C.; Morgado, R.M.R., Técnica farmacêutica e farmácia galênica. 4 ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1992, p. 659-799.

[9] Marques, H.M.C.; Hadgraft, J.; Kellaway, I.W., Studies of cyclodextrin inclusion complexes. Part I: Salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. *Int. J. Pharm.* **1996**, 63, (3), 259-266.

[10] Raula, J.; Thielmann, F.; Kansikas, J.; Hietala, S.; Annala, M.; Seppala, J.; Lahde, A.; Kauppinen, E.I., Investigations on the humidity-induced transformations of salbutamol sulphate particles coated with l-leucine. *Pharm. Research.* **2008**, 25, (10), 2250-2261.

[11] Larhrib, H.; Zeng, X.M.; Martin, G.P.; Marriott, C.; Pritchard, J., The use of different grades of lactose as a carrier for aerosolised salbutamol sulphate. *Int. J. Pharm.* **1999**, 191, (1), 1-14.

[12] Corrigan, D.O.; Corrigan, O.I.; Healy, A.M., Predicting the physical state of spray dried composites: salbutamol sulphate/lactose and salbutamol sulphate/polyethylene glycol co-spray dried systems. *Int. J. Pharm.* **2004**, 273, (1-2), 171-182.

[13] Larhrib, H.; X.M.; Martin, G.P.; Marriott, C.; Prime D., The influence of carrier and drug morphology on drug delivery from dry powder formulations. *Int. J. Pharm.* **2003**, 257, (1-2), 283-296.

[14] Araújo, A.A.S., *Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina (AZT).* Tese de doutorado **2003**, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

[15]ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2007/iels.abr.07/iels70/u_in-anvs-4_110407.pdf, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Instrução Normativa n° 4, de 11 de abril de 2007, acesso em 18/02/09.

[16] Felix, F.S.; da Silva, L.C.C.; Angnes, L.; Matos, J.R., Thermal behavior study and decomposition kinetics of salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions. *J. Therm. Anal. Calor.* **2009**, 95, (3), 877-880.

CURRICULUM VITAE

Fabiana da Silva Felix
e-mail: ffelix@iq.usp.br

Doutoranda em Química Analítica pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP) – desde 06/2004.
Mestre em Química Analítica pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP) – 2004. Título da dissertação: Avaliação Ambiental de Exposição a Fumos Metálicos em Fundições.
Graduada em Química com Atribuições Tecnológicas e Licenciatura pela Universidade Presbiteriana Mackenzie – 2001.
Graduada em Processos de Produção pela Faculdade de Tecnologia de São Paulo (FATEC) – 1995.

Experiência Profissional

Colégio Apollo – desde 2007: professora de química para o supletivo.
Colégio Heitor Garcia – 2008: professora de química para o ensino médio.
Instituto de Química da Universidade de São Paulo – 2006 e 2007: monitora da 1ª e 2ª Escola de Eletroquímica.
Instituto de Química da Universidade de São Paulo – 2003: monitora das disciplinas Química Analítica e Química Analítica Qualitativa.

Publicações

1. Felix, F.S.; da Silva, L.C.C.; Angnes, L.; Matos, J.R., Thermal behavior study and decomposition kinetics of salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions. *J. Therm. Anal. Calor.* **2009**, 95, (3), 877-880.
2. Felix, F.S.; Brett, C.M.A.; Angnes, L., Flow injetion analysis using carbon film resistor electrodes for amperometric determination of ambroxol. *Talanta* **2008**, 76, (1), 128-133.
3. Felix, F.S.; Brett, C.M.A.; Angnes, L., Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 43, (5), 1622-1627.
4. Munoz, R.A.A.,; Felix, F.S.; Augelli, M.A.; Pavesi, T.; Angnes, L., Fast ultrasound-assisted treatment of urine for chronopotentiomtric stripping determination of mercury at gold film electrodes. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 571, (1), 93-98.

5. Felix F.S.; Quintino, M.S.M.; Carvalho, A.Z.; Coelho, L.H.G.; do Lago, C.L.; Angnes, L., Determination of salbutamol in syrups by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-C^4D). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 40, (5), 1288-1292.
6. Felix, F.S.; Yamashita, M.; Angnes, L., Epinephrine quantification in pharmaceutical formulations utilizing plant tissue biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, (12), 2283-2289.
7. Felix, F.S.; Maciel, J.M.; Brett, C.M.A.; Angnes, L., Estudos eleroquímicos de praquat utilizando eletrodos de filme de carbono. Aplicação à análise de águas. *Tecno-lógica Santa Cruz do Sul* **2006**, 10, (2), 09-22.
8. Felix, F.S.; Lichtig, J.; dos Santos, L.B.O.; Masini, J.C., Determination of Cd, Pb and Ni by square wave stripping voltammetry in particulate matter collected in workplace atmosphere of some brazilian industrial foundries. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, (4), 801-807.
9. Felix, F.S.; de Barros, R.C.M.; Lichtig, J.; Masini, J.C., Determinação de manganês em material particulado atmosférico de ambientes de trabalho utilizando eletrodo de diamante dopado com boro e voltametria de onda quadrada com redissolução catódica. *Quim Nova* **2005**, 28, (6), 1000-1005.

Congressos

1. Felix, F.S.; Coelho, L.H.G.; Gutz, I.G.R.; Angnes, L., *Determinação de bromexina e ambroxol em amostras farmacêuticas e biológicas utilizando eletroforese capilar (CE-C^4D).* 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo, 2008.
2. Felix, F.S.; Coelho, L.H.G.; Gutz, I.G.R.; Angnes, L., *Determinação de ambroxol em amostras farmacêuticas e biológicas utilizando eletroforese capilar (CE-C^4D).* 14º Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa, Paraíba, 2007.
3. Felix F.S.; Valdman, E.; Gutz, I.G.R.; Angnes, L., *Métodos alternativos e sua intercomparação na quantificação de ácido salicílico em cosméticos.* 14º Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa, Paraíba, 2007.
4. Sanchez, M.A.; Felix, F.S.; Rocha, F.R.P., *Desenvolvimento de um procedimento analítico para a determinação de salbutamol em sistemas FIA empregando quimiluminescência em guia de ondas.* 14º Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa, Paraíba, 2007.
5. Felix, F.S.; Angnes, L., *Rapid quantification of salicylic acid in cosmetic products by FIA-amperometry.* 14th International Conference on Flow Injection Analysis, Berlin, Alemanha, 2007.
6. Felix, F.S.; Brett, C.M.A.; Angnes, L., *Determinação amperométrica de ambroxol em formulações farmacêuticas empregando resistor de carbono como eletrodo de trabalho.* XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. Águas de Lindóia, São Paulo, 2007.

7. Felix, F.S.; Daniel, D.; Gutz, I.G.R.; Angnes, L., *Determinação voltamétrica da loratadina em fármacos utilizando eletrodo de mercúrio HMDE.* XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. Águas de Lindóia, São Paulo, 2007.

8. Penteado, J.C.; Felix, F.S.; Santos, M.A.; Masini, J.C., *Determination of secondary alcohols and metals in artisanal brazilian sugar cane spirits.* VI Brazilian Meeting on Chemistry of Food an Beverages, São José do Rio Preto, São Paulo, 2006.

9. Felix, F.S.; Brett, C.M.A.; Angnes, L.*, Flow injection analysis utilizing carbon film resistor electrodes for amperometric quantification of acetaminophen.* X International Conference on Flow Analysis, Cidade do Porto, Portugal, 2006.

10. Felix, F.S.; Brett, C.M.A.; Angnes, L., *Determinação de aspirina em produtos farmacêuticos usando resistor de carbono como eletrodo de trabalho.* XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Londrina, Paraná, 2005.

11. Felix, F.S.; Yamashita, M.; Angnes, L., *Epinephrine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with vegetable tissues.* XVIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society of Electrochemistry and 3rd Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry. Coimbra, Portugal, 2005.

12. Felix, F.S.; Quintino, M.S.M.; Carvalho,A.Z.; Coelho, L.H.G.; do Lago, C.L.; Angnes, L., *Determinação de salbutamol em xaropes utilizando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato.* 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Minas Gerais, 2005.

13. Felix, F.S.; da Silva, L.C.C.; Angnes, L.; Matos, J.R., *Aplicação da técnica termogravimétrica no estudo cinético isotérmico do salbutamol.* 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Minas Gerais, 2005.

14. Felix, F.S.; dos Santos, L.B.O.; Bruns, R.E.; Masini, J.C., *Aplicações da análise multivariada para as determinações de atrazina, cádmio e chumbo empregando voltametria de onda quadrada (SWV).* XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Teresópolis, Rio de Janeiro, 2004.

15. Felix, F.S.; Masini, J.C.; Ferreira, N.G.; Lichtig, J., *Determinação voltamétrica de manganês em amostras ambientais utilizando eletrodo de diamante dopado com boro.* XXVI Congresso Latinoamericano de Química e 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Salvador, Bahia, 2004.

16. Felix, F.S.; Masini, J.C.; da Silva, C.S.; Lichtig, J., *Avaliação ambiental de exposição a fumos metálicos em fundições.* XXVI Congresso Latinoamericano de Química e 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Salvador, Bahia, 2004.