

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

BRUNA CLÁUDIA LOURENÇÃO

***Determinação voltamétrica simultânea de
paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína
em formulações farmacêuticas empregando um
eletrodo de diamante dopado com boro***

São Carlos

2009

BRUNA CLÁUDIA LOURENÇÃO

Determinação voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado com boro.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

São Carlos

2009

Dedico este trabalho,

Dedico este trabalho à minha família, meus pais Valmir e Cirene; minhas irmãs Juliana e Daniela e a minha avó Catarina, que sempre estiveram ao meu lado dando significado a tudo que realizei.

AGRADEÇO,

A Deus por me dar força e estar sempre ao meu lado e me ajudar a superar todos os momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pela orientação, amizade, incentivo, paciência, e por toda a contribuição no meu aprendizado e crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Romeu Cardozo Rocha Filho que nos cedeu o filme de diamante dopado e também nos ajudou no desenvolvimento e discussões de todo o trabalho.

Ao Professor Luiz Henrique Mazo pela disposição na discussão do nosso trabalho.

À Roberta, pela enorme colaboração em todo trabalho, amizade e paciência.

Ao Giancarlo R. Salazar-Banda e ao João Tiengo pela construção do eletrodo de diamante dopado com boro.

À Dra. Djeneine De Souza pela disponibilidade na discussão do trabalho.

Às amigas de república, Juliana, Yolanda e Flávia. A Juliana pelos 7 anos me agüentando e sendo minha “mãezona” em São Carlos, a Yolanda pelas terapias gratuitas e a Flávia por sempre ter uma nova história para contar. Obrigada pelo convívio sempre alegre e agradável de todas e por me fazerem rir muito.

Às amigas que fiz durante estes anos em São Carlos Angélica e Maiara, obrigada por me agüentarem e me darem força sempre

À Claudia, pela amizade, pelo exemplo de força de vontade, superação e alegria.

Aos outros três membros do quarteto fantástico, Ana Eliza, Luana (portuga) e Kelly, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, e também por me fazerem rir muito.

Ao amigo “irmão” Geiser, pela amizade, força e por toda paciência principalmente com a ajuda quando o computador ou especificamente o Origin® me dava um “baile”.

Às amigas de São Manuel Simone, Dileiny, Milena e Celisa que mesmo distantes estiveram sempre me apoiando e me dando forças.

Aos amigos do R.U de cada dia, Cyber, Avaré, Humberto, Bruno e Geiser.

Aos amigos do LABBES: Heloizy, Garça, Lilo, Maria Fernanda, Osmundo, Elen, Willian, Vagner, que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

Aos amigos do LABIE.

Aos amigos Bá e Tirador, pela amizade, carinho e toda atenção sempre.

Às secretárias, Andréia e Silvia por toda atenção.

Ao IQSC, pela excelente infra-estrutura oferecida.

A todos os meus familiares, avós, tios, primas, que mesmo estando distantes sempre me deram carinho e apoio.

Ao médico José Ricardo G. Toloí, por todo profissionalismo.

Ao médico Mauro dos Santos Volpi, por ter colocado minha coluna cervical no lugar.

Aos órgãos de fomento: CAPES, CNPq, e principalmente à FAPESP pela bolsa concedida (processo nº 2007/05894-9)

*De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos começando,
A certeza de que é preciso continuar e
A certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo,
Fazer da queda um passo de dança,
Do medo uma escola,
Do sonho uma ponte,
Da procura um encontro,
E assim terá valido a pena existir!*

Fernando Sabino

RESUMO

LOURENÇÃO, B. C. **Determinação voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado com boro.** 2009. 137f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de paracetamol, ácido ascórbico (AA) e cafeína em formulações farmacêuticas utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) e voltametria de pulso diferencial (DPV). Inicialmente, foram obtidos os voltamogramas cíclicos para o paracetamol, AA e cafeína separadamente sendo os potenciais de pico anódicos de oxidação de cada um destes analitos iguais a 0,80 V, 0,92 V e 1,47 V, respectivamente. O efeito do pré-tratamento eletroquímico do eletrodo de BDD nas medidas voltamétricas foi também objeto de estudo. Os parâmetros da voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial também foram estudados e otimizados para cada analito. No primeiro procedimento desenvolvido, determinou-se simultaneamente paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas utilizando o eletrodo de BDD e voltametria de pulso diferencial após a otimização das condições experimentais. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de paracetamol e cafeína de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com limite de detecção igual a $4,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para paracetamol e $3,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para cafeína. O desvio padrão relativo do paracetamol e da cafeína para a repetibilidade intra-dias foi de 0,7 % e 0,2% respectivamente e para a repetibilidade inter-dias foi de 5,1% e 1,4% respectivamente. A quantificação de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas utilizando um eletrodo de BDD apresentaram resultados concordantes com os resultados obtidos empregando-se um método cromatográfico em um nível de confiança de 95%. Na seqüência, um segundo procedimento foi desenvolvido para a determinação simultânea de AA e cafeína em formulações farmacêuticas utilizando o eletrodo de BDD e voltametria de pulso diferencial, após a otimização das condições experimentais. A curva analítica foi linear num intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para AA e de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para cafeína com limites de detecção de $2,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para AA e $2,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para cafeína. O desvio padrão relativo do AA e da cafeína para a repetibilidade intra-dias foi de 0,5% e 0,2% respectivamente e para a repetibilidade inter-dias foi de 5,9% e 8,7% respectivamente. A quantificação de AA e cafeína em formulações farmacêuticas utilizando um eletrodo de BDD apresentaram resultados concordantes com os resultados obtidos empregando-se um método cromatográfico em um nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: Eletrodo de diamante dopado com boro. Paracetamol. Ácido ascórbico. Cafeína.

ABSTRACT

LOURENÇÃO, B. C. **Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine and ascorbic acid and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron doped diamond electrode.** 2009. 137f. Dissertation (Masters) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

In this study the development of electroanalytical procedures for paracetamol, ascorbic acid (AA) and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron doped diamond (BDD) and differential pulse voltammetry (DPV) is described. Initially, the cyclic voltammograms of paracetamol, AA and caffeine were separately obtained with the potentials of anodic peaks of oxidation of each one of these analytes equals to 0.80 V, 0.92 V and 1.47 V, respectively. The effect of electrochemical pre-treatment of the BDD electrode in voltammetric measurements was the purpose of this study, as well. The parameters of square wave voltammetry and differential pulse voltammetry were also studied and optimized for each analyte. In the first developed procedure, it was determined both paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using the BDD electrode and differential pulse voltammetry after optimization of experimental conditions. The analytical curves were linear in the paracetamol and caffeine concentration intervals, ranging from 5.0×10^{-7} mol L⁻¹ to 8.3×10^{-5} mol L⁻¹ with detection limit equal to 4.9×10^{-7} mol L⁻¹ for paracetamol and 3.5×10^{-8} mol L⁻¹ for caffeine. The relative standard deviation of paracetamol and caffeine for the intra-day repeatability was 0.7% and 0.2% respectively, and the inter-day repeatability was 5.1% and 1.4% respectively. The quantification of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a BDD electrode showed results in agreement with those results obtained using a chromatographic method at a 95% confidence level. Subsequently, a second procedure was developed for the simultaneous determination of AA and caffeine in pharmaceutical formulations using the BDD electrode and differential pulse voltammetry, after optimization of experimental conditions. The analytical curves were linear in the concentrations ranging from 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ to 1.9×10^{-4} mol L⁻¹ for AA and 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ to 1.0×10^{-4} mol L⁻¹ for caffeine with detection limits of 2.6×10^{-7} mol L⁻¹ for AA and 2.4×10^{-8} mol L⁻¹ for caffeine. The relative standard deviation of AA and caffeine for the intra-day repeatability was 0.5% and 0.2% respectively, and the inter-day repeatability was 5.9% and 8.7% respectively. Quantification of AA and caffeine in pharmaceutical formulations using a BDD electrode showed results in accordance with the results obtained using a chromatographic method at a 95% confidence level.

Keywords: Boron doped diamond eletrodo. Paracetamol. Ascorbic acid. Caffeine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. PARACETAMOL	17
1.1.1 Mecanismo de oxidação do paracetamol	19
1.1.2 Método recomendado pela Farmacopéia Americana para a determinação do paracetamol.....	20
1.1.3 Métodos para a determinação de paracetamol	21
1.2. ÁCIDO ASCÓRBICO.....	23
1.2.1 Oxidação do AA.....	26
1.2.2 Método oficial da Farmacopéia Brasileira para a determinação de AA	27
1.2.3 Métodos para a determinação de AA	27
1.3. CAFEÍNA.....	29
1.3.1 Mecanismo de oxidação da cafeína.....	32
1.3.2 Método oficial para a determinação de cafeína.....	33
1.3.3 Métodos para a determinação de cafeína.....	33
1.4. DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS DOS ANALITOS	35
1.5. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	42
1.5.1 Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD).....	42
1.5.2 Técnicas Eletroquímicas.....	46
1.5.2.1 Voltametria cíclica ^{140,142}	47
1.5.2.3 Voltametria de pulso diferencial ^{140,142}	48
1.5.2.2 Voltametria de onda quadrada (SWV) ^{142,143}	50
1.6. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....	52
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	54
2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	54
2.2. AMOSTRAS ANALISADAS	55
2.2.1. Preparação das amostras para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína	55
2.2.1.1. Fármacos (A, B, C,D)	55
2.2.2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AA E CAFEÍNA.....	56
2.2.2.1. Fármacos (E, F, G).....	56
2.3. INSTRUMENTAÇÃO	56
2.3.1. Medidas eletroanalíticas.....	56
2.3.2. Célula eletroquímica	57
2.4. METODOLOGIA.....	58
2.4.1. Voltametria cíclica (CV), de onda quadrada (SWV) e de pulso diferencial (DPV).....	58
2.4.2. Estudo de interferentes.....	58
2.4.2.1 Paracetamol e cafeína	58
2.4.2.2 AA e cafeína.....	59
2.4.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	59
2.5. O ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (BDD).....	60
2.5.1. Tratamento do eletrodo de BDD	60
2.5.2. Estudo da área ativa do eletrodo de BDD	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.1. O ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (BDD).....	63
3.1.1. Tratamento do eletrodo de BDD	63
3.1.2. Determinação da área ativa do eletrodo.....	64
3.2. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ELETROQUÍMICA DO PARACETAMOL SOBRE O ELETRODO DE BDD.....	66

3.2.1. Voltametria cíclica	66
3.2.1.1. Estudo do efeito do meio	69
3.2.2. Voltametria de onda quadrada (SWV).....	70
3.2.2.1. Construção da curva analítica	73
3.2.3. Voltametria de pulso diferencial.....	74
3.2.3.1. Construção da curva analítica	75
3.2.4. Comparação das técnicas de SWV e DPV na determinação de paracetamol	76
3.3. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ELETROQUÍMICA DA CAFEÍNA SOBRE O ELETRODO DE BDD.....	77
3.3.1. Voltametria cíclica	77
3.3.1.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte	80
3.3.2. Voltametria de onda quadrada.....	81
3.3.2.1. Construção da curva analítica	84
3.3.3. Voltametria de pulso diferencial.....	85
3.3.3.1. Construção da curva analítica	86
3.3.4. Comparação da técnica de SWV e DPV na determinação de cafeína.....	87
3.4. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ELETROQUÍMICA DO AA SOBRE O ELETRODO DE BDD.....	87
3.4.1. Voltametria cíclica.....	88
3.4.1.1. Estudo do efeito do meio	90
3.4.2. Voltametria de onda quadrada.....	91
3.4.2.1. Construção da curva analítica	95
3.4.3. Voltametria de pulso diferencial.....	96
3.4.3.1. Construção da curva analítica	96
3.4.4. Comparação da técnica de SWV e DPV na determinação de AA	97
3.5. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DO PARACETAMOL E DA CAFEÍNA.....	98
3.5.1. Comparação da determinação do paracetamol e da cafeína com o eletrodo de BDD e carbono vítreo (CG)	98
3.5.2. Determinação simultânea de paracetamol e cafeína com eletrodo de BDD	99
3.5.2.1. Estudo de interferentes em potencial e testes de adição e recuperação	104
3.5.2.2. Aplicação do método voltamétrico na determinação de amostras comerciais	105
3.6. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E CAFEÍNA	108
3.6.1. Comparação da determinação do AA e da cafeína com o eletrodo de BDD e carbono vítreo (CG).	108
3.6.2. Determinação simultânea de AA e cafeína com eletrodo de BDD	109
3.6.2.1. Estudo de interferentes em potencial e testes de adição e recuperação	113
3.6.2.2. Aplicação do método voltamétrico na determinação de amostras comerciais com do procedimento analítico proposto	114
4. CONCLUSÕES	121
PROPOSTAS FUTURAS.....	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura química do paracetamol.....	18
Figura 1.2. Mecanismo proposto de oxidação eletroquímica do paracetamol.....	20
Figura 1.3. Fórmula estrutural do AA.....	23
Figura 1.4 Mecanismo de oxidação do AA.....	27
Figura 1.5. Estrutura química das metilxantinas.....	30
Figura 1.6 Mecanismo proposto para a oxidação da cafeína.....	33
Figura 1.7. (A) Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica. (B) Voltamograma cíclico para um sistema reversível.....	47
Figura 1.8 Representação esquemática da aplicação de potencial em voltametria de pulso diferencial, onde S_1 e S_2 são as correntes e a diferença entre elas é registrada.....	49
Figura 1.9 Voltamograma de pulso diferencial.....	49
Figura 1.10 Forma de aplicação de potencial na voltametria de onda quadrada.....	51
Figura 1.11 Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (A) e para um sistema totalmente irreversível (B).....	51
Figura 2.1 Foto do eletrodo de BDD.....	57
Figura 3.1 Voltamogramas de onda quadrada do (A) paracetamol $9,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (B) cafeína $9,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (C) AA $9,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o BDD com pré-tratamento catódico e anódico. ($f= 70 \text{ s}^{-1}$, $a= 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 4\text{mV}$).....	64
Figura 3.2 Voltamograma cíclico obtido para o paracetamol em solução de tampão acetato pH 4,5 e velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	67
Figura 3.3 (A) Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (10, 30, 50, 70, 90, 120, e 150 mV/s) para o paracetamol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato pH 4,5. (B) Variação da intensidade de corrente de pico com a velocidade de varredura na presença de paracetamol.....	68
Figura 3.4 Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o paracetamol em tampão acetato pH 4,5.....	68
Figura 3.5 Voltamogramas cíclicos para a oxidação de paracetamol $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	69

Figura 3.6 Voltamogramas de onda quadrada do paracetamol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5 ($f = 70 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).	71
Figura 3.7 Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da frequência de onda quadrada para a oxidação do paracetamol, $R^2 = 0,9915$	72
Figura 3.8 (A) Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de (A) paracetamol ((1 a 15): $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,12 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH=4,5. ($f = 70 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 50$, $\Delta E_s = 4$). (B) Curva analítica para o paracetamol obtida empregando o eletrodo de BDD e SWV.	74
Figura 3.9 (A) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de paracetamol (1 a 16: $6,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH=4,5 ($t = 7 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 100 \text{ mV}$; $v = 70 \text{ mV s}^{-1}$). (B) Curva analítica do paracetamol sob o eletrodo de BDD por DPV.	76
Figura 3.10 Voltamograma cíclico obtido para a cafeína em solução de tampão acetato pH 4,5 e velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	78
Figura 3.11 Variação da intensidade de corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de cafeína $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato pH 4,5.	79
Figura 3.12 Dependência do logaritmo da intensidade de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para a cafeína em tampão acetato pH 4,5. ...	79
Figura 3.13 Voltamogramas cíclicos para a oxidação de cafeína $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte e velocidade de varredura de 50 mVs^{-1}	80
Figura 3.14 Voltamogramas de onda quadrada da cafeína $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5 ($f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).	81
Figura 3.15 (A) Voltamogramas de onda quadrada para a cafeína em diferentes frequências de aplicação dos pulsos de potenciais, 10, 30, 50, 70, 100, 150, 180, 210 s^{-1} , usando-se $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, cafeína $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,45. (B) Corrente de pico em função da frequência de onda quadrada para a cafeína.	83
Figura 3.16 (A) Voltamogramas de onda quadrada (SWV) em diferentes concentrações de cafeína (1 a 17: $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,86 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH=4,5. ($f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$) (B) Curva analítica para cafeína empregando-se o eletrodo de BDD.	85
Figura 3.17 (A) Voltamogramas de pulso diferencial (DPV) em diferentes concentrações de cafeína (1 a 14: $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $9,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH=4,5 ($t = 7 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 100 \text{ mV}$; $v = 70 \text{ mV s}^{-1}$). (B) Curva analítica para cafeína empregando-se o eletrodo de BDD.	86

Figura 3.18 Voltamograma cíclico obtido para o AA $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	88
Figura 3.19 Variação da intensidade de corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de AA $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	89
Figura 3.20 Dependência do logaritmo da intensidade de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o AA.....	89
Figura 3.21 Voltamogramas cíclicos para a oxidação de AA $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	90
Figura 3.22 (A) Voltamogramas de onda quadrada de AA $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico ($f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$), (B) Voltamogramas de onda quadrada de AA $9,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).....	92
Figura 3.23 Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da frequência de onda quadrada para a oxidação do AA.....	93
Figura 3.24 (A) Voltamogramas de onda quadrada para o AA em diferentes amplitudes de pulso de potencial, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, e 90 mV, usando-se $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, paracetamol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. (B) Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude de pulso de potencial para o AA.....	94
Figura 3.25 (A) Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de (A) AA (1 a 13: $3,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,31 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, ($f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$). (B) Curva analítica do AA sob o eletrodo de BDD por SWV.....	95
Figura 3.26 (A) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de AA (1 a 13: $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,31 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, ($t = 15 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 100 \text{ mV}$; $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$). (B) Curva analítica do AA sob o eletrodo de BDD por DPV.....	97
Figura 3.27 Voltamogramas de pulso diferencial para paracetamol $9,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e cafeína $9,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (tampão acetato pH 4,5) em (a) eletrodo de CG e em (b) eletrodo de BDD.....	99
Figura 3.28 Voltamograma de pulso diferencial obtido para o paracetamol e para a cafeína simultaneamente nas concentrações $4,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5. ($t = 7 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 100 \text{ mV}$; $v = 70 \text{ mV s}^{-1}$).....	100
Figura 3.29 (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o paracetamol em diferentes concentrações (1 a 16: $5,89 \times 10^{-7}$ a $1,64 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), mantendo	

constante a cafeína $1,77 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a cafeína em diferentes concentrações (1 a 13: $8,00 \times 10^{-7}$ a $1,61 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), mantendo a concentração de paracetamol constante ($3,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).
..... 101

Figura 3.30 Voltamogramas de pulso diferencial para o paracetamol e para a cafeína em diferentes concentrações em tampão acetato pH 4,5. Concentrações de paracetamol e cafeína (1 a 15): $5,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $8,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($t = 7 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 100\text{mV}$; $v = 70 \text{ mV s}^{-1}$)..... 102

Figura 3.31 Curva analítica obtida para o (A) paracetamol e para a (B) cafeína empregando DPV. Condições experimentais iguais as da Figura 3.30..... 103

Figura 3.32 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas (produto comercial D): (1) amostra D ; (2) amostra D + $9,80 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (3) amostra D + $1,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; amostra D + $2,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; amostra D + $3,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.
..... 105

Figura 3.33 Cromatograma típico do paracetamol ($t = 4,97 \text{ min}$) e da cafeína ($t = 5,29 \text{ min}$) $\lambda = 273\text{nm}$, fase móvel acetonitrila/água (25:75 v/v) $\text{pH}_{\text{cond}} = 2,5$, com vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ 106

Figura 3.34 Curva analítica obtida para o paracetamol (A) e para (B) cafeína empregando HPLC, fase móvel acetonitrila/água (25:75 v/v) $\text{pH}_{\text{cond}} = 2,5$, com vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ 107

Figura 3.35 Voltamogramas de pulso diferencial em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para AA $2,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e cafeína $7,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em (a) eletrodo de CG e (b) eletrodo de BDD..... 109

Figura 3.36 Voltamograma de pulso diferencial obtidos para o AA e para a cafeína simultaneamente nas concentrações $8,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (AA) e $4,30 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. ($t = 15\text{mV s}^{-1}$; $a = 100\text{mV}$; $v = 60\text{mV s}^{-1}$). 110

Figura 3.37 (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o AA em diferentes concentrações ($9,92 \times 10^{-6}$ a $1,78 \times 10^{-4}$), mantendo constante a concentração de cafeína em $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a cafeína em diferentes concentrações ($3,80 \times 10^{-6}$ a $8,31 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), mantendo a concentração de AA constante ($9,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)..... 111

Figura 3.38 Voltamogramas de pulso diferencial para o AA e para a cafeína em diferentes concentrações em ácido sulfúrico. Concentrações de AA (1 a 10): $4,96 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,11 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e cafeína (1 a 10): $1,99 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($t = 15\text{mV s}^{-1}$; $a = 100\text{mV}$; $v = 60\text{mV s}^{-1}$)..... 112

Figura 3.39 Curvas analíticas obtidas para o (A) AA e para a (B) cafeína empregando DPV nas condições experimentais mostradas na legenda da Figura 3.38. 113

Figura 3.40 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas (produto comercial E): (1) amostra E ; (2) amostra E + ($9,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ AA, $2,50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ cafeína) ; (3) amostra E + ($1,20 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ AA, $4,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ cafeína); amostra E +($1,40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ AA, $7,30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ cafeína); amostra E +($1,60 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ AA, $9,60 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ cafeína). 115

Figura 3.41. Cromatograma típico do padrão de ácido ascórbico ($t = 4,35 \text{ min}$; $\lambda = 234 \text{ nm}$), fase móvel metanol/água (35:65 v/v) $\text{pH}_{\text{cond.}} = 3,1$ com vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ 116

Figura 3.42 Cromatograma típico do padrão de cafeína ($t = 1,35 \text{ min}$; $\lambda = 273 \text{ nm}$), fase móvel metanol/água (35:65 v/v) $\text{pH}_{\text{cond.}} = 3,1$ com vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ 116

Figura 3.43 Curva analítica obtida para o (A) AA e (B) cafeína empregando HPLC, nas condições experimentais citadas nas legendas das Figuras 3.41 e 3.42. 117

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Parâmetros investigados de voltametria de onda quadrada (SWV) e os valores selecionados para a determinação de paracetamol	73
Tabela 3.2- Parâmetros de voltametria de pulso diferencial (DPV) estudados e os valores selecionados para a determinação de paracetamol	75
Tabela 3.3- Comparação das técnicas voltamétricas de onda quadrada e de pulso diferencial para a determinação do paracetamol.....	77
Tabela 3.4- Parâmetros investigados de voltametria de onda quadrada (SWV) e os valores selecionados para a determinação de cafeína	84
Tabela 3.5- Parâmetros de voltametria de pulso diferencial (DPV) estudados e os valores selecionados para a determinação de cafeína	85
Tabela 3.6- Comparação das técnicas voltamétricas de onda quadrada e de pulso diferencial para a determinação da cafeína	87
Tabela 3.7 Parâmetros investigados de voltametria de onda quadrada (SWV) e os valores selecionados para a determinação de AA	94
Tabela 3.8- Parâmetros de voltametria de pulso diferencial (DPV) estudados e os valores selecionados para a determinação de AA	96
Tabela 3.9- Comparação das técnicas voltamétricas de onda quadrada e de pulso diferencial para a determinação do AA	98
Tabela 3.10- Resultados obtidos na determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas por DPV (método proposto) e HPLC (método comparativo).....	107
Tabela 3.11 Resultados obtidos na determinação simultânea de AA e cafeína em formulações farmacêuticas por DPV (método proposto) e HPLC (método comparativo).....	118
Tabela 3.12 - Comparação dos resultados obtidos para os diferentes parâmetros analíticos obtidos na determinação dos analitos paracetamol, AA utilizando as técnicas de DPV e SWV.....	119

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Paracetamol

A utilização de analgésicos naturais para alívio das dores remonta aos primórdios da história escrita (cerca de 3.000 a.C.) e para esta finalidade recorria-se ao uso de plantas. Posteriormente, o rápido avanço dos conhecimentos fitoquímicos levou à descoberta e ao desenvolvimento dos analgésicos ¹.

A acetanilida é o membro original deste grupo de drogas. Foi introduzida na prática médica em 1886 sob o nome de antifebrina por CAHN, que acidentalmente descobriram sua ação antipirética. Contudo, a acetanilida demonstrou ser excessivamente tóxica. Na busca por compostos menos tóxicos, foi feita uma tentativa com o p-aminofenol na crença de que o organismo oxidava a acetanilida a este composto. No entanto, a toxicidade não se reduziu e diversos derivados químicos do p-aminofenol passaram a ser testados. Um dos mais satisfatórios entre estes foi a fenacetina (acetofetidina), introduzida na terapêutica em 1887, sendo amplamente empregada em misturas analgésicas até ser implicada na nefropatia do abuso dos analgésicos ².

O paracetamol (acetaminofeno, N-acetil-p-aminofenol) (Figura 1) é um cristal branco inodoro ou um pó cristalino, moderadamente solúvel em água (1 g por 70 mL a 25°C) e apresenta grande estabilidade em solução aquosa em pH 5 -7 ³.

Somente em 1893 o paracetamol foi introduzido na prática clínica por Von Mering, contudo só foi utilizado extensivamente a partir de 1949, quando Brodie e Axelrod o identificaram como principal metabólito ativo, tanto da fenacetina como da acetanilida, ambos com ação analgésico-antipirética ².

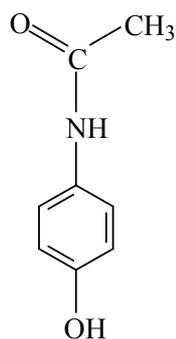


Figura 1.1. Estrutura química do paracetamol.

A partir desta época o paracetamol tem sido utilizado como ingrediente ativo para uma série de produtos farmacêuticos, sob diferentes formas de dosagens, sozinho ou associado, como por exemplo, com a cafeína ².

Hoje em dia, o paracetamol é um dos medicamentos mais utilizados para alívio de dores crônicas e é um dos melhores analgésicos disponíveis no mercado ⁴. Esse fármaco vem substituindo a Aspirina[®] (AAS- ácido acetilsalicílico) e, possui propriedades analgésica e antipirética análogas, sendo principalmente recomendado a pessoas que apresentam sensibilidade ao AAS. Entretanto o paracetamol apresenta baixa atividade antiinflamatória ^{2,5}.

Como o paracetamol é bem tolerado, apresenta menos efeitos colaterais em relação ao AAS, não causando aumento da acidez estomacal em pessoas portadoras de úlcera péptica e, em geral, por aqueles que sofrem de asma ^{2,5}.

No caso de intoxicação aguda, o efeito mais sério é a necrose hepática podendo chegar a níveis fatais ⁴. O paciente apresenta em geral um quadro de náuseas, vômito e dores abdominais. Essa toxicidade se deve a oxidação do grupamento amino do paracetamol, formando o hidroxiaceminofenol, seguido pela formação do N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) ⁴. Essa substância é altamente

eletrofílica e pode facilmente oxidar grupamentos tióis das proteínas sofrendo assim um ciclo redox com a formação de ânions superóxidos por meio de redução com oxigênio⁶. Essa etapa de redução acaba produzindo peróxidos e por final radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$) implicando no stress oxidativo celular⁴.

A dose máxima recomendada é de 0,5 g a 8,0 g / dia. Doses superiores a estas podem causar hemorragia digestiva, intoxicação exógena, hepatite medicamentosa e até mesmo levar à morte. No caso do paracetamol, a diferença entre a dose terapêutica e a tóxica, é pequena por isso a necessidade do controle de sua administração⁷.

1.1.1 Mecanismo de oxidação do paracetamol

A reação de oxidação do paracetamol (Figura 1.2) em eletrodo de pasta de carbono utilizando voltametria cíclica, foi proposta por VAN BENSCHOTEN et al.⁸ em 1983 e é atualmente bastante aceita na literatura. No mecanismo proposto, observa-se que a molécula de paracetamol (I) é eletroquimicamente oxidada num processo que envolve a perda de dois elétrons e dois prótons, produzindo uma espécie intermediária N-acetil-p-quinoneimina (II). Em valores de pH maiores ou igual a 6, a espécie (II) é estável na forma desprotonada. Em soluções mais ácidas essa substância é imediatamente protonada produzindo a espécie (III) menos estável, porém, eletroquimicamente ativa, que produz rapidamente a forma hidratada (IV), eletroquimicamente inativa, que se converte, finalmente, a benzoquinona.

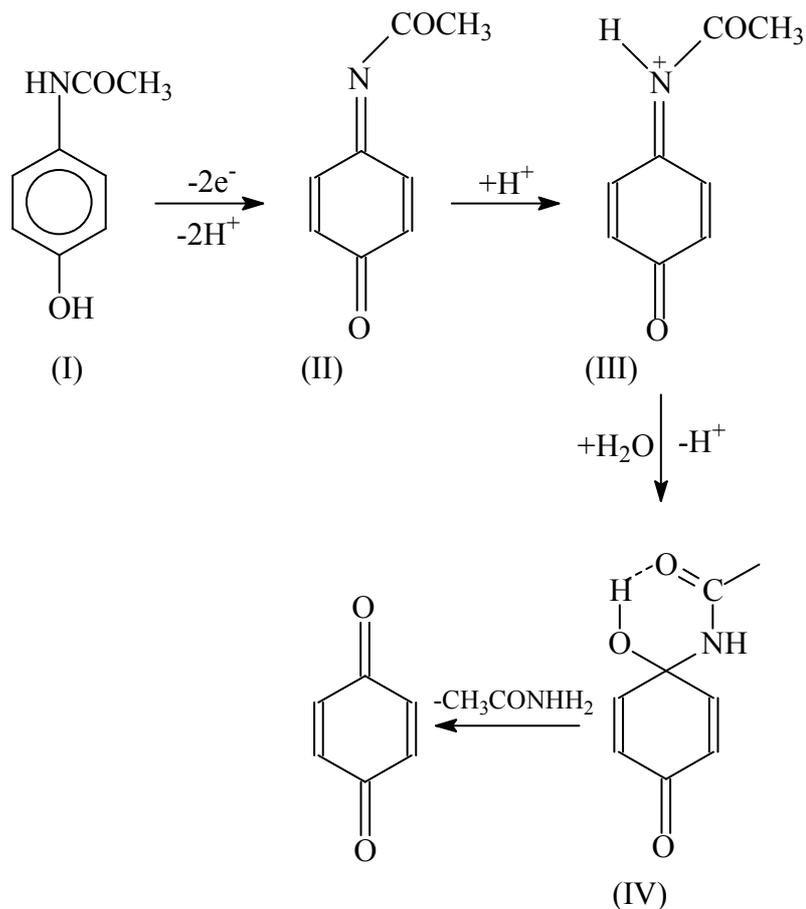


Figura 1.2. Mecanismo proposto de oxidação eletroquímica do paracetamol.

1.1.2 Método recomendado pela Farmacopéia Americana para a determinação do paracetamol

Os métodos recomendados pela Farmacopéia Americana são a espectrofotometria no UV-VIS e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção espectrofotométrica⁹.

1.1.3 Métodos para a determinação de paracetamol

Muitos métodos para determinação de paracetamol têm sido descritos na literatura tais como cromatográficos ¹⁰⁻¹⁴, espectrofluorimétricos ¹⁵⁻¹⁸, quimioluminescentes ^{19,20} e espectrofotométricos ²¹⁻²³.

Existem diversos relatos na literatura de procedimentos eletroquímicos utilizados para a quantificação de paracetamol em diversos tipos de amostras ^{5,24-26}.

WANGFUENGGANAGUL et al. ²⁷ estudaram a eletroquímica do paracetamol sobre um eletrodo de filme fino de diamante dopado com boro usando voltametria cíclica, voltametria hidrodinâmica e injeção em fluxo com detecção amperométrica. A curva analítica apresentou uma resposta linear de 0,1 a 8,0 mmol L⁻¹ e limite de detecção de 10 µmol L⁻¹.

SHANGUAN et al. ²⁸ estudaram o comportamento eletroquímico do paracetamol e sua determinação por voltametria de pulso diferencial no eletrodo de carbono iônico (CILE) em comparação a um eletrodo de pasta de carbono tradicional (TCPE). O CILE foi fabricado pela substituição de aglutinantes orgânicos não condutores, com um condutor hidrofóbico, um líquido iônico à temperatura ambiente, o 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato (BmimPF₆). Os resultados mostraram que o CILE apresentou melhor reversibilidade para a reação eletroquímica do paracetamol. A curva analítica utilizando o CILE para a determinação do paracetamol apresentou uma resposta linear de 1,0 µmol L⁻¹ a 2,0 mmol L⁻¹ com um limite de detecção de 0,3 µmol L⁻¹. O método foi aplicado para amostras farmacêuticas e de urina.

XIE et al. ²⁹ utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNTs/GCE) para a determinação de

paracetamol em formulações farmacêuticas, utilizando voltametria de pulso diferencial. Os resultados mostraram que MWNTs exibiram excelente efeito eletrocatalítico na reação do paracetamol acelerando a taxa de transferência eletrônica. A curva analítica foi linear entre $4,00 \times 10^{-7}$ – $1,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $1,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

O trabalho de GOYAL et al.³⁰ descreve a determinação voltamétrica de paracetamol utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com fulereno (C₆₀). De acordo com os autores, uma significativa melhora na resposta do eletrodo em termos de sensibilidade e seletividade foi observada permitindo a quantificação do analito no intervalo de concentração de 0,05 a 1,50 mmol L⁻¹ com limite de detecção de 13,04 µmol L⁻¹. O procedimento foi aplicado na determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas e amostras de urina.

WANG et al.³¹ propuseram a modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo com um filme de L-cisteína para a determinação de paracetamol. O método de modificação do eletrodo é baseado na eletrooxidação de aminas aos seus cátions, radicais análogos, para formar uma ligação covalente estável entre o átomo de nitrogênio da amina e os grupos funcionais da superfície do eletrodo de carbono vítreo. A presença do filme de L-cisteína na superfície do eletrodo facilitou a transferência eletrônica, diminuiu o potencial de pico e aumentou significamente a corrente de pico anódica. A região linear foi obtida entre $2,0 \times 10^{-7}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de paracetamol.

Em outro trabalho descrito na literatura, WANG et al.³² prepararam um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas magnéticas usando níquel recoberto com carbono (C–Ni/GCE). O comportamento eletroquímico do paracetamol foi estudado em detalhes no C–Ni/GCE o qual apresentou

comportamento eletrocatalítico bastante favorável. A linearidade da curva analítica foi de $7,8 \cdot 10^{-6}$ a $1,1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. O C–Ni/GCE apresentou boa sensibilidade, seletividade e estabilidade podendo ser aplicado para a determinação de paracetamol em amostras efervescentes.

1.2 Ácido ascórbico

O ácido L-ascórbico (AA), 2-(1,2-diidroxietil)-4,5-diidroxifuran-3-ona ou vitamina C (figura 1.3.) é um sólido cristalino branco, inodoro e de gosto ligeiramente azedo ³³.

À temperatura ambiente e em locais fechados, os cristais secos são estáveis, mas em meio aquoso ocorre a oxidação gradual. É solúvel em água (33% m/v a 25^oC) ³³.

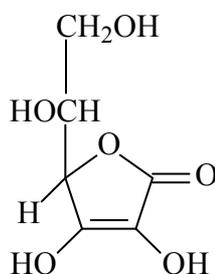


Figura 1.3. Fórmula estrutural do AA.

Albert Szent-Cyorgyi isolou a vitamina C em 1928 e por este fato recebeu o prêmio Nobel em 1937. Por volta da mesma época (1932), Irwin Stone começou um longo estudo da vitamina C, o qual ele referiu-se como ascorbato. Stone estava inicialmente interessado nas propriedades antioxidantes da nova vitamina descoberta, sendo que por volta de 1950, ele se convenceu que os humanos

poderiam se beneficiar com a ingestão desta vitamina que prevenia a doença conhecida como escorbuto^{34,35}.

O AA desempenha um papel fundamental na formação e manutenção do colágeno e é um poderoso antioxidante que reage com espécies reativas de oxigênio ou radicais livres. Ademais, o AA reforça e protege o sistema imunológico, aumenta a biodisponibilidade do ferro, e ajuda a reduzir os níveis de colesterol. O AA também tem sido proposto por ter um efeito benéfico sobre muitas doenças associadas à idade tais como, aterosclerose, câncer e algumas doenças neurodegenerativas e ocular^{36,37}.

Embora a necessidade de pequenas quantidades de vitamina C para prevenir escorbuto é amplamente reconhecida, a quantidade ótima de ingestão de vitamina C no que diz respeito à prevenção das doenças e tratamento destas enfermidades permanece controversa^{33,34}.

Sob certas condições, vitamina C pode agir como um pró-oxidante e danificar células. Isto nem sempre é uma característica ruim, por exemplo, vitamina C pode oxidar células cancerígenas, matando-as. Desta maneira, alguns cientistas afirmam que altas doses de vitamina C mata células cancerígenas, aparentemente por produzir peróxido de hidrogênio. A idéia de que a vitamina C pode agir também como oxidante sob certas circunstâncias é o mais válido argumento contra altas dosagens que a mais freqüente sugestão de que pode causar pedra nos rins, porém estas afirmações não são substanciais^{34,35,37}.

Dados epidemiológicos clínicos e estudos bioquímicos indicam que a ingestão de vitamina C entre 100 e 200 mg/dia estão associados com o tecido de saturação em jovens adultos saudáveis e redução do risco de doenças crônicas³⁸

No entanto, de acordo com estudos farmacocinéticos e respostas fisiológicas da vitamina C, sabe-se que a saturação dos tecidos varia consideravelmente entre os indivíduos, e dosagens mais adequadas para crianças, adultos mais velhos, e aqueles que sofrem de doenças agudas e crônicas continuam sendo determinadas³⁸.

Os seres humanos e outros primatas são os únicos mamíferos incapazes de sintetizar o AA³⁵. Neles, a deficiência, geneticamente determinada, da gulonolactona oxidase, impede a síntese do ácido L-ascórbico a partir da glicose^{37,39}.

Assim os seres humanos devem adquirir vitamina C a partir da ingestão de certos alimentos tais como: laranja, acerola goiaba, morango, couve, brócolis, mamão, melão, entre outros³⁸.

Devido aos valores de pH normalmente encontrados no meio intracelular, o ácido ascórbico encontra-se predominantemente na sua forma ionizada, como ascorbato⁴⁰.

A oxidação eletroquímica AA é muito sensível ao estado da superfície do eletrodo utilizado. A constante de taxa de transferência eletrônica para esta reação depende da composição da superfície do eletrodo e sua microestrutura e pode mudar se a superfície está contaminada por substâncias adsorvidas^{41,42}

Diferentes métodos voltamétricos utilizando diferentes eletrodos tem sido propostos para a determinação de AA, porém a confiança e a aplicabilidade de alguns destes eletrodos diminuem com o uso repetido do mesmo, devido a adsorção dos produtos gerados na oxidação do AA^{43,44}.

Uma grande parte dos trabalhos descritos na literatura para a determinação de AA utilizando técnicas voltamétricas envolve o uso de eletrodos modificados⁴⁵⁻⁴⁷. A desvantagem deste tipo de eletrodo está na sua preparação que envolve sempre

etapas de incorporação do modificador ao substrato levando a resultados nem sempre reprodutíveis. Ademais, devido à limitação do intervalo útil de potenciais da maioria dos eletrodos, fica impraticável a determinação simultânea de ácido ascórbico em associação com outros compostos.

1.2.1 Oxidação do AA

O mecanismo eletrooxidativo do ácido ascórbico em diferentes superfícies tem sido amplamente estudado ⁴⁸⁻⁵⁰. Embora o mecanismo desta reação em pH acima de 8 ainda é contestado, um mecanismo proposto por Hu⁴⁹ sobre o eletrodo de carbono vítreo para a reação em pH abaixo de 8 é amplamente aceito. No mecanismo proposto, o AA (figura 1.4) sofre dois processos redox irreversíveis com um radical livre intermediário. No primeiro passo ocorre a perda de um elétron, levando ao intermediário ânion radical L-ascorbato (também chamado de ácido monodehidroascórbico ou ácido semidehidroascórbico). No segundo passo (etapa determinante), ocorre a perda de mais um elétron levando à formação de L-ácido dehidroascórbico. Há também uma reação química de hidratação subsequente, que garante que a redução deste composto não é observável em velocidades de varreduras de potencial normalmente empregadas em técnicas voltamétricas.

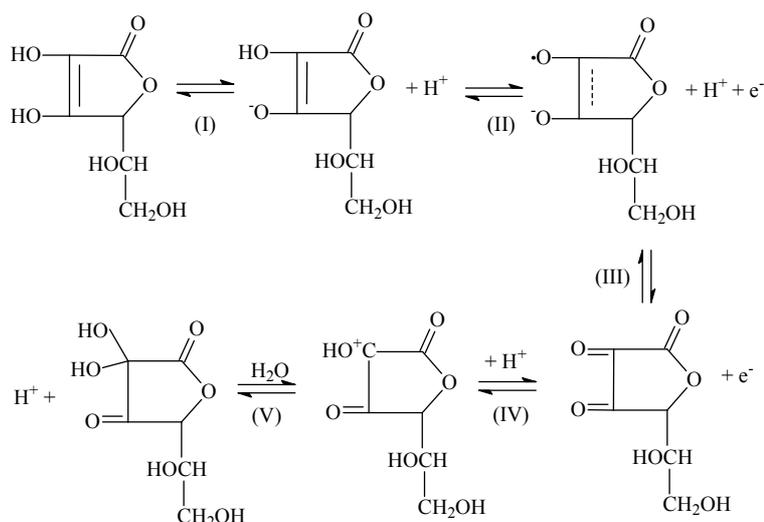


Figura 1.4 Mecanismo de oxidação do AA.

1.2.2 Método oficial da Farmacopéia Brasileira para a determinação de AA

No Brasil⁵¹, para a quantificação de ácido ascórbico em medicamentos utiliza-se, como método oficial, a diluição do ácido ascórbico com o ácido metafosfórico e posterior titulação com o indicador orgânico diclorofenolindofenol (DCPIP).

1.2.3 Métodos para a determinação de AA

Diversos métodos analíticos têm sido relatados na literatura para a determinação de ácido ascórbico em formulações farmacêuticas, fluidos biológicos, alimentos e bebidas. Dentre estes métodos destacam-se os titulométrico^{51,52}, fluorimétrico⁵³, HPLC^{54,55}, espectrofotométrico⁵⁶⁻⁵⁸, entre outros⁵⁹.

Existem diversos trabalhos descritos na literatura para a determinação de AA, empregando-se diversos tipos de eletrodos de trabalho e diversas técnicas voltamétricas ⁶⁰.

OUKIL et al. ⁶¹ desenvolveram eletrodos modificados com Polipirrol / Ferrocianeto (PPy/FCN/Fe) e eletrodos termicamente pré-tratados (PPy/FCN/Fe₃O₄/Fe) por eletropolimerização de polipirrol em uma solução aquosa de K₄Fe(CN)₆, e C₄H₃KO₈ para estudar as atividades catalíticas destes na determinação de ácido ascórbico. O eletrodo modificado (PPy/FCN/Fe₃O₄/Fe) apresentou maior capacidade de eletroatividade redox do que o eletrodo (PPy/FCN/Fe). Verificou-se que sob certas condições de pH (pH=7), a oxidação de ácido ascórbico na superfície do PPy/FCN/Fe₃O₄/Fe ocorre em um potencial cerca de 200 mV meno positivo do que com o eletrodo modificado com PPy / FCN / Fe. O pico de oxidação mostrou uma dependência linear com a concentração de ácido ascórbico e uma curva de calibração linear foi obtida no intervalo 0,5 a 9,0 mmol L⁻¹ de AA com um coeficiente de correlação de 0,9994 e boa sensibilidade (0,24 µA / mmol L⁻¹). O limite de detecção foi determinado e o valor encontrado foi igual a 0,15 mmol L⁻¹.

Foram desenvolvidos por WANG et al. ⁴⁷ eletrodos com multicamadas de filmes finos de cloridrato de polialilamina (PAH) e carboximetil celulose (CMC) depositadas sobre a superfície de um disco de ouro onde foram confinados nestes filmes íons ferricianeto ([Fe(CN)₆]³⁻). A concentração de íons [Fe(CN)₆]³⁻ confinados no filme depende da espessura destes filmes. Assim, o eletrodo desenvolvido foi utilizado para a determinação electrocatalítica de AA em concentrações de 1,0 – 50 mmol L⁻¹.

TEIXEIRA at. al. ⁶² desenvolveram um eletrodo de pasta de carbono modificado com fosfato de cobre II imobilizado em resina poliéster para a

determinação de AA em formulações farmacêuticas. O eletrodo modificado permitiu a detecção de AA em potenciais mais baixos que os observados em eletrodos não modificados. A linearidade da curva analítica foi de $2,0 \times 10^{-5}$ a $3,2 \times 10^{-3}$ com limite de detecção $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

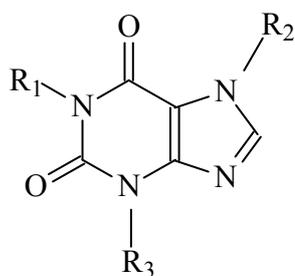
KUMAR et al.⁶³ estudaram o comportamento eletroquímico do AA em condições fisiológicas usando um eletrodo de carbono vítreo recoberto com um novo filme híbrido de poli(luminol) e nanopartículas de zinco GCE (PLu/ZnONPs/GCE). O sensor exibiu uma ampla janela de resposta linear de $1,0 \times 10^{-6}$ a $3,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹

KOMATSU et al.⁶⁴ desenvolveram um método de análise por injeção em fluxo (FIA) utilizando como detector eletroquímico e um eletrodo de diamante dopado com boro para determinação de ácido ascórbico em uma mistura de solução etanol-água contendo NaClO₄ 0,1 mol L⁻¹. O limite de detecção de AA obtido foi dez vezes menor que aquele obtido empregando-se um eletrodo de carbono vítreo, sendo a curva analítica linear no intervalo de concentração de AA de 30 a 300 nmol L⁻¹.

1.3 Cafeína

A cafeína ou 1,3,7-trimetilxantina (Figura 1.5) é um composto químico classificado como alcalóide do grupo das xantinas⁶⁵. A teofilina e a teobromina também fazem parte deste grupo. A cafeína é encontrada em grande quantidade nas sementes de café e nas folhas de chá verde, também pode ser encontrada em outros produtos vegetais, particularmente no cacau, no guaraná e na erva-mate. De maneira geral, a cafeína pode ser encontrada em mais de 60 espécies de plantas.

Embora uma parcela pequena da população consuma cafeína na forma de fármacos, como por ex. antigripais, grande parte deste alcalóide é ingerida na forma de bebidas ^{65,66}



R ₁	R ₂	R ₃	Composto
H	H	H	Xantina
CH ₃	CH ₃	H	Teofilina
H	CH ₃	CH ₃	Teobromina
CH ₃	CH ₃	CH ₃	Cafeína

Figura 1.5. Estrutura química das metilxantinas.

A concentração de cafeína varia de acordo com a fonte: folhas de chá contêm de 1,5 a 3,5 % m/m de cafeína, grão de café torrados contêm de 0,75 a 1,5 % m/m de cafeína. No entanto, no café o teor de cafeína pode variar bastante, algumas análises estimaram que a cafeína pode variar de 0,8 a 1,8 % m/m dependendo do tipo de café ⁶⁶.

A cafeína apresenta-se com um pó branco cristalino e inodoro, porém de sabor azedo ⁶⁶.

Os valores de solubilidade são distintos para a cafeína, teobromina e teofilina. Cafeína dissolve bem em água fervente, mas a temperatura ambiente clorofórmio é um dos melhores solventes ⁶⁶.

A base da popularidade das bebidas contendo cafeína é que os antigos acreditavam ser estimulante e anti-soporífero. Ela eleva o ânimo, a disposição, diminui a fadiga e aumenta a capacidade para o trabalho do consumidor. Estudos clássicos de farmacologia, principalmente da cafeína, durante a primeira metade do

século XX, confirmam as qualidades atribuídas pelos antigos e revalidam o fato de as metilxantinas possuírem outras importantes propriedades farmacológicas ⁶⁷.

A ingestão excessiva de cafeína pode provocar, em algumas pessoas, irritabilidade, agitação, insônia e dor de cabeça, sendo que a dose letal para uma pessoa adulta pesando 70 kg é cerca de 10 g o que é equivalente a se tomar 100 xícaras de café, 200 latas de Coca-Cola ou ingerir 50 kg de chocolate ⁶⁷.

A cafeína sofre rápida absorção após sua administração oral. Aproximadamente 90 % da cafeína contida em uma xícara de café é absorvida no estômago dentro de 20 minutos após a ingestão ⁶⁸.

Durante a eliminação, cerca de 85% de uma dose é excretada pela urina dentro de 48 h, com apenas aproximadamente 1% na forma de cafeína inalterada. A cafeína é um estimulante suave do sistema nervoso central. Em dose suficiente, porém, ela pode produzir rubor, arrepios, agitação, irritabilidade, perda de apetite, fraqueza e tremores. Hipertensão, hipotensão, taquicardia, vômito, febre, delírios, alucinações, convulsões, arritmia, parada cardíaca, coma e morte têm sido relatadas em casos de overdose ⁶⁸.

Uma vez absorvida, a cafeína exerce uma variedade de ações farmacológica tanto no sistema nervoso central quanto o periférico. O principal mecanismo de ação é contrário ao da adenosina. A cafeína é estruturalmente semelhante a adenosina, a qual tem função inibitória, contrária a função estimulante da cafeína. A cafeína tem o potencial para ocupar sites receptores da adenosina, isto bloqueia o efeito regulador da adenosina e produz um efeito do tipo estimulante, causado pela cafeína. Efeitos cardiovasculares, pela ingestão de cafeína, podem resultar devido aos múltiplos mecanismos de ação desta, incluindo o aumento da circulação de catecolaminas, enquanto a hipotensão pode resultar na diminuição do débito cardíaco e

vasodilatação. Assim, como as dores de cabeça ocorrem quando há a dilatação dos vasos sanguíneos no cérebro, muitos medicamentos são normalmente associados à cafeína, pois esta causa a constrição dos vasos sanguíneos ocasionando o alívio da dor de cabeça mais rapidamente ^{68,69}.

A cafeína também entra na composição de diversas outras especialidades analgésicas, antipiréticas e antigripais, associada com ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, codeína e, com diidroergotamina, ajudando também no alívio ou interrupção de crises de enxaqueca. Além disso, a cafeína, como fármaco isolado, é utilizada como sonolítico, tônica e revigorante. ⁷⁰.

1.3.1 Mecanismo de oxidação da cafeína

HANSEN et al.⁷¹ investigaram o comportamento eletroquímico da cafeína e teobromina em um eletrodo de grafite pirolítico e propuseram um mecanismo de oxidação para a cafeína que atualmente é bastante aceito na literatura ⁷². No mecanismo proposto (Figura 1.6) foi observado que a reação de oxidação da cafeína envolve $4e^-$ por molécula de xantina. A primeira etapa envolve a perda de 2 elétrons e 2 prótons ocorrendo a oxidação da molécula na ligação dupla $-N=C-$ obtendo-se assim um ácido úrico substituído (composto intermediário). Logo após, o composto intermediário é imediatamente oxidado em uma segunda etapa que envolve a perda de mais dois elétrons, formando assim o ácido úrico 4,5 diol.

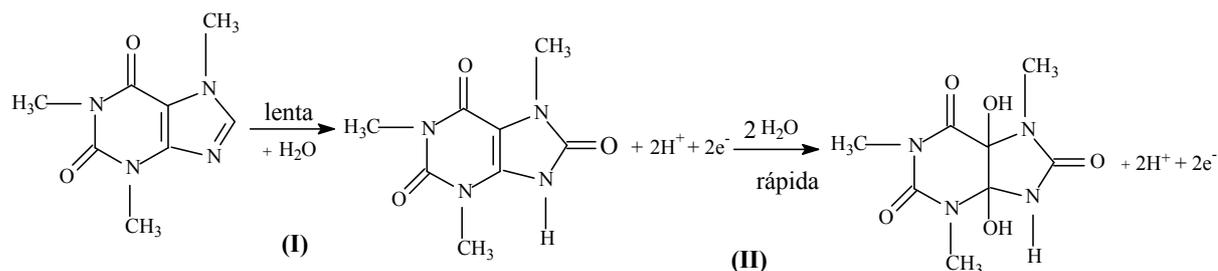


Figura 1.6 Mecanismo proposto para a oxidação da cafeína.

1.3.2 Método oficial para a determinação de cafeína

O método recomendado pela Farmacopéia Americana é a titulação potenciométrica utilizando ácido perclórico como titulante ⁹.

1.3.3 Métodos para a determinação de cafeína

Vários métodos para a determinação de cafeína têm sido desenvolvidos incluindo espectrofotometria ⁷³⁻⁷⁶, cromatografia ⁷⁷⁻⁸¹, entre outros ⁸²⁻⁸⁴. Estes métodos são geralmente mais caros, consomem muito tempo e são mais complicados que os eletroquímicos. Apesar disso, métodos eletroquímicos têm sido pouco usados para análise de cafeína ^{85,86}, devido à oxidação da cafeína ocorrer em um potencial muito positivo.

BRUNETTI et al. ⁸⁷. desenvolveram um método para a determinação de cafeína baseado na modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo pela deposição de Nafion®. Utilizando-se a voltametria de pulso diferencial o método foi desenvolvido para a determinação de cafeína em bebidas de cola. A modificação do

eletrodo apresentou uma melhor resposta de corrente quando comparada ao eletrodo sem modificação, obtendo-se um limite de detecção de $7,98 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

SPĂTARU et al.⁷² utilizaram um eletrodo de diamante dopado com boro para estudar a oxidação eletroquímica da xantina e alguns dos seus derivados (teofilina, teobromina e cafeína), sendo a curva analítica linear no intervalo de concentração de cafeína de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os estudos voltamétricos mostraram que o mecanismo de reação é similar ao mecanismo dos derivados das purinas em eletrodo de grafite pirolítico.

LY et al.⁸⁸ estudaram o uso de um eletrodo de grafite (GPE) para o monitoramento de cafeína empregando voltametria de redissolução anódica de onda quadrada. O método foi aplicado para a determinação de cafeína em amostras de chás. A cafeína foi depositada em 0.0V (vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 M)) e então oxidada em +1,40 V. A curva analítica foi linear de 0 ~ 500mg L⁻¹ com um limite de detecção de 9,2 mg L⁻¹ o qual é comparável com os resultados obtidos utilizando eletrodo de pasta de carbono, que teve um limite de detecção de 8,2 mg L⁻¹.

AKLILU et al.⁸⁹ propuseram a modificação do eletrodo de pasta de carbono com 1,4-benzoquinona para a determinação voltamétrica indireta de cafeína em amostras de café. O método foi baseado na diminuição do pico da 1,4-benzoquinona com a adição da cafeína. Os resultados apresentaram duas faixas de regiões lineares entre 0 e 0,5 mmolL⁻¹ e 0,5 mmolL⁻¹ e 8,0 mmol L⁻¹ com limites de detecção de 0,3 μmol L⁻¹ e 5,1 μmol L⁻¹ respectivamente.

BABU et al.⁹⁰ construíram um biossensor amperométrico imobilizando um micróbio com alta capacidade de degradar a cafeína para a determinação de cafeína em amostras de chá e de café. Esse biossensor mostrou-se altamente específico para a cafeína em resposta a compostos interferentes como a teofilina, teobromina,

paraxantina e outras metilxantinas e açúcares. O biossensor foi capaz de detectar cafeína em concentrações de 0,1 a 1,0 mg mL⁻¹.

1.4 Determinações simultâneas dos analitos

Alguns métodos são descritos na literatura para a determinação simultânea de paracetamol, cafeína, AA e outros analitos de interesse. Entre esses métodos pode-se citar a cromatografia, espectroscopia de infravermelho, voltametria entre outros⁹¹⁻⁹⁴.

Em muitos desses métodos um intervalo de tempo consideravelmente longo é exigido para a extração e purificação das espécies de interesse antes de suas análises, pois a matriz de muitas formulações farmacêuticas contém aditivos, aglutinantes, corantes, edulcorantes, podendo ser, na maioria das vezes, interferentes quando empregados em métodos espectrofotométricos.

Na literatura são descritos estudos de determinação simultânea de paracetamol e cafeína por voltametria de onda quadrada utilizando um eletrodo de trabalho quimicamente modificado com Nafion[®]/óxido de rutênio. Foram obtidos limites de detecção de $2,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $1,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para cafeína e paracetamol respectivamente. Neste trabalho utiliza-se como eletrólito suporte o ácido perclórico (HClO₄), que é um reagente de alto custo e sua venda é controlada pelo Exército Brasileiro. Os potenciais de pico obtidos para estes fármacos foram +0,7 V e 1,45 V para paracetamol e cafeína respectivamente⁹⁵.

Um método simples e rápido foi desenvolvido por LAU et al.⁹⁶ para a determinação simultânea de AA, cafeína e paracetamol em formulações farmacêuticas. Potenciais foram medidos em um eletrodo de carbono vítreo com

valores de 0,350, 0,618 e 1,425 V (AA, paracetamol e cafeína) versus um eletrodo de calomelano saturado. Ácido perclórico (0,1 mol L⁻¹) - metanol (1:1 v/v) foi usado tanto como solvente como eletrólito suporte. Os parâmetros de voltametria de pulso diferencial foram estudados. As curvas analíticas foram lineares de 0-35, 0-50 e 0-55 µg ml⁻¹ para AA, cafeína e paracetamol, respectivamente.

PRODAN et al.⁹⁷ desenvolveram um método cromatográfico utilizando fase reversa isocrática para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas. A fase metanol/água (40:60 v/v) foi utilizada como eluente com fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Para cada um dos analitos supracitados foi selecionado os comprimentos de onda de 249 e 273 nm, respectivamente. A aplicabilidade do método foi demonstrada pela alta eficiência de separação dos analitos em análises de rotina no controle de qualidade desses fármacos.

Um método cromatográfico rápido e seletivo acoplado a espectrometria de massa foi desenvolvido e validado por WANG et al.⁹⁸ para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína em plasma humano. Os analitos e a teofilina (padrão interno) foram extraídos das amostras de plasma com uma mistura de éter dietílico/diclorometano (3:2 v/v) e separado em uma coluna C₁₈. A fase móvel consistiu em 0,2% ácido fórmico/metanol (60:40 v/v). A curva analítica foi linear entre 0,05 e 25 µg mL⁻¹ para paracetamol e de 10,0 ng mL⁻¹ a 5,0 µg mL⁻¹ para cafeína, com limites de quantificação de 0,05 µg mL⁻¹ e 10,0 ng mL⁻¹ respectivamente.

A determinação simultânea de paracetamol, ibuprofeno e cafeína foi proposta por KHOSHAYAND et al.⁹⁹ utilizando análise quimiométrica e espectrofotometria UV. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), algoritmo genético acoplado com PLS (GA-PLS), componentes principais de redes neurais artificiais (PC-ANN) foram utilizados para a análise quimiométrica dos dados e os parâmetros dos

procedimentos quimiométricos foram otimizados. Embora os componentes demonstrem sobreposição espectral, foi possível a determinação simultânea, sem a necessidade de alguma etapa de separação.

A cromatografia líquida micelar foi utilizada por KULIKOV et al. ¹⁰⁰ para a determinação simultânea de substâncias ativas como paracetamol, cafeína e guaifenesina em conservantes com o ácido benzóico, metil e propil parabenos. A separação foi efetiva usando uma coluna C₁₈ e como fase móvel butanol:água (1:99 v/v), contendo dodecilsulfato de sódio 0,04 mol L⁻¹ e ácido tricloroacético 0,1 % para a eluição de todos os componentes. O comprimento de onda selecionado foi de 260 nm. Uma coluna com aquecedor também foi utilizada, fixada em 40 °C para essas determinações. Sob estas condições, a separação dos seis componentes foi atingida em menos de 30 min. O método foi aplicado para a determinação dos analitos em xaropes.

DINC et al. ¹⁰¹ propuseram duas técnicas, método clássico de mínimos quadrados (CLS) e regressão em componentes principais (PCR) para a realização simultânea de comprimidos que contêm paracetamol e cafeína sem utilizar um procedimento de separação química. As calibrações quimiométricas foram utilizadas para a estimativa de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas. Os cálculos numéricos foram realizados com o auxílio do programa 'MAPLE V'. Ao aplicar as técnicas para duas diferentes formulações, a média de recuperações e os desvios padrão relativos entre parênteses no CLS e PCR foram encontrados em 99,5 (1,29%), 99,7 (1,00%) para paracetamol e 99,9 (1,92%), 100 (1,18%) para a cafeína, respectivamente.

Um método exato, simples, reprodutível e sensível para a determinação de paracetamol, cafeína e dipirona foi desenvolvido e validado por ALTUN et al. ¹⁰².

Paracetamol, cafeína e dipirona foram separados em uma coluna C-18 utilizando eluição isocrática com um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A composição da fase móvel foi de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de KH_2PO_4 -metanol – acetonitrila - álcool isopropílico (20: 20: 30: 30 v/v/v/v) e a detecção espectrofotométrica foi realizada em 215 nm. A faixa linear de determinação de paracetamol, cafeína e dipirona foram $0,409 - 400 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,151 - 200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,233 - 600 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

MOREIRA et al. ¹⁰³ utilizaram regressão por mínimos quadrados parciais (PLS1) para a determinação espectrofluorimétrica em fase sólida de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas. Apesar da sobreposição das bandas espectrais, o método permite a quantificação simultânea e não é necessária nenhuma preparação da amostra antes da análise. A calibração consistiu em um conjunto de 96 amostras com intervalos de concentração de $100\text{-}400 \text{ mg g}^{-1}$ para o paracetamol e de $10\text{-}65 \text{ mg g}^{-1}$ para a cafeína; um outro conjunto de 25 amostras foi utilizado para validação externa.

TAVALLALI et al. ¹⁰⁴ desenvolveram um procedimento espectrofotométrico simples e seletivo para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína usando o método de adição de padrão no ponto-H (HPSAM), o qual se baseou na diferença entre a taxa de oxidação destes compostos com o sistema Cu(II)-neocuproina. A formação do complexo Cu(I)-neocuproina foi monitorada espectrofotometricamente a 453 nm em pH 5,0, na presença do surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS). Condições experimentais, tais como pH, concentração do reagente, força iônica e temperatura foram otimizados. Paracetamol e cafeína foram determinados no intervalo de $1,5 - 7,0$ e $0,1 - 3,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação simultânea de paracetamol e cafeína em amostras de produtos farmacêuticos.

Um método espectroscópico de infravermelho próximo para a determinação simultânea de cinco princípios ativos tais como: paracetamol, ácido ascórbico, bromidrato de dextrometorfano, cafeína e maleato de clorofeniramina em preparações farmacêuticas foi desenvolvido por BLANCO et. al. ¹⁰⁵. Esses princípios ativos foram quantificados utilizando regressão por mínimos quadrados parciais (PLS1). O método proposto é aplicável em um grande intervalo de concentração dos analitos (0,04 - 6,50 m/m %), porém requer muito cuidado na seleção do conjunto de dados para calibração. Além disso, existe a dificuldade de garantir a homogeneização cuidadosa do produto. O método foi validado em conformidade com as orientações da Conferência da Organização Internacional sobre Harmonização (ICH) e do Parlamento Europeu da Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos (EMA).

BOUHSAIN et al. ¹⁰⁶ propuseram um procedimento analítico espectrofotométrico para a determinação simultânea de paracetamol, ácido acetilsalicílico e cafeína em produtos farmacêuticos por meio da regressão por mínimos quadrados parciais e tratamento dos dados de absorvância entre 216 e 300 nm, com intervalos amostrados em intervalos de 5 nm. O método envolve a o uso de 8 misturas padrões dos três compostos analisados, considerados em dois níveis de concentrações, bem como a medição da absorvância das amostras em etanol/água 20% (v/v). Na análise das amostras os erros foram inferiores a 5% o que concordam com a tolerância estabelecida pela Farmacopéia para este tipo de amostras que é de 10%.

VIDAL et al. ¹⁰⁷ desenvolveram um sistema em fluxo para a determinação simultânea de uma mistura de três princípios ativos (paracetamol, cafeína e propifenazona) com detecção espectrofotométrica UV em fase sólida utilizando

calibração univariável. A quantificação é baseada na medição direta e intrínseca de absorvância UV dos analitos quando estes atingem a zona sensorial (coluna C₁₈ silicagel) na célula em fluxo do sistema FIA. Devido à forte sobreposição espectral mostrada por estes analitos, uma sequencial e temporária chegada à zona sensorial são exigidas a partir de uma única injeção. Assim, com uma única injeção, as respostas lineares foram obtidas entre 25 - 350 µg mL⁻¹ para o paracetamol, 5 - 75 µg mL⁻¹ para a cafeína e 15 - 150 µg mL⁻¹ para a propifenazona. Limites de detecção variando de 0,65 a 7,5 µg mL⁻¹ foram encontrados.

Um novo método cromatográfico capilar eletrocínética micelar foi desenvolvido por EMRE et al.¹⁰⁸ para analisar as preparações farmacêuticas que contenham combinações de paracetamol, cafeína, e propifenazona. Os melhores resultados foram obtidos utilizando tampão borato, pH 9,0 contendo dodecilsulfato de sódio como eletrólito. Diflunisal (DIF) foi utilizado como padrão interno. A separação foi realizada através de um capilar de sílica fundida a 25° C, com a aplicação de 3s de injeção hidrodinâmica de 50 mbar de pressão e um potencial de 29 kV, no comprimento de onda de 200 nm. Sob estas condições, os tempos de eluição encontrados foram 5,174 min para paracetamol, 5,513 min para cafeína, 7,195 min para diflunisal, e 9,366 min para propifenazona. As curvas analíticas obtidas foram lineares nos intervalos de concentração de 2 - 200 µg mL⁻¹ para o paracetamol e cafeína e de 3 - 200 µg mL⁻¹ para propifenazona. Os limites de detecção encontrados foram 0,6 µg mL⁻¹ para paracetamol e cafeína e 0,8 µg mL⁻¹ para propifenazona.

RUIZ MEDINA et al.¹⁰⁹ desenvolveram um procedimento analítico em fluxo com detecção no UV para a determinação simultânea de cafeína, ácido acetilsalicílico e paracetamol em preparações farmacêuticas utilizando regressão por

mínimos quadrados parciais (PLS). Espectrofotometria foi utilizada para obter espectros (240 - 350 nm) dos analitos percolados em uma coluna C18 acoplada em uma célula de fluxo. Ao usar uma solução de HClO_4 , como transportador, o multisensor responde linearmente em uma gama de medições sem a necessidade adicional de reagentes ou processador de derivatização e as microzonas ativas são regeneradas utilizando metanol como agente de eluição. Espectros dos correspondentes analitos multivariados foram utilizados para fornecer dados para o procedimento multivariado. Os parâmetros estatísticos obtidos pela aplicação de métodos PLS em diferentes tempos foram analisados, a partir da qual o melhor tempo para a determinação simultânea dos analitos foi selecionado.

DINÇ et al.¹¹⁰ propuseram as técnicas de calibração multivariada dos mínimos quadrados invertidos (ILS) e análise de componentes principais (PCA) para a determinação espectrofotométrica de multicomponente que consiste em uma mistura ternária de metamizol, paracetamol e cafeína, sem prévia separação. Nestas técnicas quimiométricas, as medições dos valores de absorvância foram realizadas na faixa espectral de 225 a 285 nm em intervalos de comprimentos de onda de 5 nm em 13 comprimentos de onda das diferentes misturas ternárias destes analitos em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As calibrações usando a absorvância e a concentração da matriz do conjuntos de dados foram utilizadas para prever as concentrações de metamizol, paracetamol e cafeína na mistura ternária. O programa "MAPLE V" foi utilizado para os cálculos numéricos. A média de recuperações e desvios padrão relativos entre parênteses para ILS e PCA foram encontrados sendo 99,8 (1,68%), 99,9 (1,66%) para cafeína, 99,8 (1,84%), 100,4 (2,85%) para metamizol e 99,7 (1,04%), 99,6 (1,34%) para paracetamol, respectivamente, para a primeira e segunda técnica. As

técnicas foram aplicadas com sucesso em duas formulações farmacêuticas e os resultados foram comparados com um método cromatográfico.

1.5 Fundamentos teóricos

1.5.1 Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

O diamante não é naturalmente um material novo, têm-se conhecimento dele há mais de dois mil anos. Porém, por muito tempo foi valorizada apenas sua aparência e suas propriedades mecânicas^{111,112}.

Devido ao seu grande gap de energia (do inglês band-gap) de mais de 5 eV, diamante puro é normalmente um isolante, e não pode ser usado como um material para eletrodo¹¹³. Porém, diamantes podem se tornar condutores quando dopados com alguns elementos¹¹². Atualmente, na maioria dos casos, é utilizado como dopante o boro, obtendo-se assim como resultado da dopagem semicondutores do tipo p. Se fósforo ou nitrogênio são utilizados como dopante um semicondutor do tipo n é produzido¹¹⁴.

Os dois métodos mais empregados para a síntese do diamante são a deposição química a partir da fase vapor (Chemical Vapor Deposition- CVD) e o crescimento a alta pressão/alta temperatura (High-Pressure/High-Temperature-HPHT), o que mais se assemelha ao processo de formação do diamante natural é o HPHT que foi desenvolvido pela General Electric em 1955. Porém, o método CVD foi desenvolvido por Willian Eversole em 1952^{113,115-117}. Devido à viabilidade

econômica, a versatilidade e ao manuseio simplificado, atualmente, o método CVD é o mais utilizado para a síntese dos filmes de diamante em série ¹¹⁸.

A síntese de diamante não é particularmente nova: métodos confiáveis de formação de diamante a partir de compostos contendo carbono foram relatados no meio do século XX. O que é notável é a atual capacidade de sintetizar diamante com estruturas e camadas de dimensões não anteriormente possíveis, com áreas de deposição de até várias centenas de centímetros quadrados e deposição direta sobre uma grande variedade de substratos¹¹¹.

Poferl et al. ¹¹⁹, em 1973, foram os primeiros a promover o crescimento do BDD a baixas pressões, a partir da mistura B_2H_6/CH_4 , usando grãos de diamante natural como substrato. Apesar do grande passo dado para obtenção de diamante dopado, as taxas de crescimento foram ainda muito baixas, da ordem de $4 \times 10^{-5} \mu m h^{-1}$, em comparação com o que se consegue atualmente, da ordem de $100 \mu m h^{-1}$.

Em 1986, Fujimori et al.¹²⁰ cresceram filme policristalino dopado com boro sobre substrato de silício, pelo processo CVD e, como já haviam feito Poferl et al. também obtiveram cristais únicos crescidos sobre diamante, usando reator assistido por plasma de microondas. As contribuições dadas por estes autores foram o aumento na taxa de crescimento para $2,5 \times 10^{-4} \mu m h^{-1}$ e a determinação da resistividade elétrica como função da concentração de boro usado como dopante ¹²¹.

Com a melhora na tecnologia para a fabricação de filmes de diamante a partir da fase vapor, métodos efetivos para o crescimento de filmes de diamante sintético começaram a ser desenvolvidos. Através da dopagem com boro, filmes semicondutores começaram a ser fabricados, o que fez aumentar a procura por este material para fins eletroquímicos ^{113,114,118}.

Diferentes parâmetros devem ser considerados no desenvolvimento de eletrodos e estes envolvem a escolha da mistura gasosa, substrato, método de crescimento, estabelecimento do contato elétrico e montagem final do eletrodo ¹¹⁴.

Para o crescimento de filmes de diamante dopado ou não com boro, vários substratos podem ser utilizados, alguns dos substratos mais usados são: silício, tungstênio, molibdênio, titânio, grafite, carbono vítreo, liga Ti₆Al₄V, irídio e nióbio ¹¹⁷.

Quanto ao dopante, diferentes compostos podem ser usados e injetados no reator simultaneamente com hidrogênio e metano ¹¹⁷. Os dopantes mais empregados são o boro e seus derivados, cada qual com características próprias, tais como B₂H₆, que não contém carbono ou oxigênio na molécula, o que evita a inclusão de elementos extras no reator, é facilmente encontrado e possibilita controle de concentração de boro, mas é altamente tóxico, explosivo e reativo; trimetilborato, que não é tóxico, mas deve ser diluído em acetona ou metanol para ser usado, o que implica em fonte adicional de carbono e oxigênio; B₂O₃, o mais comum deles, que tem grande disponibilidade, mas também deve ser solubilizado em acetona ou metanol, ou pode ser usado como disco sólido ¹²¹. Em geral, são utilizadas para dopagem concentrações de boro entre 500 a 10.000 ppm ou 10¹⁹ - 10²¹ átomos cm⁻³ ^{114,122}.

Após o crescimento dos filmes de diamante dopado, um dos parâmetros mais importantes na montagem de eletrodos é o estabelecimento do contato elétrico, normalmente ôhmico (contato entre um metal e um semiconductor), o qual deve apresentar resistência mínima. Igualmente importante é o isolamento de todas as partes do eletrodo que não devem entrar em contato com a solução de medida ¹²³.

Os eletrodos de BDD possuem um número importante de propriedades eletroquímicas distinguíveis de outros eletrodos comumente utilizados, tais como

carbono vítreo, grafite pirolítico e pasta de carbono. Algumas destas propriedades são ¹¹⁵:

- a) estabilidades à corrosão em meios muito agressivos;
- b) baixa e estável corrente de fundo;
- c) estabilidade de resposta em longo prazo;
- d) fraca adsorção de moléculas polares e
- e) larga janela de potencial em meio aquoso e não aquoso.

Neste eletrodo a evolução de hidrogênio começa em -1,5 V e a evolução de oxigênio em +2,3 V *versus* Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

Em função dessas propriedades únicas, o eletrodo de diamante dopado com boro está sendo cada vez mais utilizado no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de compostos orgânicos ¹²⁴⁻¹²⁸ e inorgânicos ¹²⁹⁻¹³¹, em diversas matrizes ¹³²⁻¹³⁴.

1.5.1.1 Pré-tratamento do eletrodo de BDD

As superfícies dos filmes de BDD recém preparadas são terminadas em hidrogênio. Entretanto, como apontado por Yagi et al. ¹³⁵, esta terminação pode ser facilmente mudada para oxigênio, por exposição da superfície a um plasma de oxigênio ou a uma solução de ácido forte em ebulição; para isso também se passou a usar polarizações anódicas. Assim, podem-se ter eletrodos de BDD com terminações superficiais tanto de hidrogênio como de oxigênio ¹³⁶⁻¹³⁸. Neste contexto, muitos estudos mostram que as propriedades eletroquímicas dos eletrodos de BDD são bastante sensíveis à terminação superficial ^{124,126}.

SUFFREDINI et al.¹³⁹ utilizando um eletrodo de BDD, estudaram o comportamento eletroquímico de pesticidas após um pré-tratamento catódico da superfície do eletrodo. O tratamento do eletrodo de área igual a 0,62 cm² foi feito utilizando ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ aplicando-se -3,0 V por 30 minutos. Os resultados destas investigações demonstraram que a resposta eletroquímica do eletrodo de BDD é extremamente afetada pelo tipo de pré-tratamento aplicado à superfície do eletrodo, sendo que esse tratamento promoveu o aumento da atividade eletroquímica do eletrodo.

1.5.2 Técnicas Eletroquímicas

Uma grande variedade de técnicas eletroquímicas tem sido utilizada na eletroanálise. Uma de suas mais importantes características relaciona-se com o fato destas técnicas possibilitarem o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga. Esses métodos podem ser divididos em duas classes: métodos eletrolíticos e não eletrolíticos (ou galvânicos). Os métodos eletrolíticos são baseados em fenômenos físico-químicos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo e a solução da amostra. Já os métodos não eletrolíticos são baseados nos fenômenos que ocorrem no seio da solução. As técnicas voltamétricas estão incluídas nos métodos eletrolíticos^{140,141}.

1.5.2.1 Voltametria cíclica^{140,142}

A voltametria cíclica é a técnica mais utilizada para a aquisição qualitativa de informações sobre reações eletroquímicas. É muitas vezes a primeira experiência realizada em um estudo eletroanalítico. Em particular, ela oferece uma localização rápida de potenciais redox das espécies eletroativo, e conveniente a avaliação do efeito do meio sobre o processo redox.

Na voltametria cíclica, o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia continuamente com o tempo na forma de onda triangular (Figura 1.7A), partindo de um valor inicial E_i , até um valor limite pré-determinado, E_v . Ao alcançar E_v , a direção da varredura é invertida e um caminho inverso é percorrido até chegar a E_f , que pode ser o valor do potencial inicial E_i , ou outro valor de potencial pré-estabelecido.

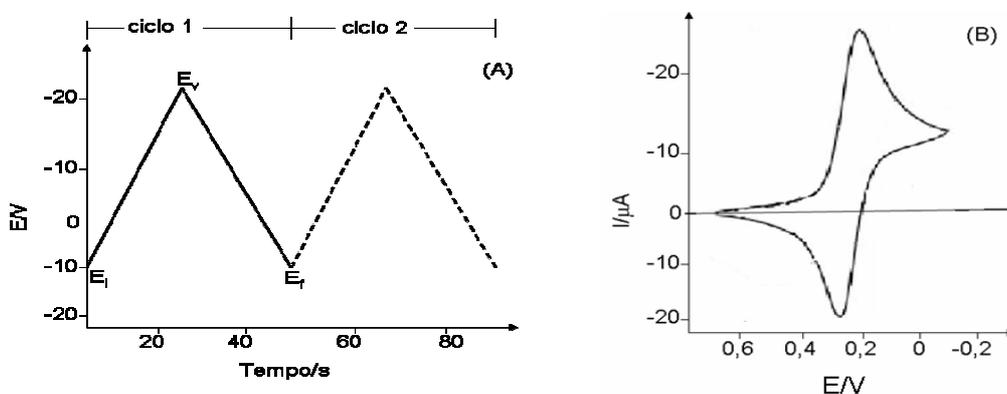


Figura 1.7. (A) Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica. (B) Voltamograma cíclico para um sistema reversível.

O sinal de corrente registrado dá origem ao voltamograma que se trata de uma curva de corrente vs. potencial (Figura 1.7B).

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

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

1.5.2.3 Voltametria de pulso diferencial ^{140,142}

Técnicas voltamétricas de pulso, introduzida por Barker e Jenkin, são destinadas a reduzir os limites de detecção das medidas voltamétricas, devido ao fato de aumentar a relação entre as correntes faradaica e capacitiva. Por causa de seu desempenho, modernas técnicas de pulso têm substituído a polarografia clássica na análise no laboratório. As diferentes técnicas de pulso são todas baseadas em medidas de potencial / corrente. Tanto na polarografia de pulso normal (NPV) quanto a de pulso diferencial (DPV), um pulso de potencial é aplicada para cada gota de mercúrio, quando o eletrodo gotejante de mercúrio é utilizado (ambas as técnicas podem também ser usadas em eletrodos sólidos, neste caso são chamadas voltametria de pulso).

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica extremamente útil para medir vestígios de espécies orgânicas e inorgânicas. Na DPV, a corrente é medida duas vezes, um pouco antes da aplicação do pulso (em S_1) e novamente no final do pulso (após 50 ms, em S_2 , quando a corrente capacitiva decai) (Figura 1.10). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e essa diferença de corrente [$\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$] é colocada em gráfico contra o potencial aplicado. O voltamograma de pulso diferencial resultante (Figura 1.11) consiste de picos de corrente, cuja altura é diretamente proporcional à concentração do analito de interesse.

A maior sensibilidade da voltametria de pulso diferencial pode ser atribuída a duas fontes: uma melhora da corrente faradaica ou uma diminuição da corrente capacitiva. Como a corrente capacitiva cai mais rapidamente que a corrente faradaica, na amostragem de corrente, a corrente capacitiva tende a zero, sendo o sinal analítico máximo (a razão sinal-ruído é máxima). O resultado é uma melhora na sensibilidade do método voltamétrico.

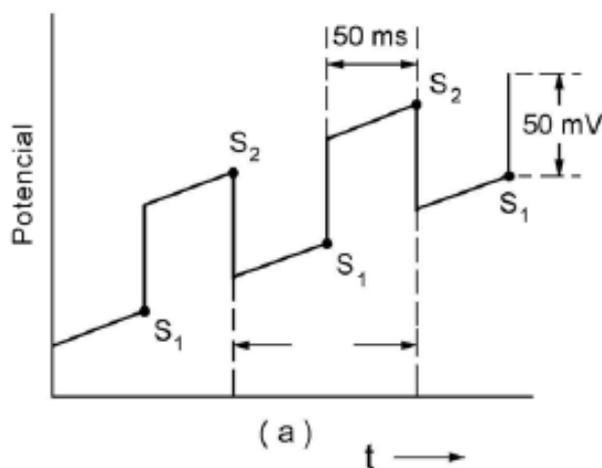


Figura 1.8 Representação esquemática da aplicação de potencial em voltametria de pulso diferencial, onde S_1 e S_2 são as correntes e a diferença entre elas é registrada.

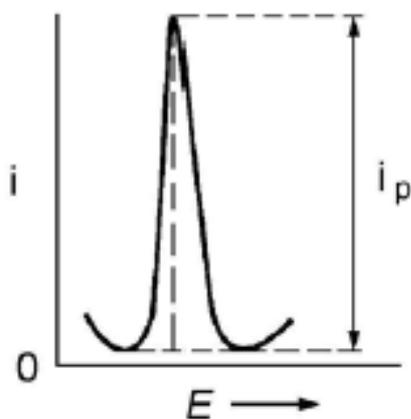


Figura 1.9 Voltamograma de pulso diferencial.

1.5.2.2 Voltametria de onda quadrada (SWV)^{142,143}

O início do desenvolvimento da SWV, do inglês “*Square Wave Voltammetry*” se deu a partir da década de 50, quando Baker aplicou pulsos de potencial em um eletrodo gotejante de mercúrio, e chegou a polarografia de onda quadrada. Porém a técnica desenvolvida por Baker, possuía uma sensibilidade limitada pela reversibilidade do sistema e, principalmente pelos ruídos originários de várias fontes que o capilar de mercúrio juntamente com a coluna captavam e assim, influenciavam intensamente nas respostas de corrente.

Ramaley e Krause desenvolveram a teoria para a voltametria de onda quadrada, com base nos trabalhos de Baker. No entanto, eles utilizaram eletrodos estacionários, eliminando os ruídos provenientes do capilar de mercúrio e também substituíram a rampa linear de potencial por uma rampa de potencial na forma de escada.

Nos trabalhos de Ramaley e Krause entretanto, a discussão ficou limitada a saltos de pequena amplitude e conseqüentemente a baixas velocidades de varredura. Para corrigir estas limitações, em 1977, Chirstie, Turner e Osteryoung, desenvolveram um estudo e chegaram ao modelo mais atual de SWV, onde a medida de corrente era realizada ao final do pulso de potencial, o que possibilitou que as varreduras de corrente em função dos pulsos de potenciais fossem feitas em velocidades superiores a 100 mV s^{-1} .

As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos diretos (no sentido da varredura) e reversos (no sentido oposto da varredura), e o sinal é obtido como uma intensidade da corrente resultante ($\Delta I = I_d - I_r$) que é um sinal obtido diferencialmente, e apresenta excelente sensibilidade e minimização das correntes capacitivas. A

Figura 1.8 apresenta a forma de aplicação de potencial típica da voltametria de onda quadrada. Em seguida, a Figura 1.9 apresenta os voltamogramas teóricos que podem ser obtidos em um sistema reversível (A) e um sistema irreversível (B).

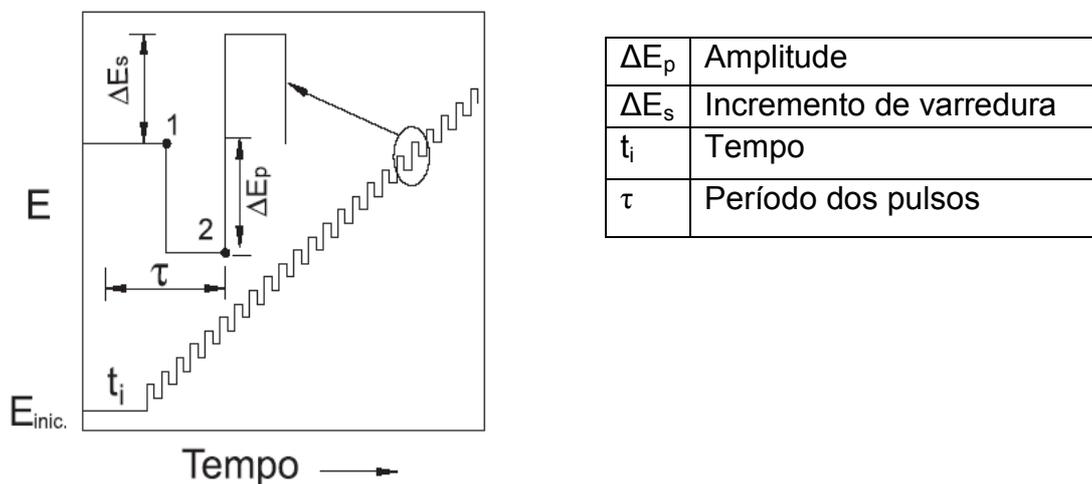


Figura 1.10 Forma de aplicação de potencial na voltametria de onda quadrada.

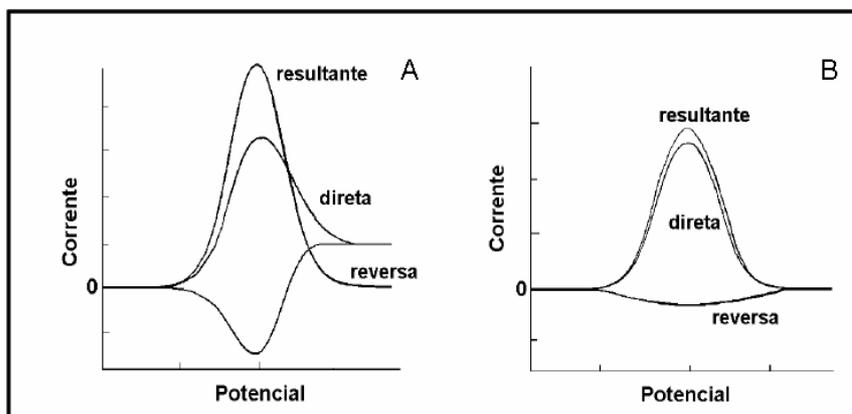


Figura 1.11 Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (A) e para um sistema totalmente irreversível (B).

Uma característica bastante importante, é que observando-se os sinais das varreduras direta e reversa, é possível conseguir informações mecanísticas mais precisas que aquelas obtidas com a voltametria cíclica, onde os sistemas

irreversíveis são pouco atrativos visto que sua sensibilidade e resolução diminuem, pois são dependentes da corrente de pico.

Os critérios de diagnóstico de processos redox na SWV foram desenvolvidos basicamente pelo grupo de Janet Osteryong e o grupo de Milivoj Lovric, e testados de acordo com inúmeros cálculos teóricos, por meio de simulação de reações reversíveis, quase-reversíveis e irreversíveis e considerando as reações com adsorção de reagente e/ou produto. Estes critérios podem fornecer informações com relação a números de elétrons envolvidos no processo redox e informações sobre a cinética de tais processos.

1.6 Objetivos e justificativas

Os objetivos deste trabalho estão relacionados com o desenvolvimento de procedimentos analíticos para as determinações simultâneas de paracetamol e cafeína e de AA e cafeína em formulações farmacêuticas, utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD).

O emprego desse eletrodo para a determinação dos analitos de interesse pode ser justificado por diversos motivos, entre eles: a ampla janela útil de potenciais deste eletrodo, que permite a quantificação destes simultaneamente com outros compostos associados; o fato de que não há necessidade de renovação de sua superfície, podendo melhorar a repetibilidade dos resultados e, também devido ao fato do eletrodo apresentar baixa adsorção.

**CAPÍTULO 2 – PARTE
EXPERIMENTAL**

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de pureza analítica (PA), e todas as soluções foram preparadas com água deionizada.

As soluções de tampão acetato utilizadas como eletrólito suporte foram preparadas adicionando-se soluções de acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ nas devidas proporções de acordo com o pH desejado.

A solução estoque de ácido sulfúrico, também utilizada como eletrólito suporte, foi preparada pela diluição do ácido concentrado para obter a concentração final de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, sendo as demais soluções obtidas a partir da diluição desta solução padronizada.

As soluções estoques de paracetamol na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas previamente ao uso para evitar o processo de hidrólise. Estas soluções foram preparadas dissolvendo-se $0,0194 \text{ g}$ de paracetamol em 100 mL de tampão acetato pH 4,5.

As soluções estoques de cafeína na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram também preparadas previamente ao uso. Estas soluções foram preparadas dissolvendo-se $0,0151 \text{ g}$ de cafeína em 100 mL de tampão acetato pH 4,5. Soluções de cafeína também foram preparadas em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ da mesma maneira que descrita anteriormente.

As soluções estoques de AA na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas previamente ao uso para evitar o processo de hidrólise e também foram

protegidas da luz. Estas soluções foram preparadas dissolvendo-se 0,0176 g de paracetamol em 100 mL de ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹.

A solução de cloreto de potássio 0,1 mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 0,745 g de cloreto de potássio em 100 mL de água deionizada 0,1 mol L⁻¹.

A solução de hexacianoferrato de potássio $1,1 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ foi preparada previamente ao uso, dissolvendo-se 0,905 g de hexacianoferrato de potássio em 25 mL da solução de cloreto de potássio.

2.2. Amostras analisadas

As amostras de fármacos A, B, C, D, utilizadas para a determinação de paracetamol e cafeína foram obtidas nas farmácias locais, e as amostras E, F e G para a determinação de AA e cafeína foram obtidas em Coimbra, Portugal.

Para o preparo das amostras foram macerados 10 comprimidos até a obtenção de um pó fino e as massas de interesse pesadas em balança analítica.

2.2.1. Preparação das amostras para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína

2.2.1.1. Fármacos (A, B, C,D)

Massas de 0,0509 g (A), 0,2198g (B), 0,0498 g (C), e 0,0365 g (D) foram pesadas e transferidas separadamente para balões volumétricos de 25 mL e dissolvidas em tampão acetato pH 4,5. Em seguida, alíquotas de interesse foram

transferidas para a célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito suporte (tampão acetato pH 4,5) e os voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos para cada amostra.

2.2.2. Preparação das amostras para a determinação simultânea de AA e cafeína

2.2.2.1. Fármacos (E, F, G)

Massas de 0,0681 g (E), 0,0952 g (F), 0,1375 g (G), foram pesadas e transferidas para balões volumétricos de 50 mL e dissolvidas em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹. Em seguida, alíquotas de interesse foram transferidas para a célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito suporte (ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹) e os voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos para cada amostra.

2.3. Instrumentação

2.3.1. Medidas eletroanalíticas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT30 (Eco Chemie) gerenciado pelo software GPES 4.9. As medidas de pH das soluções foram realizadas em um pHmetro digital ORION, modelo EA 940.

2.3.2. Célula eletroquímica

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula de compartimento único de 15 mL, confeccionada em vidro Pyrex, contendo como eletrodo de trabalho um eletrodo construído utilizando um filme de diamante dopado com boro (BDD) com área de $0,72 \text{ cm}^2$, onde o filme foi fabricado pelo *Centre Suisse de Electronique ET de Microtechnique AS* (CSEM), em Neuchatêl, Suíça, com um teor de boro de 8000 ppm. O filme de BDD utilizado foi sintetizado pela técnica de HF CVD (Hot Filament Chemical Vapor Deposition), cuja fase gasosa consistia de metano (CH_4), com excesso de hidrogênio (H_2) e o gás de dopagem utilizado foi o trimetilboro. O eletrodo de trabalho foi construído estabelecendo um contato elétrico entre o filme de BDD e uma placa de cobre, utilizando-se para este contato cola da prata. Em seguida, o filme de BDD foi isolado utilizando borracha de silicone, deixando-se a área do eletrodo exposta (Figura 2.1).

O eletrodo de referência utilizado foi o eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e placa de platina como eletrodo auxiliar.

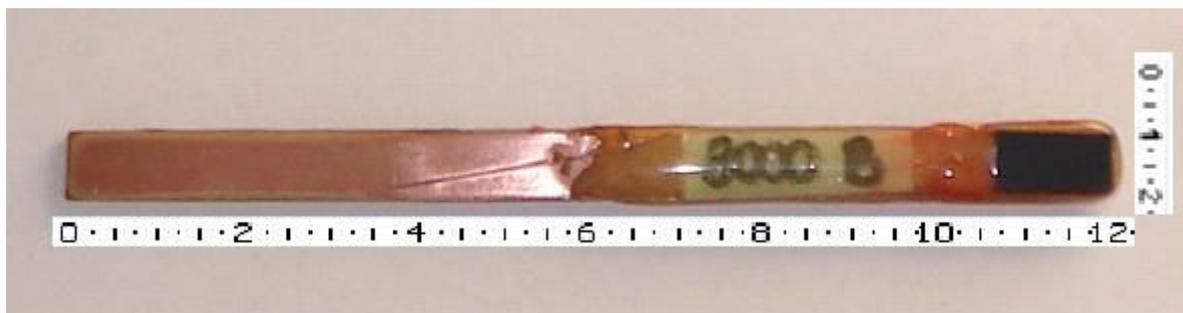


Figura 2.1 Foto do eletrodo de BDD.

O eletrodo de carbono vítreo utilizado para a comparação dos resultados obtidos empregando-se o eletrodo de diamante dopado com boro foi um eletrodo de 3 mm de diâmetro, com área de $0,071 \text{ cm}^2$.

2.4 Metodologia

2.4.1. Voltametria cíclica (CV), de onda quadrada (SWV) e de pulso diferencial (DPV)

Inicialmente utilizou-se a voltametria cíclica para o estudo do perfil voltamétrico do eletrodo BDD para os analitos paracetamol, AA e cafeína em diversos eletrólitos suportes. As técnicas voltametrias de onda quadrada e de pulso diferencial foram utilizadas nos procedimentos eletroanalíticos propostos para a determinação do paracetamol e cafeína e do ácido ascórbico e da cafeína em formulações farmacêuticas nos potenciais selecionadas nos estudos ciclovoltagemétricos.

Após a otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, as curvas analíticas foram obtidas pela adição de alíquotas das soluções padrões na célula eletroquímica. Após cada adição, os voltamogramas foram obtidos. As amostras foram analisadas pelo método de adição de padrão.

2.4.2. Estudo de interferentes

2.4.2.1 Paracetamol e cafeína

O efeito de eventuais interferentes foi investigado através da adição de outros compostos em uma solução contendo $1,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ paracetamol e/ou cafeína em tampão acetato (pH 4.5). Cada um dos possíveis interferentes foi adicionado à

solução inicial nas razões de concentrações de 10:1, 1:1 e 1:10 e, os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos usando-se apenas a solução padrão de paracetamol e/ou cafeína. Sacarina, carbonato de sódio, dipirona, ácido cítrico e ácido acetilsalicílico, excipientes que podem estar presentes nas amostras, foram então estudados.

2.4.2.2 AA e cafeína

O efeito de eventuais interferentes foi investigado através da adição de outros compostos em uma solução contendo $1,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AA e/ou cafeína em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹. Cada um dos possíveis interferentes foi adicionado à solução inicial nas razões de concentrações de 10:1, 1:1 e 1:10, os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos empregando apenas a solução padrão de ácido ascórbico e/ou cafeína. Sacarina, carbonato de sódio, dipirona, paracetamol, ácido cítrico e ácido acetilsalicílico, todos os excipientes que podem estar presentes nas amostras foram assim estudados.

2.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

A técnica mais comumente utilizada para a determinação destes fármacos é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo essa técnica selecionada como técnica padrão para a determinação dos teores de paracetamol, AA e cafeína em todas as amostras comerciais que foram empregadas neste trabalho.

Para a determinação de paracetamol e cafeína, as medidas cromatográficas foram realizadas simultaneamente em um cromatógrafo modelo LC-10AT Shimadzu

com detector de UV-VIS modelo SPD-M10AVP e coluna Shim-Pack CLC-ODS (6.0 × 150 mm, 5 μm). A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (25/75 v/v) pH_{cond} 2,5, com vazão de 0,8 mL min⁻¹, comprimento de onda de 273 nm para paracetamol e cafeína e o volume de injeção foi de 40 μL¹⁴⁴.

Para a determinação de AA e CAF, as medidas cromatográficas também foram realizadas em um cromatógrafo modelo LC-10AT Shimadzu com detector de UV-VIS modelo SPD-M10AVP e coluna Shim-Pack CLC-ODS (4,6 × 150 mm, 5 μm). A fase móvel utilizada foi metanol/água (35/65 v/v) pH_{cond.} 3,1, com vazão de 1,3 mL min⁻¹, e os comprimentos de onda foram de 234 nm para o ácido áscorbico e 273 nm para cafeína e, o volume injetado da amostra foi 40 μL^{144,145}. O detector empregado foi um de arranjo de fotodiodos, sendo assim possível fazer a determinação simultânea em comprimentos de onda distintos ou em intervalo de comprimento de ondas de interesse.

2.5. O eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

2.5.1. Tratamento do eletrodo de BDD

Para o estudo do pré-tratamento do eletrodo, optou-se por realizar um pré-tratamento anódico e catódico sob o eletrodo de diamante dopado com boro. No tratamento catódico foi aplicada ao eletrodo uma corrente de -1,0 A cm⁻² por 180 s em ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹. Este procedimento foi realizado antes de se iniciar as medidas voltamétricas, fazendo-se primeiramente um pré-tratamento anódico (1,0 A cm² por 40 s), com a finalidade de limpar o eletrodo e logo após o tratamento catódico.

2.5.2. Estudo da área ativa do eletrodo de BDD

Inicialmente, empregando a técnica de voltametria cíclica e o eletrodo de diamante dopado com boro, foi determinada a área ativa desse eletrodo nos diferentes tipos de pré-tratamentos. Neste estudo uma solução de hexacianoferrato de potássio $1,1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de cloreto de potássio (KCl) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi empregada.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Será apresentado inicialmente um estudo sobre o eletrodo de diamante dopado com boro, e em seguida, são apresentados os resultados obtidos nos experimentos realizados com o paracetamol, ácido ascórbico e a cafeína (separados e simultaneamente) sob o eletrodo de BDD, utilizando as técnicas de voltametria cíclica, de onda quadrada e de pulso diferencial.

3.1. O eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

3.1.1. Tratamento do eletrodo de BDD

Com o objetivo de obter uma melhora na resposta eletroquímica do eletrodo para a determinação dos analitos de interesse, optou-se por realizar um pré-tratamento anódico e catódico no eletrodo de diamante dopado com boro e avaliar a melhora ou não da resposta voltamétrica. Como pode ser observado na Figura 3.1. (A) o tratamento catódico apresentou um pequeno aumento na magnitude de corrente de pico e diminuição do sobrepotencial de trabalho para a determinação do paracetamol. Já para a cafeína (Figura 3.1. (B)) não houve diferença entre os dois tratamentos. No caso do AA (Figura 3.1. (C)), o tratamento catódico também proporcionou um aumento da magnitude de corrente de pico e diminuição do potencial de pico. Como sugerem Suffredini et al.¹³⁹ baseado nos estudos de impedância, a melhora no sinal analítico é mais acentuada com o tratamento

catódico quando comparada ao tratamento anódico, devido provavelmente à presença de uma camada passiva sobre a superfície do eletrodo após o tratamento anódico. Assim, nos estudos futuros, foram feitos pré-tratamentos catódicos no eletrodo, previamente as medidas voltamétricas. Um tratamento do eletrodo foi suficiente para se trabalhar de 8 a 10 horas com o eletrodo sem decréscimo do sinal analítico.

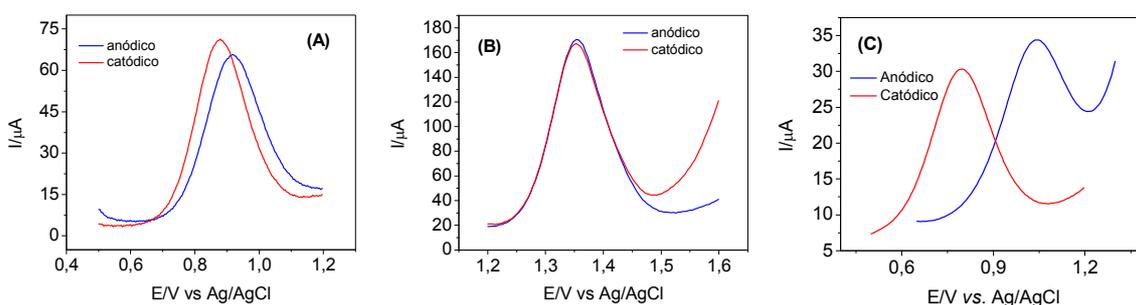


Figura 3.1 Voltamogramas de onda quadrada do (A) paracetamol $9,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (B) cafeína $9,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (C) AA $9,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o BDD com pré-tratamento catódico e anódico. ($f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

3.1.2. Determinação da área ativa do eletrodo

A área ativa de um eletrodo pode ser determinada pela seguinte equação (equação de Randles-Sevcik)¹⁴⁰:

$$I_p/v^{1/2} = 2,69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} C \quad (1)$$

Onde,

A = área ativa (cm^2)

D = coeficiente de difusão (cm^2/s)

n = número de elétrons envolvidos na reação

$v^{1/2}$ = raiz quadrada da velocidade (V/s)

I_p = corrente de pico (A)

C = concentração (mol/ cm³)

Utilizando a voltametria cíclica foi realizado um experimento utilizando hexacianoferrato, espécie eletroativa que tem um perfil eletroquímico reversível e cujo coeficiente de difusão em cloreto de potássio 0,10 mol L⁻¹ é conhecido. Assim, variando-se as velocidades de varredura obteve-se um gráfico de corrente em função da raiz da velocidade de varredura (figura não apresentada).

Utilizando-se uma concentração de hexacianoferrato de $3,2 \times 10^{-6}$ mol cm⁻³ ($1,1 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹), em eletrólito suporte de cloreto de potássio 0,1 mol L⁻¹ e empregando-se o valor do coeficiente de difusão do hexacianoferrato de $6,2 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹ nesta solução, com os valores das correntes de pico, foi possível se determinar a área ativa do eletrodo. Utilizando-se a equação **(1)**, calculou-se a área ativa do eletrodo de diamante dopado com boro nas condições seguintes: a) sem tratamento, b) com tratamento anódico e c) com tratamento catódico. As respectivas áreas ativas encontradas foram 0,40 cm², 0,50 cm² e 0,52 cm² mostrando que o tratamento eletroquímico aumentou a área ativa do eletrodo, sendo essas menores que à área geométrica (0,72 cm²). O fato do valor obtido para a área ativa do eletrodo ser inferior a área geométrica é porque nem toda a superfície do eletrodo contém boro (regiões eletroativas) que é a espécie que promove a transferência eletrônica na superfície do eletrodo.

3.2. Avaliação da resposta eletroquímica do paracetamol sobre o eletrodo de BDD

Foram realizados experimentos de voltametria cíclica, a fim de avaliar a resposta eletroquímica do paracetamol sobre o eletrodo de BDD. Voltametrias de onda quadrada e de pulso diferencial também foram utilizadas para a comparação das respostas voltamétricas.

3.2.1. Voltametria cíclica

Foram realizados experimentos preliminares de voltametria cíclica, a fim de se observar a presença de processos de oxidação ou de redução do paracetamol sobre a superfície do eletrodo de BDD. Os resultados experimentais, obtidos com a voltametria cíclica, mostraram que o paracetamol apresentou resposta eletroativa no sentido positivo de varredura, ou seja, ocorre um processo de oxidação do analito sobre o eletrodo de BDD.

A Figura 3.2 apresenta o comportamento quase-reversível do paracetamol, na faixa de potencial de -0,5 a 1,5 V. No entanto, como será observado, no intervalo de potencial selecionado neste trabalho (0,5 a 1,1 V), os voltamogramas para o paracetamol se mostraram irreversíveis. Estes resultados estão de acordo com os resultados relatados na literatura¹⁴⁶.

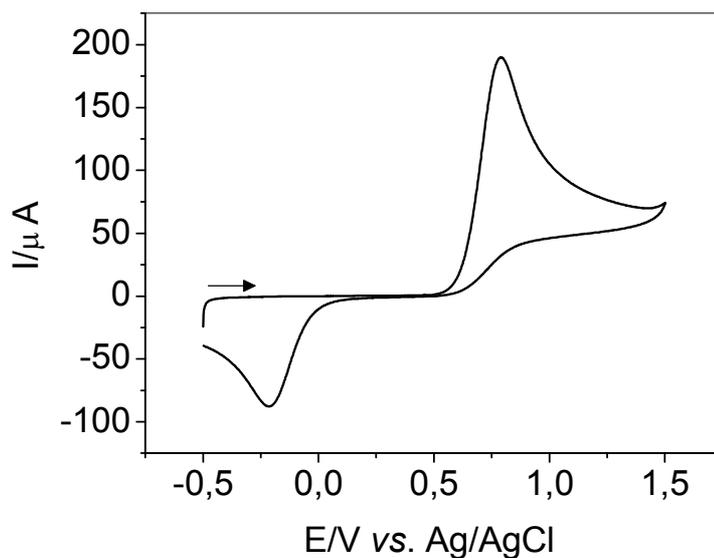


Figura 3.2 Voltamograma cíclico obtido para o paracetamol em solução de tampão acetato pH 4,5 e velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura foram obtidos para o paracetamol (Figura 3.3), assim a dependência da corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais (intervalos de 1 a 150 mV s^{-1}) também foi investigada (Figura 3.3.).

Em todo processo voltamétrico a reação pode ser limitada pelo transporte de massa e/ou pela taxa de transferência eletrônica, a etapa mais lenta é que determina o processo da reação. O fato da corrente de pico apresentar relação linear com a velocidade de varredura é um indicativo de que o processo redox é controlado por transporte de massa.

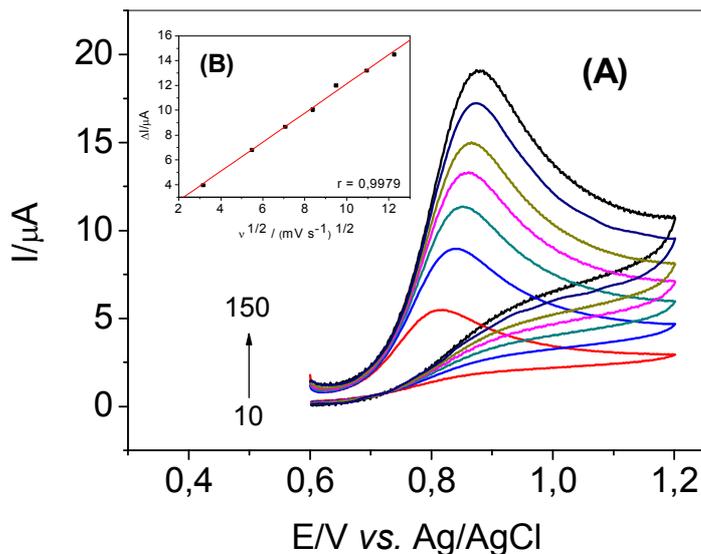


Figura 3.3 (A) Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (10, 30, 50, 70, 90, 120, e 150 mV/s) para o paracetamol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato pH 4,5. (B) variação da intensidade de corrente de pico com a velocidade de varredura na presença de paracetamol.

O gráfico do logaritmo da intensidade de corrente de pico anódica em função do logaritmo da velocidade de varredura (Figura 3.4.) apresentou comportamento linear com inclinação de 0,46. Este valor está próximo daquele previsto na literatura¹⁴⁷ (0,5) para sistemas onde o processo redox é controlado pelo transporte de massa, resultado concordante com aquele obtido na Figura 3.3.

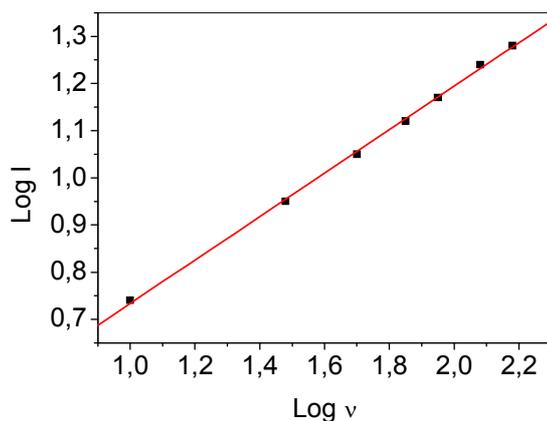


Figura 3.4 Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o paracetamol em tampão acetato pH 4,5.

3.2.1.1. Estudo do efeito do meio

Experimentos iniciais para o paracetamol foram realizados em diferentes eletrólitos suporte como tampão fosfato (pH 7,0), tampão BR (pH 2,3), tampão acetato (pH 4,8), ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ e nitrato de sódio 0,5 mol L⁻¹. Os voltamogramas obtidos para o paracetamol, nos diferentes eletrólitos suporte, estão apresentados na Figura 3.5. O eletrólito suporte escolhido foi o tampão acetato, uma vez que proporcionou uma boa resposta, tendo um perfil voltamétrico bem definido e apresentando um potencial de pico menor, quando comparado aos demais eletrólitos estudados.

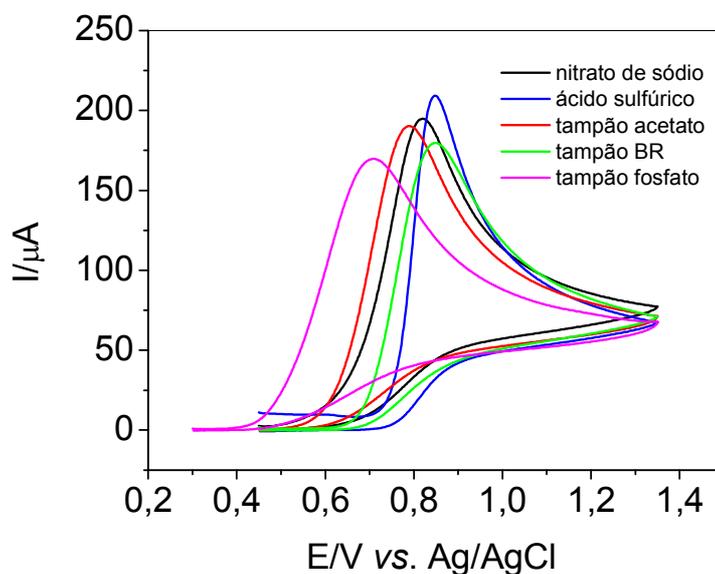


Figura 3.5 Voltamogramas cíclicos para a oxidação de paracetamol $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em diferentes eletrólitos suporte e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Escolhido o tampão acetato, estudou-se o efeito do pH destas soluções variando de 3,4 a 5,6, para uma solução de paracetamol $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, sendo o valor de pH selecionado igual a 4,5 por apresentar melhor perfil voltamétrico.

3.2.2. Voltametria de onda quadrada (SWV)

O voltamograma de onda quadrada apresentou um pico de oxidação para o paracetamol em torno de 0,70 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), valor próximo aquele obtido no estudo ciclovolamétrico.

Nas respostas obtidas com a SWV, o pulso no sentido direto produz uma corrente anódica, enquanto o pulso no sentido inverso gera corrente catódica, sendo a diferença dessas correntes obtida como um voltamograma resultante. A análise destes voltamogramas separados (voltamogramas de oxidação, redução e resultante) pode proporcionar uma avaliação prévia do tipo de reação redox que ocorre no sistema em estudo.

A Figura 3.6 apresenta a separação das componentes de corrente para o paracetamol sobre o eletrodo de BDD. Observa-se que a corrente resultante é menor que a corrente direta e, ainda, a corrente reversa apresenta pico no sentido anódico no lugar onde não deveria aparecer pico, uma vez que o processo é irreversível, como visto no estudo de voltametria cíclica. Este tipo de comportamento é geralmente observado quando a velocidade de varredura de potencial (frequência x incremento de varredura) é relativamente alta restando na superfície do eletrodo pequena concentração da espécie eletroativa que é oxidada, apesar da inversão do pulso de potencial ter sido aplicado no sentido catódico.

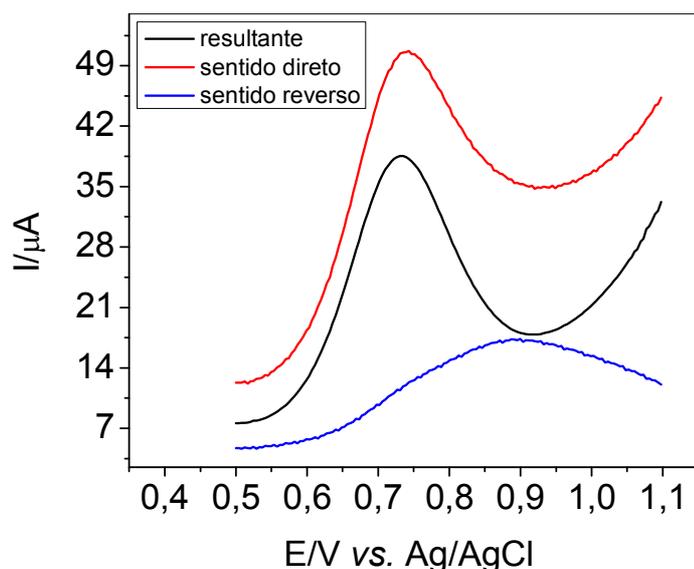


Figura 3.6 Voltamogramas de onda quadrada do paracetamol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5 ($f = 70 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

Na onda quadrada, os sinais podem depender de parâmetros instrumentais como, frequência, amplitude e incremento de potencial. Os efeitos desses parâmetros sobre o potencial de pico e correntes de pico para a determinação de paracetamol foram estudados e otimizados.

Segundo a teoria de onda quadrada, para sistemas controlados por difusão das espécies, a intensidade de corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da frequência de aplicação dos pulsos. A Figura 3.7 mostra o comportamento da corrente de pico em função da variação da raiz quadrada da frequência da onda quadrada para o paracetamol. Observa-se que a intensidade de corrente de pico varia quase linearmente com a raiz quadrada da frequência de onda quadrada, uma vez que as equações empregadas neste trabalho foram deduzidas empregando-se eletrodo gotejante de mercúrio, mostrando assim que o processo de

oxidação do paracetamol sobre o BDD deve ser, preferencialmente, controlado por difusão das espécies.

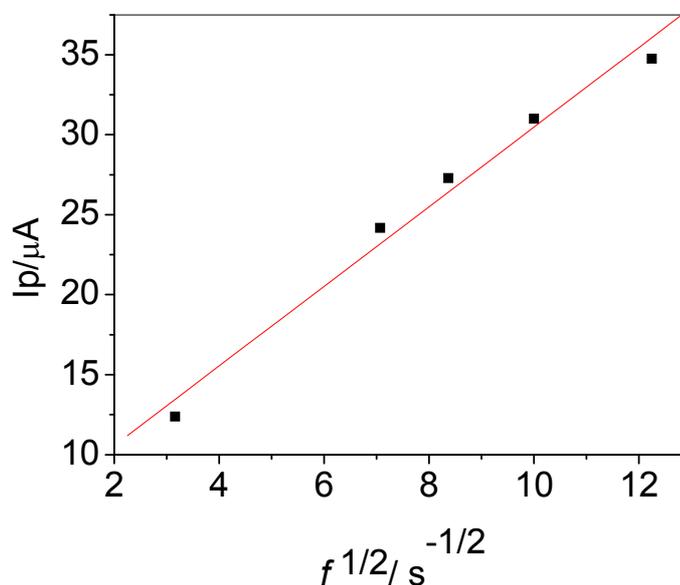


Figura 3.7 Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da frequência de onda quadrada para a oxidação do paracetamol, $r = 0,9915$.

Estudando-se o efeito da variação da amplitude foi possível obter um gráfico da variação da corrente de pico em função da amplitude da onda quadrada. Considerando-se apenas a parte linear do gráfico obtido (não mostrado), calculou-se a área de recobrimento do eletrodo (Γ), empregando-se o coeficiente angular da reta obtida (equação (2)).

$$I_p = (5 \times 10^2 \times A \times \alpha \times n^2 \times F \times f \times \Delta E) \Gamma \times a \quad (2)$$

Onde, A é área do eletrodo (cm^2), n é o número de elétrons, α é o coeficiente de transferência, F é a constante de Faraday, a é a amplitude da onda quadrada

(mV), ΔE é o incremento de varredura (V), f é a frequência da onda quadrada (s^{-1}) e I_p é corrente de pico de oxidação (μA).

O valor obtido de área de recobrimento Γ para espécie adsorvida foi igual a $5,9 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$, mostrando que a quantidade de matéria de produto adsorvida na superfície do eletrodo é baixa. Este resultado é concordante com uma importante propriedade do eletrodo de BDD que é a baixa adsorção.

A Tabela 3.1 apresenta os parâmetros de onda quadrada estudados e os valores selecionados para cada parâmetro.

Tabela 3.1- Parâmetros investigados de voltametria de onda quadrada (SWV) e os valores selecionados para a determinação de paracetamol

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Frequência f (s^{-1})	10 - 150	70
Amplitude α (mV)	10 - 100	50
Incremento de varredura ΔE_s (mV)	1 - 7	4

3.2.2.1. Construção da curva analítica

Após a otimização dos parâmetros que envolvem a voltametria de onda quadrada, a curva analítica foi construída pela adição de pequenas alíquotas da solução padrão de paracetamol. O valor calculado para o limite de detecção foi três vezes o desvio padrão de dez brancos, dividido pelo coeficiente linear da curva analítica, obtendo-se o valor de $2,34 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 3.8. (A) mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos variando-se a concentração de paracetamol de 1 a 15 ((1) $3,00 \times 10^{-7}$, (2) $9,00 \times 10^{-7}$, (3) $2,00 \times 10^{-6}$, (4) $3,98 \times 10^{-6}$, (5) $5,96 \times 10^{-6}$, (6) $7,94 \times 10^{-6}$, (7) $9,90 \times 10^{-6}$, (8) $1,96 \times 10^{-5}$, (9) $2,91 \times 10^{-5}$, (10)

$3,85 \times 10^{-5}$, (11) $4,76 \times 10^{-5}$, (12) $5,66 \times 10^{-5}$, (13) $6,54 \times 10^{-5}$, (14) $1,45 \times 10^{-4}$ e (15) $2,12 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e a Figura 3.8. (B) a curva analítica. A equação da reta obtida foi: $(I_p/\mu\text{A}) = 0,0649 + 6,16 \times 10^5 [\text{paracetamol}] \text{ mol L}^{-1}$ e o coeficiente de correlação foi igual a 0,9999.

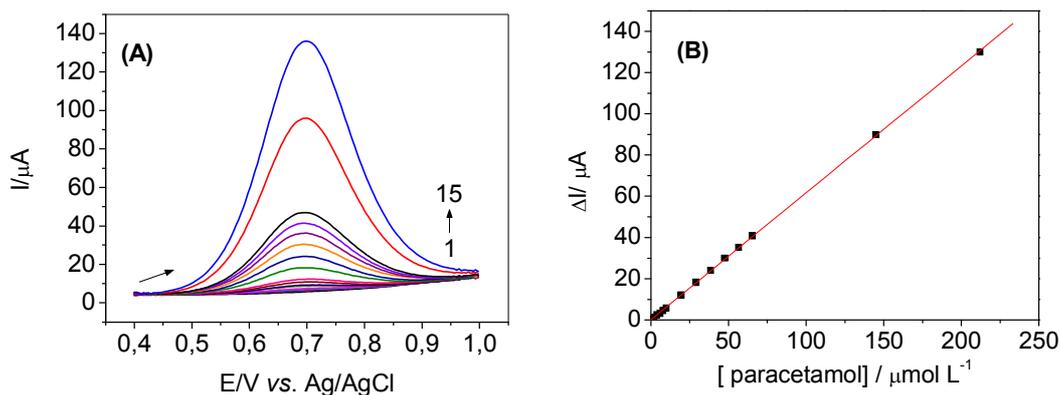


Figura 3.8 (A) Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de (A) paracetamol ((1 a 15): $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,12 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$. ($f = 70 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 50$, $\Delta E_s = 4$). (B) Curva analítica para o paracetamol obtida empregando o eletrodo de BDD e SWV.

3.2.3. Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial também foi utilizada para desenvolver o método de determinação de paracetamol, sendo a seleção das melhores condições experimentais e parâmetros instrumentais investigados. Assim, o efeito de cada um destes parâmetros sobre o pico de potencial e a intensidade de corrente de pico para o paracetamol foram estudados e selecionados, como apresentado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Parâmetros de voltametria de pulso diferencial (DPV) estudados e os valores selecionados para a determinação de paracetamol

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Tempo de modulação t (ms)	5 - 20	7
Amplitude a (mV)	25 - 150	100
Velocidade ν (mV s ⁻¹)	2,5 - 100	70

3.2.3.1. Construção da curva analítica

Após a otimização dos parâmetros que envolvem a voltametria de pulso diferencial, a curva analítica foi construída pela adição de pequenas alíquotas da solução padrão de paracetamol. O valor calculado para o limite de detecção foi três vezes o desvio de dez brancos dividido pelo coeficiente linear da curva analítica sendo obtido um valor de $4,98 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A Figura 3.9. (A) mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos variando-se a concentração de paracetamol de 1 a 16 ((1) $6,00 \times 10^{-7}$, (2) $2,00 \times 10^{-6}$, (3) $3,98 \times 10^{-6}$, (4) $5,96 \times 10^{-6}$, (5) $7,94 \times 10^{-6}$, (6) $9,90 \times 10^{-6}$, (7) $1,96 \times 10^{-5}$, (8) $2,91 \times 10^{-5}$, (9) $3,85 \times 10^{-5}$, (10) $4,76 \times 10^{-5}$, (11) $5,66 \times 10^{-5}$, (12) $6,54 \times 10^{-5}$, (13) $7,41 \times 10^{-5}$, (14) $8,26 \times 10^{-5}$, (15) $9,10 \times 10^{-5}$ e (16) $1,67 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e a Figura 3.9. (B) a curva analítica do paracetamol. A equação da reta obtida foi: $(I_{pa}/\mu A) = 1,07 + 0,472 \times 10^6$ [paracetamol] mol L⁻¹ e o coeficiente de correlação foi igual a 0,9995.

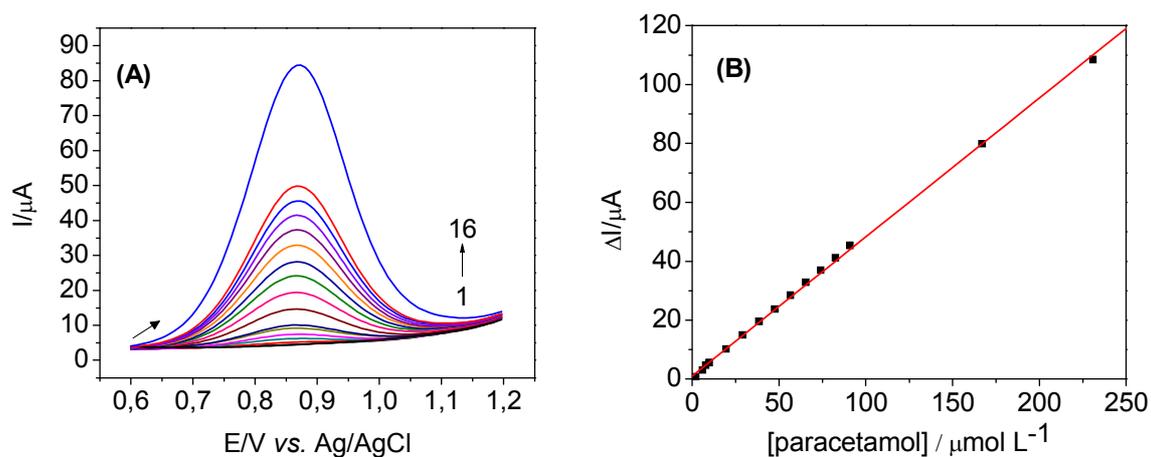


Figura 3.9 (A) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de paracetamol (1 a 16: $6,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=4,5$ ($t = 7\text{mV s}^{-1}$; $a = 100\text{mV}$; $v = 70\text{mV s}^{-1}$). (B) Curva analítica do paracetamol sob o eletrodo de BDD por DPV.

3.2.4. Comparação das técnicas de SWV e DPV na determinação de paracetamol

Após os estudos e otimização de todos os parâmetros de voltametria de onda quadrada e de pulso diferencial, e a construção das curvas analíticas para a determinação do paracetamol por estas duas técnicas, foi possível fazer uma comparação entre os resultados obtidos.

A Tabela 3.3 mostra alguns dados comparativos entre as duas técnicas para a determinação de paracetamol.

Tabela 3.3 - Comparação das técnicas voltamétricas de onda quadrada e de pulso diferencial para a determinação do paracetamol

Parâmetros	Voltametria de Onda Quadrada	Voltametria de Pulso Diferencial
Equação da Retra (Ipa/μA)	$0,0649 + 6,16 \times 10^5$ [paracetamol] mol L ⁻¹	$1,07 + 4,72 \times 10^5$ [paracetamol] mol L ⁻¹
Limite de detecção (mol L⁻¹)	$2,34 \times 10^{-7}$	$4,98 \times 10^{-7}$
Intervalo de resposta linear (mol L⁻¹)	$3,00 \times 10^{-7}$ a $2,12 \times 10^{-4}$	$6,00 \times 10^{-7}$ a $1,67 \times 10^{-4}$
Sensibilidade (μA mol⁻¹L)	$6,16 \times 10^5$	$4,72 \times 10^5$

3.3. Avaliação da resposta eletroquímica da cafeína sobre o eletrodo de BDD

Foram realizados experimentos de voltametria cíclica a fim de avaliar a resposta eletroquímica da cafeína sobre eletrodo de BDD. Voltametrias de onda quadrada e de pulso diferencial também foram utilizadas para a análise da melhor técnica a ser utilizada na determinação da cafeína.

3.3.1. Voltametria cíclica

Foram realizados experimentos preliminares de voltametria cíclica a fim de se observar a presença de processos redox da cafeína sobre a superfície do eletrodo de BDD. Os resultados obtidos nos experimentos de voltametria cíclica mostraram que a cafeína apresenta um processo de oxidação sobre o eletrodo de BDD.

A Figura 3.10 apresenta o comportamento eletroquímico irreversível da cafeína, em tampão acetato pH 4,5, sendo que estes resultados obtidos estão de acordo com os resultados relatados na literatura para esse analito ⁷².

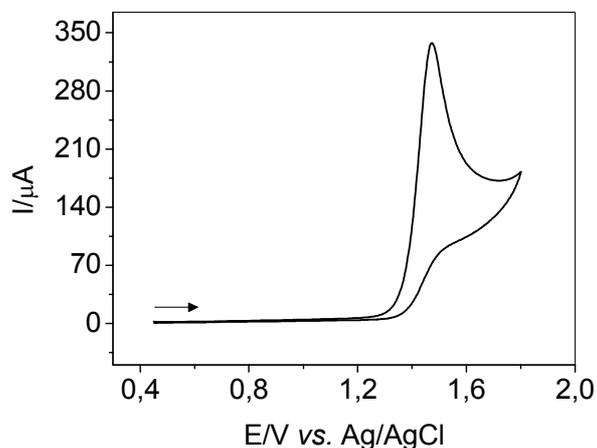


Figura 3.10 Voltamograma cíclico obtido para a cafeína em solução de tampão acetato pH 4,5 e velocidade de varredura 50mV s^{-1} .

A dependência da corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais (intervalos de 1 a 150 mV s^{-1}) também foi investigada (Figura 3.11.). A existência de uma linearidade entre as correntes de pico anódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura indica que o processo redox é controlado pelo transporte de massa, como já descrito na literatura ⁷².

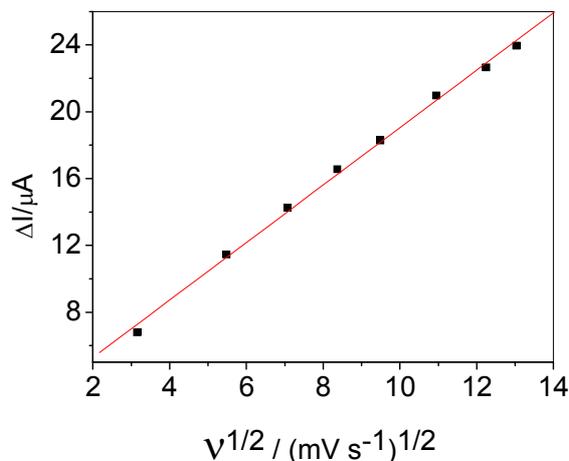


Figura 3.11 Variação da intensidade de corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de cafeína $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato pH 4,5.

O gráfico do logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (Figura 3.12.) apresentou comportamento linear com inclinação de 0,47. Este valor está próximo do previsto pela literatura (0,5) para sistemas controlados pelo transporte de massa ¹⁴⁷ e concordantes com aquele obtido na Figura 3.11.

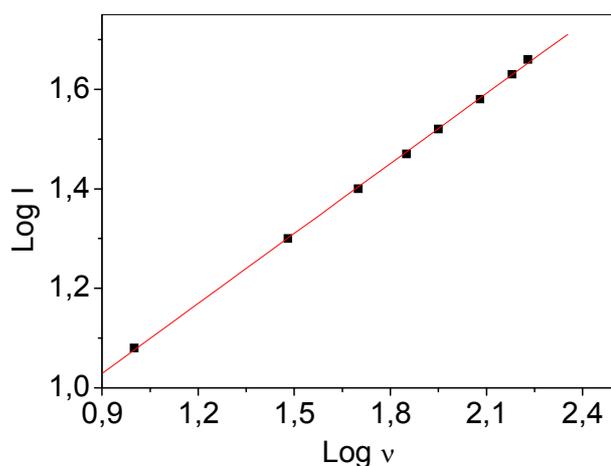


Figura 3.12 Dependência do logaritmo da intensidade de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para a cafeína em tampão acetato pH 4,5.

3.3.1.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte

Experimentos iniciais para a cafeína foram realizados em diferentes eletrólitos suporte tais como: tampão fosfato (pH 7,0), tampão BR (pH 2,3), tampão acetato (pH 4,8), ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e nitrato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas obtidos para a cafeína nos diferentes eletrólitos suporte estão apresentados na Figura 3.13. O eletrólito suporte escolhido foi o tampão acetato uma vez que proporcionou uma boa resposta para o processo de oxidação da cafeína tendo um perfil voltamétrico bem definido e apresentando um potencial de pico menor quando comparado aos obtidos em outros eletrólitos suporte.

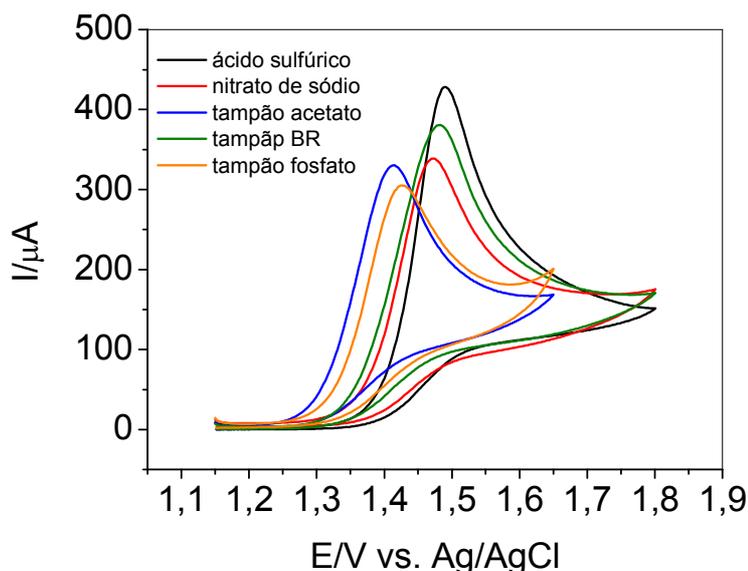


Figura 3.13 Voltamogramas cíclicos para a oxidação de cafeína $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte e velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} .

Após escolha do tampão acetato, estudou-se o efeito do pH variando de 3,4 a 5,6 sobre a resposta voltamétrica de cafeína $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sendo selecionado o pH 4,5 para os estudos posteriores, por apresentar melhor perfil voltamétrico e maior intensidade de corrente.

3.3.2. Voltametria de onda quadrada

Nas respostas obtidas com a SWV, o pulso no sentido direto produz uma corrente catódica, enquanto o pulso no sentido inverso gera outra corrente, a diferença nessas correntes é obtida como resposta na forma de um voltamograma.

A separação dos voltamogramas obtidos de oxidação e redução das espécies, assim como do voltamograma resultante podem fornecer informações relevantes do sistema redox em estudo como reversibilidade, irreversibilidade e velocidade de transferência de carga.

A Figura 3.14 apresenta as componentes de corrente para a cafeína sobre o eletrodo de BDD. Observa-se que a corrente resultante é bastante semelhante à corrente direta e ainda, a corrente reversa não apresenta pico. Este comportamento é característico de sistemas totalmente irreversíveis, sendo que esse comportamento e potencial (1,39 V) obtido são concordantes com aquele obtido por voltametria cíclica.

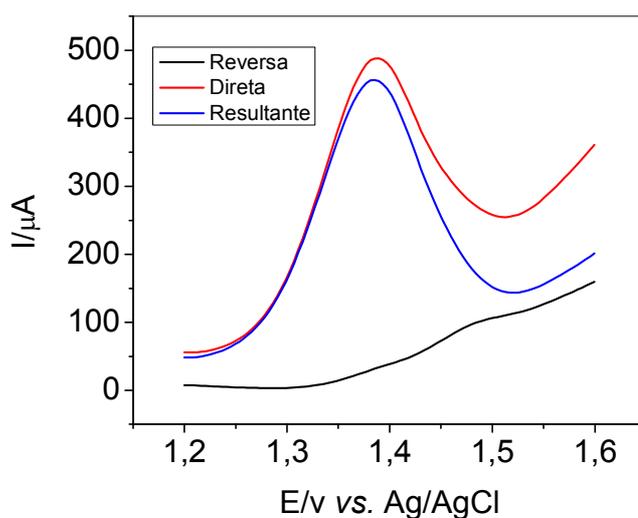


Figura 3.14 Voltamogramas de onda quadrada da cafeína $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5 ($f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

O efeito dos parâmetros instrumentais (frequência, amplitude e incremento de varredura) da voltametria de onda quadrada sobre o potencial o potencial de pico e correntes de pico, para a determinação de cafeína foram estudados e otimizados.

Segundo a teoria de onda quadrada para sistemas controlados pela adsorção das espécies, a intensidade de corrente varia linearmente com a frequência de aplicação dos pulsos. A Figura 3.15 mostra os voltamogramas de onda quadrada e o comportamento da corrente de pico em função da frequência de onda quadrada para a cafeína. Observa-se que a intensidade de corrente de pico varia linearmente com a frequência da onda quadrada, mostrando que o processo de oxidação da cafeína sobre o BDD pode ser controlado por adsorção dos reagentes ou dos produtos. No entanto, observando-se os diversos experimentos eletroanalíticos para cafeína, pode-se notar que não houve queda do sinal analítico na oxidação do analito após sucessivas medidas, sugerindo assim que a adsorção é devida a esse analito e não aos produtos da reação. O resultado obtido anteriormente também pode ser confirmado com os dados apresentados a seguir, onde pode ser observado que a área de recobrimento (produto da reação) (Γ) no eletrodo é pequena ($7,3 \times 10^{-11}$ mol cm^{-2}), corroborando assim com os resultados obtidos anteriormente, de que a cafeína é adsorvida preferencialmente.

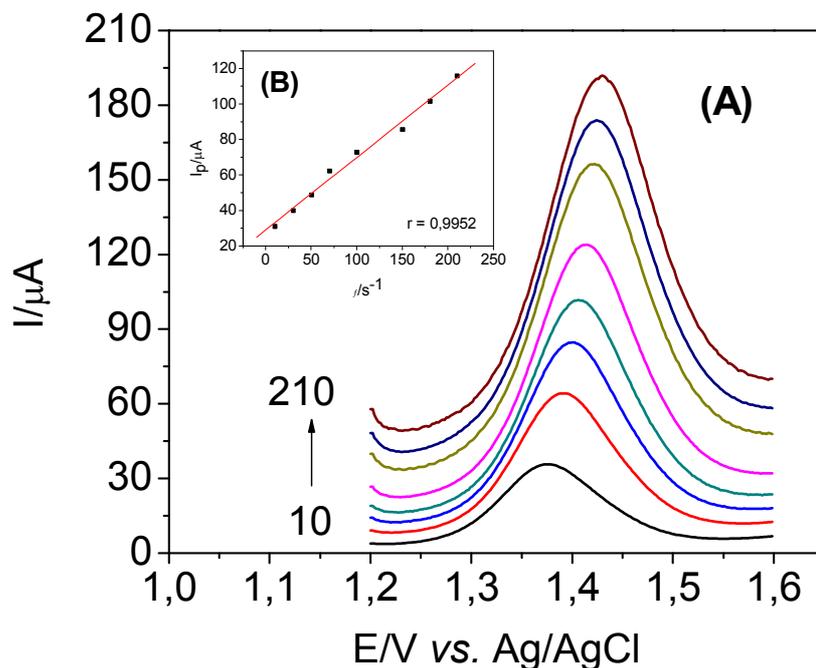


Figura 3.15 (A) Voltamogramas de onda quadrada para a cafeína em diferentes freqüências de aplicação dos pulsos de potenciais, 10, 30, 50, 70, 100, 150, 180, 210 s^{-1} , usando-se $a = 40$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV, cafeína $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} em tampão acetato pH 4,45. (B) Corrente de pico em função da freqüência de onda quadrada para a cafeína.

No estudo da variação da amplitude da onda quadrada em função da variação da corrente de pico (figura não apresentada) foi possível encontrar a área de recobrimento superficial da espécie adsorvida (Γ), empregando-se o coeficiente angular da reta e a equação (2). O valor obtido para Γ da espécie adsorvida (produto) foi igual a $7,3 \times 10^{-11}$ mol cm^{-2} que, como discutido, a quantidade de matéria do produto adsorvida na superfície do eletrodo é baixa.

A Tabela 3.4 apresenta os parâmetros estudados para a voltametria de onda quadrada e os valores selecionados para cada parâmetro da técnica.

Tabela 3.4- Parâmetros investigados de voltametria de onda quadrada (SWV) e os valores selecionados para a determinação de cafeína

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Frequência f (S^{-1})	10 - 150	70
Amplitude a (mV)	10 - 100	50
Incremento de varredura ΔE_s (mV)	1 - 7	4

3.3.2.1. Construção da curva analítica

Após a otimização dos parâmetros que envolvem a voltametria de onda quadrada, as curvas analíticas foram construídas pela adição de pequenas alíquotas da solução padrão de cafeína. O valor calculado para o limite de detecção foi três vezes o desvio padrão de dez brancos dividido pelo coeficiente linear da curva analítica, obtendo-se um valor de $1,44 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para a cafeína. A Figura 3.16 (A) mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos variando-se a concentração de cafeína de 1 a 17 ((1) $2,00 \times 10^{-6}$, (2) $3,98 \times 10^{-6}$, (3) $5,96 \times 10^{-6}$, (4) $7,94 \times 10^{-6}$, (5) $9,90 \times 10^{-6}$, (6) $1,96 \times 10^{-5}$, (7) $2,91 \times 10^{-5}$, (8) $3,85 \times 10^{-5}$, (9) $4,76 \times 10^{-5}$, (10) $5,66 \times 10^{-5}$, (11) $6,54 \times 10^{-5}$, (12) $7,41 \times 10^{-5}$, (13) $8,26 \times 10^{-5}$, (14) $9,10 \times 10^{-5}$, (15) $1,67 \times 10^{-4}$, (16) $2,31 \times 10^{-6}$, e (17) $2,86 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). A curva analítica pode ser observada na Figura 3.16 (B) e a equação da reta obtida foi: $(I_{pa}/\mu A) = 3,69 + 1,32 \times 10^6 [\text{cafeína}] \text{ mol L}^{-1}$ e coeficiente de correlação igual 0,9992.

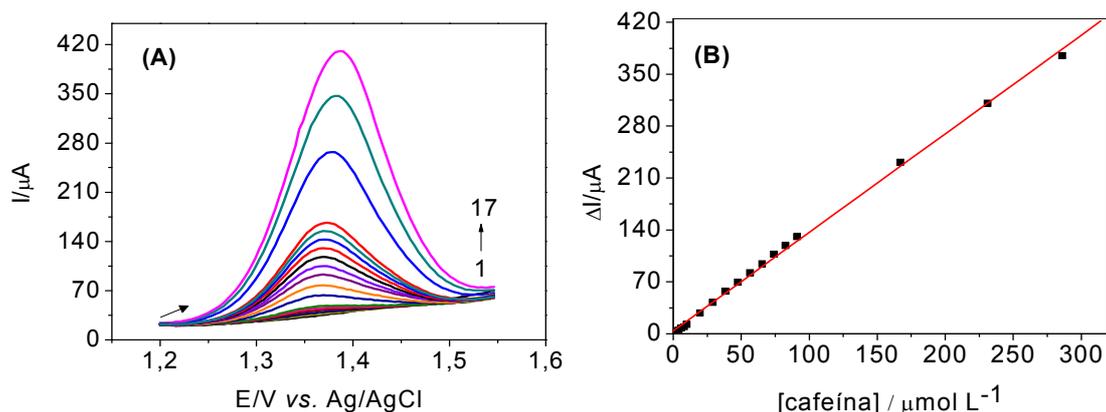


Figura 3.16 (A) Voltamogramas de onda quadrada (SWV) em diferentes concentrações de cafeína (1 a 17: $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,86 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH=4,5. ($f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$) (B) Curva analítica para cafeína empregando-se o eletrodo de BDD.

3.3.3. Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial (DPV) também foi utilizada para desenvolver o método de determinação da cafeína, sendo então estudadas as melhores condições experimentais e parâmetros da técnica eletroquímica. Os efeitos desses parâmetros sobre o pico de potencial e intensidade de corrente de pico para a determinação de cafeína foram investigados e otimizados.

Os parâmetros estudados e selecionados aplicando-se a voltametria de pulso diferencial na determinação de cafeína são apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5- Parâmetros de voltametria de pulso diferencial (DPV) estudados e os valores selecionados para a determinação de cafeína

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Tempo de modulação t (ms)	5 - 20	7
Amplitude a (mV)	25 - 150	100
Velocidade ν (mV s ⁻¹)	2,5 - 100	70

3.3.3.1. Construção da curva analítica

Utilizando-se a DPV e seus parâmetros, as curvas analíticas foram construídas pela adição de alíquotas da solução padrão de cafeína. O valor calculado para o limite de detecção (três vezes o desvio padrão de dez brancos dividido pelo coeficiente linear da curva analítica) foi igual a $4,99 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 3.17. (A) mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos variando-se a concentração de cafeína de 1 a 14 ((1) $2,00 \times 10^{-6}$, (2) $3,98 \times 10^{-6}$, (3) $5,96 \times 10^{-6}$, (4) $7,94 \times 10^{-6}$, (5) $9,9 \times 10^{-6}$, (6) $1,96 \times 10^{-5}$, (7) $2,91 \times 10^{-5}$, (8) $3,85 \times 10^{-5}$, (9) $4,76 \times 10^{-5}$, (10) $5,66 \times 10^{-5}$, (11) $6,54 \times 10^{-5}$, (12) $7,41 \times 10^{-5}$, (13) $8,26 \times 10^{-5}$ e (14) $9,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). A curva analítica pode ser observada na Figura 3.17. (B) e a equação da reta obtida foi: $(I_{pa}/\mu\text{A}) = 1,80 + 2,27 \times 10^6 [\text{cafeína}] \text{ mol L}^{-1}$, com um coeficiente de correlação igual a 0,9998.

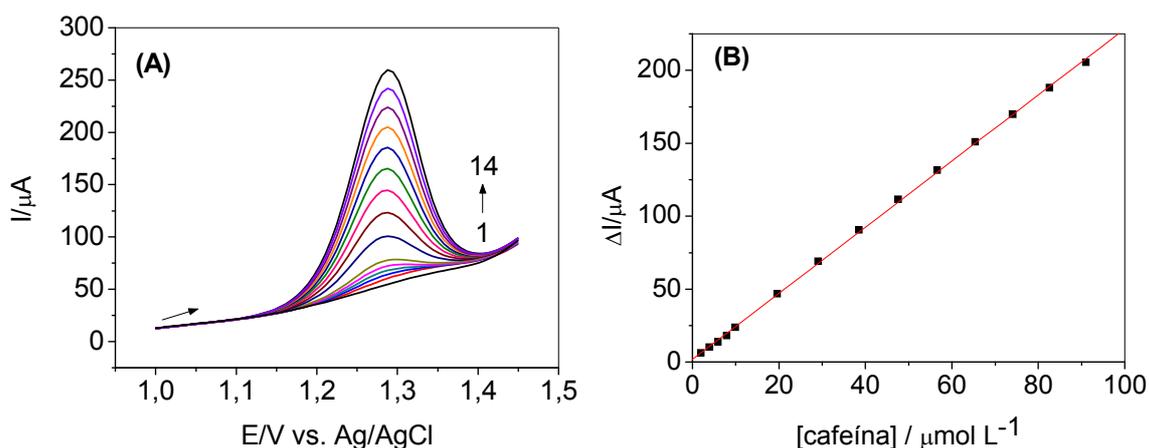


Figura 3.17 (A) Voltamogramas de pulso diferencial (DPV) em diferentes concentrações de cafeína (1 a 14: $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $9,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$ ($t = 7 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 100 \text{ mV}$; $\nu = 70 \text{ mV s}^{-1}$). (B) Curva analítica para cafeína empregando-se o eletrodo de BDD.

3.3.4. Comparação da técnica de SWV e DPV na determinação de cafeína

Após os estudos de voltametria cíclica e otimização de todos os parâmetros da voltametria de onda quadrada e de pulso diferencial e, construção das curvas analíticas para a determinação de cafeína por estas duas técnicas, comparou-se os resultados obtidos. A Tabela 3.6 mostra alguns dados comparativos entre as duas técnicas para a determinação da cafeína.

Tabela 3.6- Comparação das técnicas voltamétricas de onda quadrada e de pulso diferencial para a determinação da cafeína

Parâmetros	Voltametria de Onda Quadrada	Voltametria de Pulso Diferencial
Equação da Reta (Ipa/μA)	$3,69 + 1,32 \times 10^6$ [cafeína] mol L ⁻¹	$1,80 + 2,27 \times 10^6$ [cafeína] mol L ⁻¹
Limite de Detecção (mol L⁻¹)	$1,44 \times 10^{-7}$	$4,99 \times 10^{-8}$
Intervalo de resposta linear (mol L⁻¹)	$2,00 \times 10^{-6}$ a $2,86 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-6}$ a $9,10 \times 10^{-5}$
Sensibilidade (μA mol⁻¹ L)	$1,32 \times 10^6$	$2,27 \times 10^6$

3.4. Avaliação da resposta eletroquímica do AA sobre o eletrodo de BDD

Foram realizados experimentos de voltametria cíclica a fim de avaliar a resposta eletroquímica do AA sobre eletrodo de BDD. Voltametrias de onda quadrada e de pulso diferencial também foram utilizadas na determinação desse analito e os resultados comparados.

3.4. 1. Voltametria cíclica

Os resultados experimentais obtidos com experimentos de voltametria cíclica mostraram que o AA apresentou resposta eletroativa no sentido positivo de varredura (oxidação).

A Figura 3.18 apresenta o comportamento eletroquímico irreversível do AA sobre o eletrodo de BDD. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados na literatura¹⁴⁶.

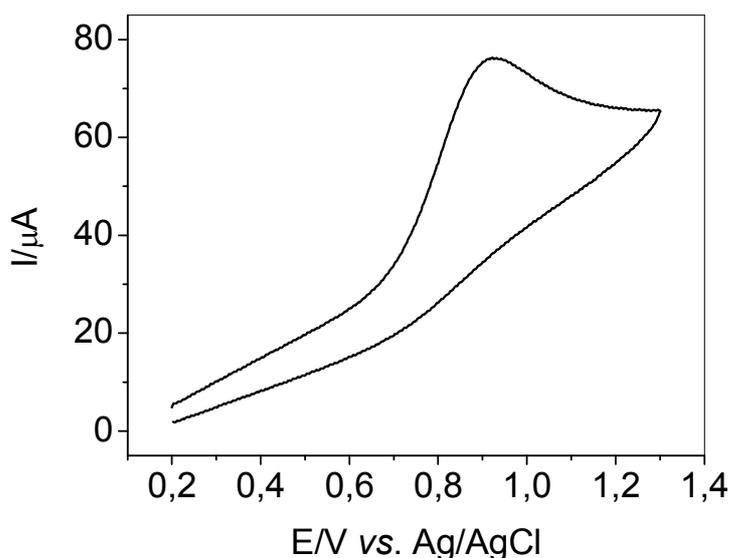


Figura 3.18 Voltamograma cíclico obtido para o AA $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

A dependência da corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais (intervalos de 1 a 150 mV s^{-1}) também foi investigada (Figura 3.19). A existência de uma linearidade entre a corrente de pico anódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura indica que o processo redox é controlado pelo transporte de massa¹⁴⁸.

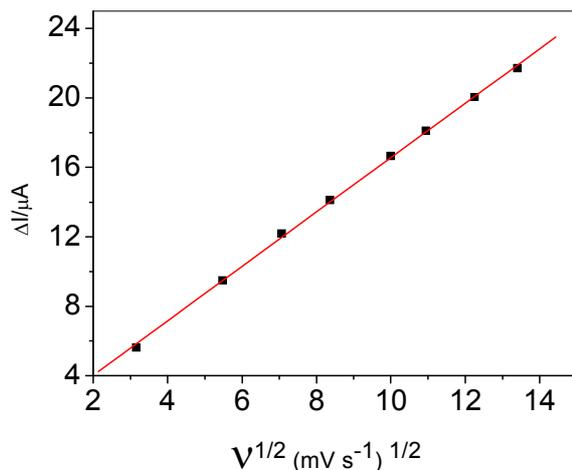


Figura 3.19 Variação da intensidade de corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de AA $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

O gráfico do logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (Figura 3.20) foi linear na região estudada e, apresentou uma inclinação de 0,47. Este valor está próximo do previsto pela literatura¹⁴⁷ (0,5) para sistemas cuja processo redox é controlado pelo transporte de massa, resultado concordante com os dados obtidos e apresentados na Figura 3.19.

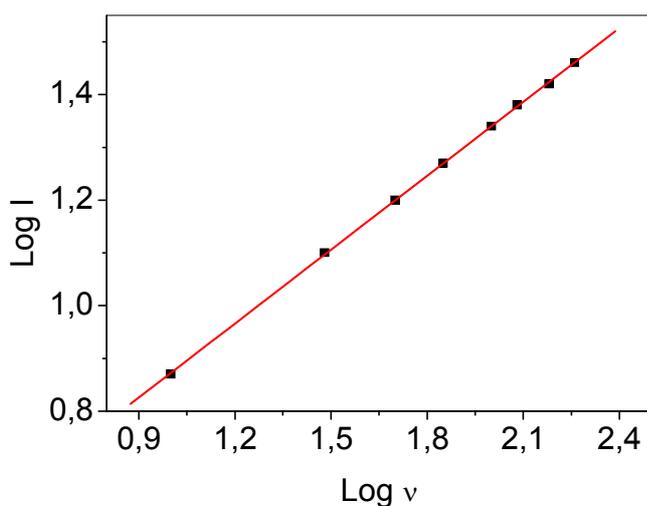


Figura 3.20 Dependência do logaritmo da intensidade de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o AA.

3.4.1.1. Estudo do efeito do meio

Experimentos iniciais para o AA foram realizados em diferentes eletrólitos suporte tais como: tampão fosfato (pH 7,0), tampão BR (pH 2,3), tampão acetato (pH 4,8), ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ e nitrato de sódio 0,5 mol L⁻¹. Os voltamogramas obtidos para o AA nos diferentes eletrólitos suporte estão apresentados na Figura 3.21. A melhor resposta obtida quanto à definição de pico e intensidade de corrente de pico foi com o tampão acetato. No entanto, neste eletrólito, houve adsorção acentuada dos produtos da reação sobre a superfície do eletrodo de BDD, selecionando-se assim o ácido sulfúrico, por ter proporcionado adsorção não significativa. Cabe enfatizar que nos demais eletrólitos houve adsorção dos produtos na superfície do eletrodo.

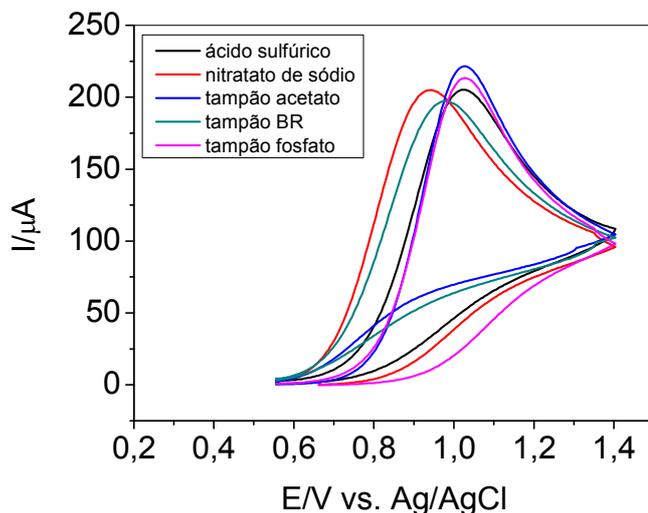


Figura 3.21 Voltamogramas cíclicos para a oxidação de AA $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em diferentes eletrólitos suporte e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Uma vez selecionado o ácido sulfúrico como eletrólito suporte, investigou-se o efeito de sua concentração variando de 0,001 a 0,5 mol L⁻¹ sobre o comportamento voltamétrico do AA, sendo selecionada a concentração de 0,1 mol L⁻¹, por apresentar melhor perfil voltamétrico e maior magnitude de corrente de pico, além de menor corrente residual.

3.4.2. Voltametria de onda quadrada

O voltamograma de onda quadrada apresentou pico de oxidação para o AA em torno de 0,83 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Como discutido, os voltamogramas obtidos empregando a voltametria de onda quadrada correspondem a oxidação no pulso direto e redução no pulso inverso, sendo então a diferença destes voltamogramas igual ao voltamograma resultante.

A Figura 3.22 apresenta a separação das componentes de corrente para o AA sobre o eletrodo de BDD. Na Figura 3.22 (A) utilizando-se a frequência de 70 s⁻¹, observa-se que a corrente resultante é menor que corrente direta e ainda, a corrente reversa apresenta pico no sentido anódico. Uma vez que o processo é irreversível, como previsto pela voltametria cíclica, não deveria aparecer nenhum pico no sentido reverso. Entretanto, como a velocidade de varredura de onda quadrada (frequência x incremento de varredura: 70 s⁻¹ × 4 mV = 280 mV s⁻¹) foi relativamente alta, restou na superfície do eletrodo pequena concentração da espécie eletroativa para oxidação, apesar da inversão do pulso de potencial ter sido aplicado no sentido catódico.

Porém, na Figura 3.22 (B), quando a frequência utilizada foi de 10 s⁻¹ e, assim, a velocidade de varredura de onda quadrada foi igual a 40 mV s⁻¹, foi

observado que não houve corrente de pico catódica na corrente reversa, o que caracteriza uma reação irreversível. Nesta velocidade de varredura, o sinal analítico, devido a permanência das espécies que foram detectadas na velocidade de varredura maior desapareceu.

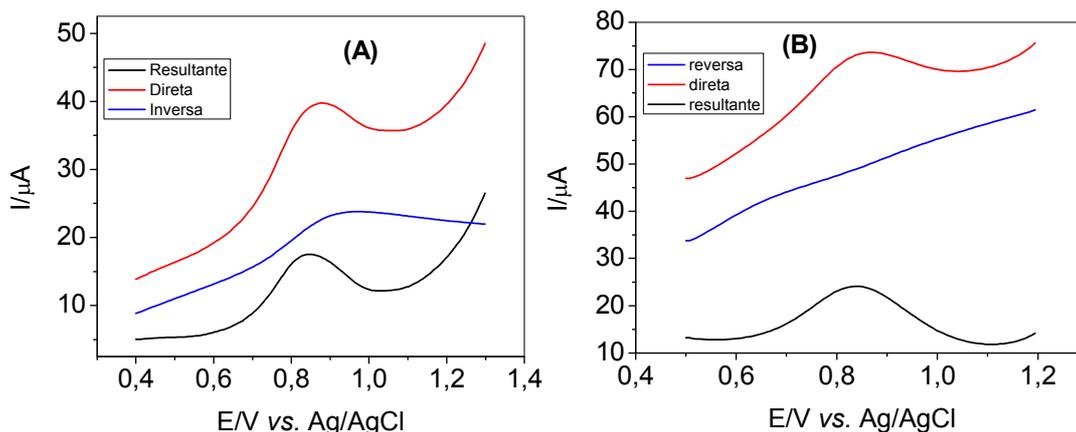


Figura 3.22 (A) Voltamogramas de onda quadrada de AA $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico ($f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$), (B) Voltamogramas de onda quadrada de AA $9,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

Na voltametria de onda quadrada, diversos parâmetros instrumentais como, frequência, amplitude e incremento de potencial devem ser avaliados. Os efeitos desses parâmetros sobre o potencial de pico e correntes de pico, para a determinação de AA foram estudados e otimizados.

Na Figura 3.23 é mostrado o comportamento da corrente de pico em função da raiz quadrada da frequência de onda quadrada para o AA. Observa-se que a intensidade de corrente de pico varia linearmente ($r = 0,9971$) com a raiz quadrada da frequência de onda quadrada em valores de baixa frequência (de 10 a 70 s^{-1}), indicando que o processo de oxidação do AA sobre o BDD é controlado por difusão das espécies em baixas frequências (o que se aplica a este estudo onde a

frequência utilizada foi de 50 s^{-1})¹⁴³. Por outro lado, em frequências maiores, o processo pode estar sendo dificultada pela difusão das espécies e/ou transferência eletrônica entre o eletrodo e a espécie eletroativa.

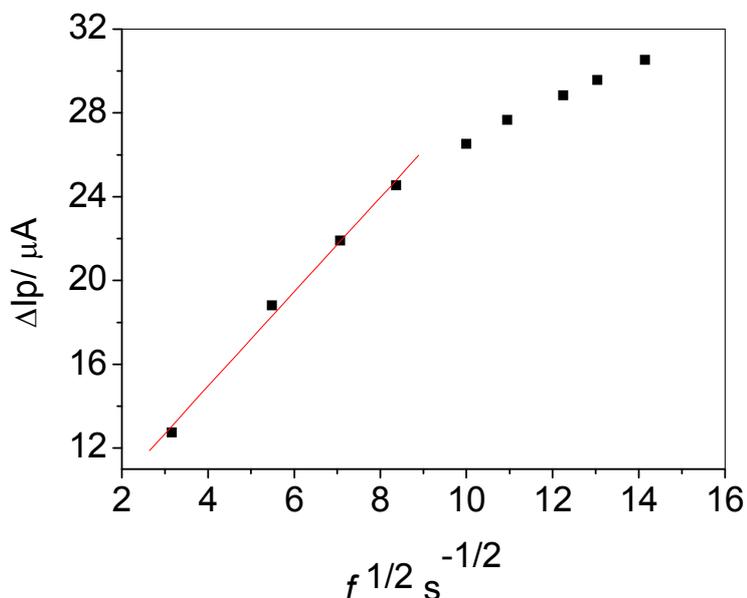


Figura 3.23 Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da frequência de onda quadrada para a oxidação do AA.

Com o estudo da amplitude, foi possível obter um gráfico da variação de amplitude da onda quadrada vs. variação da corrente de pico (Figura 3.24). Considerando-se apenas a parte linear do gráfico calculou-se a área de recobrimento da espécie adsorvida (Γ), por meio do coeficiente angular da reta e auxílio da equação (2). O valor obtido de Γ para a espécie adsorvida foi igual a $4,0 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$, mostrando que a quantidade de matéria de produto adsorvida na superfície do eletrodo é baixa, como discutido anteriormente para o paracetamol.

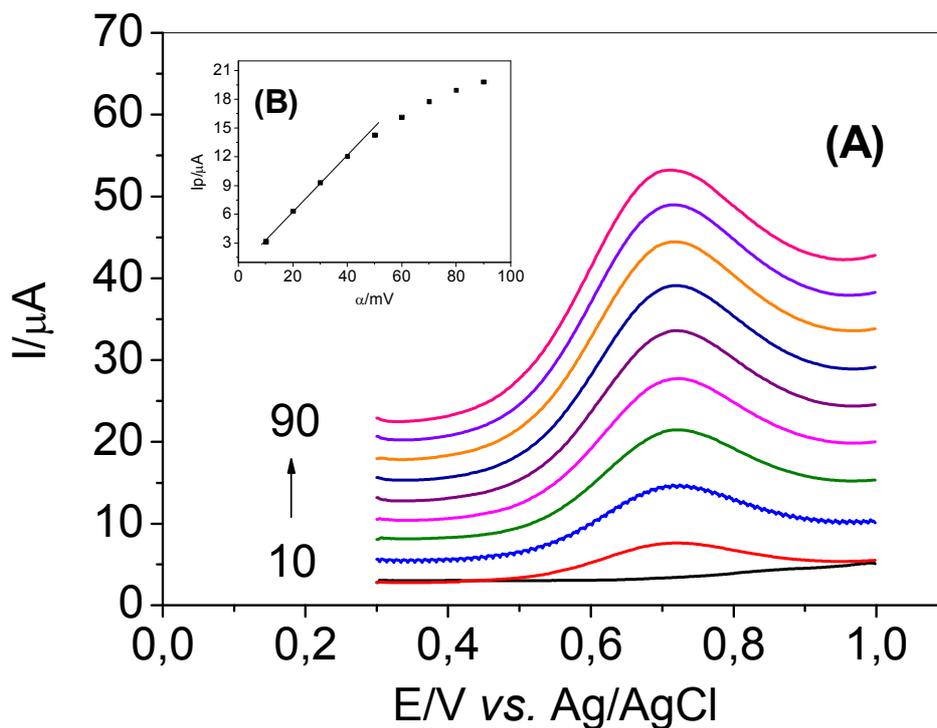


Figura 3.24 (A) Voltamogramas de onda quadrada para o AA em diferentes amplitudes de pulso de potencial, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, e 90 mV, usando-se $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, AA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. (B) Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude de pulso de potencial para o AA.

Na Tabela 3.7 é apresentado os parâmetros estudados e os valores selecionados para cada parâmetro da onda quadrada.

Tabela 3.7 Parâmetros investigados de voltametria de onda quadrada (SWV) e os valores selecionados para a determinação de AA

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Frequência f (S^{-1})	10 - 150	50
Amplitude a (mV)	10 - 100	50
Incremento de varredura ΔE_s (mV)	1 - 7	4

3.4.2.1. Construção da curva analítica

A curva analítica para o AA foi construída após a otimização dos parâmetros instrumentais. O valor calculado para o limite de detecção foi três vezes o desvio padrão de dez brancos dividido pelo coeficiente linear da curva analítica, obtendo-se o valor igual a $3,84 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 3.25. (A) mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos variando-se a concentração de AA de 1 a 13 ((1) $3,98 \times 10^{-6}$, (2) $9,90 \times 10^{-6}$, (3) $1,96 \times 10^{-5}$, (4) $2,91 \times 10^{-5}$, (5) $3,85 \times 10^{-5}$, (6) $4,76 \times 10^{-5}$, (7) $5,66 \times 10^{-5}$, (8) $6,54 \times 10^{-5}$, (9) $7,41 \times 10^{-5}$, (10) $8,26 \times 10^{-5}$, (11) $9,09 \times 10^{-5}$, (12) $1,67 \times 10^{-4}$, e (13) $2,31 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em (B) a curva analítica. A equação da reta obtida foi: $(I_{pa}/\mu\text{A}) = -0,0281 + 2,78 \times 10^5 [\text{AA}] \text{ mol L}^{-1}$, com um coeficiente de correlação igual a 0,9999.

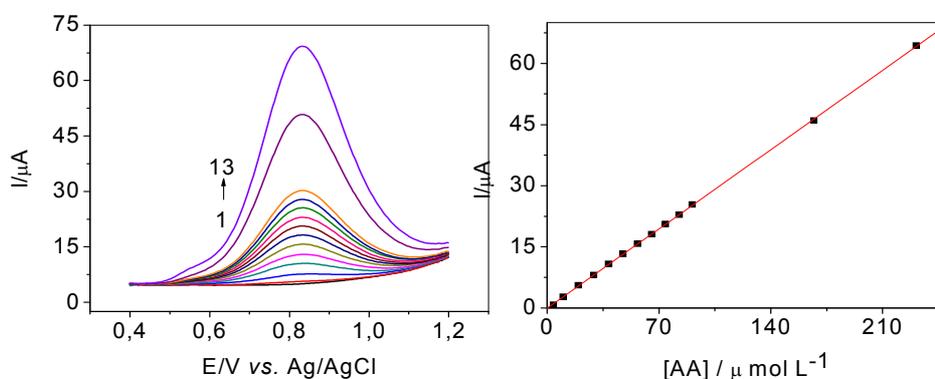


Figura 3.25 (A) Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de (A) AA (1 a 13: $3,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,31 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, ($f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$). (B) Curva analítica do AA sob o eletrodo de BDD por SWV.

3.4.3. Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial também foi utilizada para desenvolver o método de determinação de AA, e, a fim de escolher as melhores condições experimentais, alguns parâmetros analíticos e instrumentais foram estudados. Os efeitos desses parâmetros sobre o pico de potencial e correntes de pico para a determinação de AA foram estudados e otimizados. A Tabela 3.8 apresenta os parâmetros investigados para DPV e os valores selecionados.

Tabela 3.8- Parâmetros de voltametria de pulso diferencial (DPV) estudados e os valores selecionados para a determinação de AA

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Tempo de modulação t (ms)	5 - 20	15
Amplitude a (mV)	25 - 150	100
Velocidade v (mV s ⁻¹)	2,5 - 100	60

3.4.3.1. Construção da curva analítica

A curva analítica para o AA foi construída após a otimização dos parâmetros que envolvem a voltametria de pulso diferencial. O valor calculado para o limite de detecção ($3 \sigma_B$ /inclinação da curva analítica) foi $4,17 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 3.26. (A) mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos variando-se a concentração de AA de 1 a 13 ((1) $2,00 \times 10^{-6}$, (2) $9,90 \times 10^{-6}$, (3) $1,96 \times 10^{-5}$, (4) $2,91 \times 10^{-5}$, (5) $3,85 \times 10^{-5}$, (6) $4,76 \times 10^{-5}$, (7) $5,66 \times 10^{-5}$, (8) $6,54 \times 10^{-5}$, (9) $7,41 \times 10^{-5}$, (10) $8,26 \times 10^{-5}$, (11) $9,09 \times 10^{-5}$, (12) $1,67 \times 10^{-4}$ e (13) $2,31 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e a Figura 3.25.(B) apresenta a curva analítica para o AA. A equações da reta

obtida foi: $(I_{pa}/\mu A) = -0,0510 + 2,30 \times 10^5 [AA] \text{ mol L}^{-1}$, com um coeficiente de correlação de 0,9999.

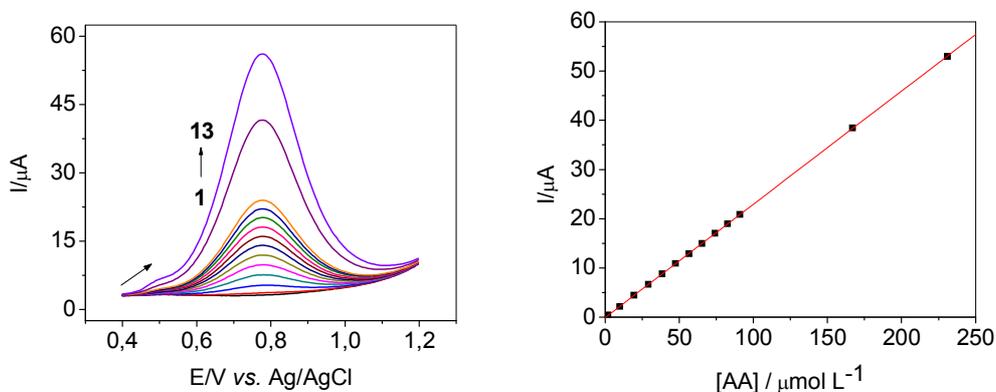


Figura 3.26 (A) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de AA (1 a 13: $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,31 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, ($t = 15 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 100 \text{ mV}$; $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$). (B) Curva analítica do AA sob o eletrodo de BDD por DPV.

3.4.4. Comparação da técnica de SWV e DPV na determinação de AA

Após a determinação de AA por DPV e SWV e a construção das curvas analíticas em cada técnica, foi possível fazer uma comparação entre os resultados obtidos para as diferentes técnicas.

A Tabela 3.9 mostra alguns dados comparativos entre as duas técnicas para a determinação de AA.

Tabela 3.9- Comparação das técnicas voltamétricas de onda quadrada e de pulso diferencial para a determinação do AA

Parâmetros	Voltametria de Onda	Voltametria de Pulso
	Quadrada	Diferencial
Equação da Reta (Ipa/ μ A)	$-0,0281 + 2,78 \times 10^5$ [AA]	$-0,0510 + 2,30 \times 10^5$ [AA]
Limite de Detecção (mol L ⁻¹)	$3,84 \times 10^{-7}$	$4,17 \times 10^{-7}$
Intervalo de resposta linear (mol L ⁻¹)	$3,98 \times 10^{-6}$ a $2,31 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-6}$ a $2,31 \times 10^{-4}$
Sensibilidade (μ A mol ⁻¹ L)	$2,78 \times 10^5$	$2,30 \times 10^5$

3.5. Determinação simultânea do paracetamol e da cafeína

3.5.1. Comparação da determinação do paracetamol e da cafeína com o eletrodo de BDD e carbono vítreo (CG)

A Figura 3.26 mostra voltamogramas de pulso diferencial para paracetamol $9,90 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e cafeína $9,70 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em eletrodo de CG e eletrodo de BDD. Picos de correntes bem definidos foram obtidos para ambos analitos; entretanto, o voltamograma obtido com o eletrodo de BDD apresentou maiores densidades de corrente de pico, o que justifica o uso deste eletrodo no presente trabalho. Para melhor visualização destes resultados, trabalhou-se com densidade de corrente e correção da linha base (Figura 3.27).

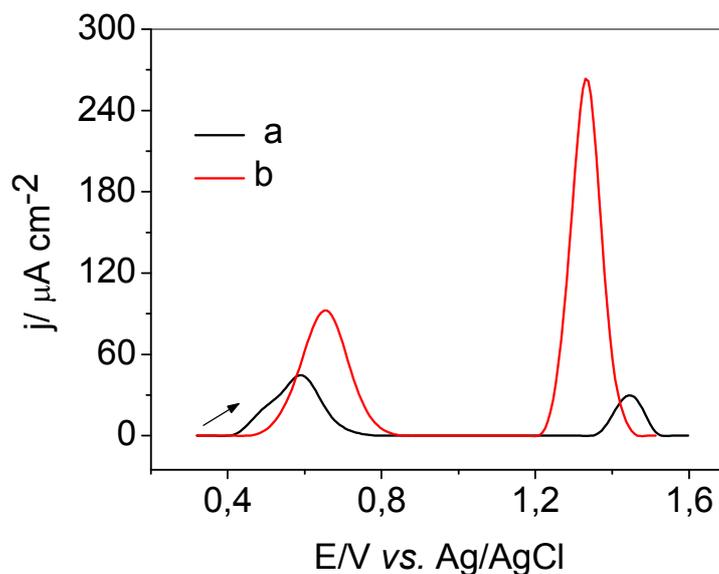


Figura 3.27 Voltamogramas de pulso diferencial para paracetamol $9,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e cafeína $9,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (tampão acetato pH 4,5) em (a) eletrodo de CG e em (b) eletrodo de BDD.

3.5.2. Determinação simultânea de paracetamol e cafeína com eletrodo de BDD

Comparando os resultados obtidos para paracetamol e cafeína utilizando-se as duas técnicas voltamétricas pode-se notar que não houve uma diferença significativa nos resultados obtidos em termos dos parâmetros analíticos, a saber: limite de detecção, linearidade e sensibilidade (inclinação da curva analítica) do método eletroanalítico (ver Tabelas 3.3 e 3.6). Assim, selecionou-se a voltametria de pulso diferencial para a determinação simultânea de paracetamol e da cafeína, uma vez que esta técnica apresentou alguns parâmetros analíticos (sensibilidade e limite de detecção) ligeiramente superiores para a cafeína.

Para a determinação simultânea também foi utilizado como eletrólito suporte tampão acetato (pH 4,5), uma vez que este eletrólito apresentou boa resposta voltamétrica para a determinação individual de cada analito.

Os parâmetros utilizados para a determinação simultânea por voltametria de pulso diferencial foram os mesmos selecionados na Tabela 3.2.

Os voltamogramas de pulso diferencial apresentaram potenciais de picos anódicos em 0,800 V para paracetamol e 1,35 V para cafeína, obtendo-se assim uma diferença dos potenciais de picos (EP) de cerca de 0,550 V (Figura 3.28), permitindo a determinação simultânea destes compostos.

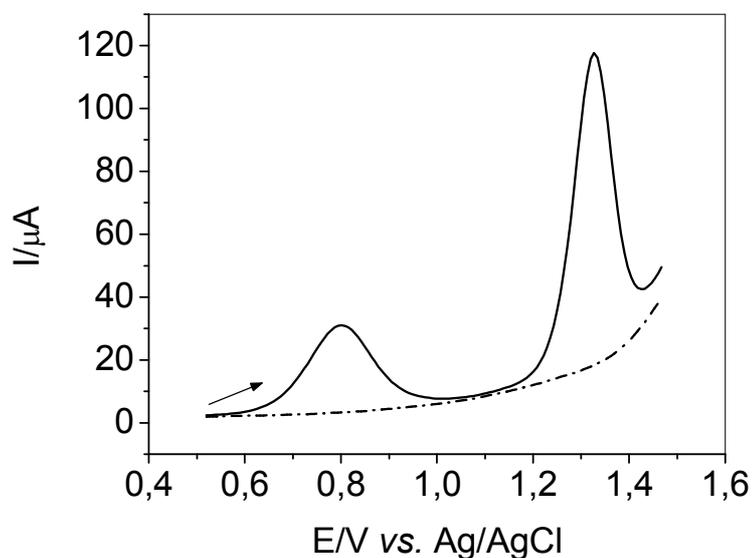


Figura 3.28 Voltamograma de pulso diferencial obtido para o paracetamol e para a cafeína simultaneamente nas concentrações $4,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5. ($t = 7 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 100 \text{ mV}$; $v = 70 \text{ mV s}^{-1}$).

Em continuação a esse estudo, a resposta eletroquímica do paracetamol e da cafeína um na presença do outro foi também investigada. O comportamento do paracetamol (ou cafeína) foi testado na presença de um grande excesso de cafeína (ou paracetamol) em solução de tampão acetato pH 4,5.

A determinação individual de paracetamol com a concentração variando de 1 a 16 ((1) $5,89 \times 10^{-7}$, (2) $1,96 \times 10^{-6}$, (3) $3,91 \times 10^{-6}$, (4) $5,86 \times 10^{-6}$, (5) $7,80 \times 10^{-6}$, (6) $9,73 \times 10^{-6}$, (7) $1,93 \times 10^{-5}$, (8) $2,86 \times 10^{-5}$, (9) $3,78 \times 10^{-5}$, (10) $4,68 \times 10^{-5}$, (11)

$5,56 \times 10^{-5}$, (12) $3,68 \times 10^{-5}$, (13) $7,29 \times 10^{-5}$, (14) $8,12 \times 10^{-5}$, (15) $8,94 \times 10^{-5}$, (16) $1,64 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi realizada em soluções que contém cafeína em uma concentração fixa de $1,77 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 3.29 (A)). Por outro lado, a determinação individual de cafeína em concentração variando de 1 a 13 ((1) $8,00 \times 10^{-7}$, (2) $1,92 \times 10^{-6}$, (3) $3,83 \times 10^{-6}$, (4) $5,74 \times 10^{-6}$, (5) $7,63 \times 10^{-6}$, (6) $9,52 \times 10^{-6}$, (7) $1,63 \times 10^{-5}$, (8) $2,80 \times 10^{-5}$, (9) $4,59 \times 10^{-5}$, (10) $6,31 \times 10^{-5}$, (11) $7,96 \times 10^{-5}$, (12) $8,77 \times 10^{-5}$, (13) $1,61 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi realizada em soluções contendo paracetamol, a uma concentração fixa de $3,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 3.29 (B)).

A Figura 3.29. (A) mostra que o pico de corrente anódica do paracetamol aumenta com o aumento da concentração deste, mesmo na presença de cafeína na concentração de $2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Do mesmo modo, como mostra a Figura 3.29.(B), mantendo-se a concentração de paracetamol constante, o pico anódico de oxidação da cafeína aumenta com o aumento de sua concentração, não havendo alteração do voltamograma do paracetamol.

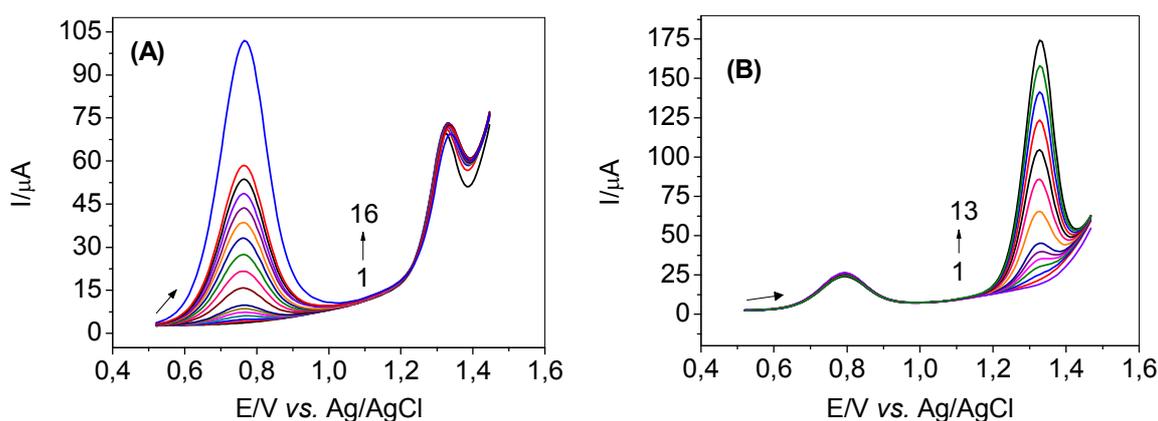


Figura 3.29 (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o paracetamol em diferentes concentrações (1 a 16: $5,89 \times 10^{-7}$ a $1,64 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), mantendo constante a cafeína $1,77 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a cafeína em diferentes concentrações (1 a 13: $8,00 \times 10^{-7}$ a $1,61 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), mantendo a concentração de paracetamol constante ($3,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Após este estudo, a determinação de paracetamol e cafeína foram realizadas variando-se as concentrações de ambos simultaneamente, obtendo-se assim a curva analítica para cada um dos analitos. A Figura 3.30 mostra as curvas DPV registradas para as soluções contendo paracetamol e cafeína em solução de tampão acetato (pH 4,5) e para as concentrações de paracetamol e cafeína variando de 1 a 15 ((1) $5,00 \times 10^{-7}$, (2) $1,99 \times 10^{-6}$, (3) $3,97 \times 10^{-6}$, (4) $5,93 \times 10^{-6}$, (5) $7,87 \times 10^{-6}$, (6) $9,80 \times 10^{-6}$, (7) $1,92 \times 10^{-5}$, (8) $2,83 \times 10^{-5}$, (9) $3,70 \times 10^{-5}$, (10) $4,55 \times 10^{-5}$, (11) $5,36 \times 10^{-5}$, (12) $6,14 \times 10^{-5}$, (13) $6,90 \times 10^{-5}$, (14) $7,63 \times 10^{-5}$ e (15) $8,33 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).

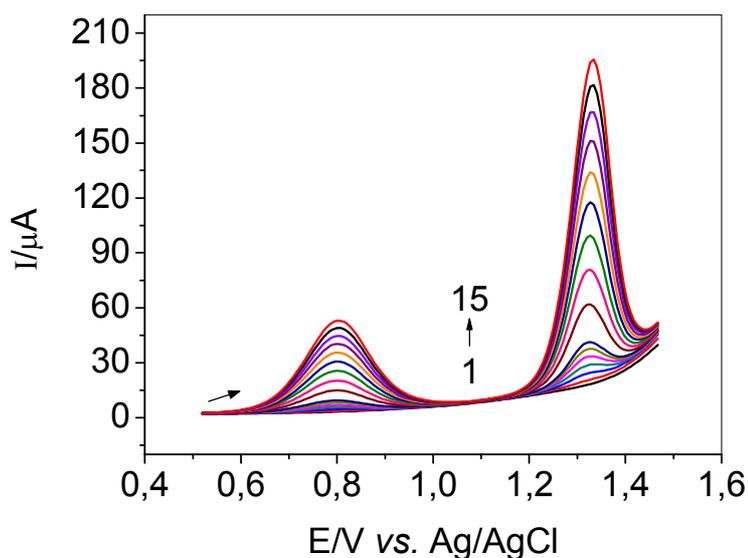


Figura 3.30 Voltamogramas de pulso diferencial para o paracetamol e para a cafeína em diferentes concentrações em tampão acetato pH 4,5. Concentrações de paracetamol e cafeína (1 a 15): $5,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $8,33 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ($t = 7$ mV s⁻¹; $a = 100$ mV; $v = 70$ mV s⁻¹).

As equações correspondentes foram:

$$(I_{pa}/\mu A) = 0,339 + 0,599 \times 10^6 [\text{paracetamol}]$$

$$(I_{pa}/\mu A) = 2,03 + 2,11 \times 10^6 [\text{cafeína}]$$

Sendo as concentrações em mol L⁻¹ e coeficientes de correlação iguais a 0,9999 para ambas as equações. O limite de detecção (3 vezes o desvio do branco/inclinação) foi igual a $4,90 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o paracetamol e $3,50 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para a cafeína.

As curvas analíticas (Figura 3.31) mostraram uma boa resposta linear variando de $5,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $8,33 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para o paracetamol e também para a cafeína.

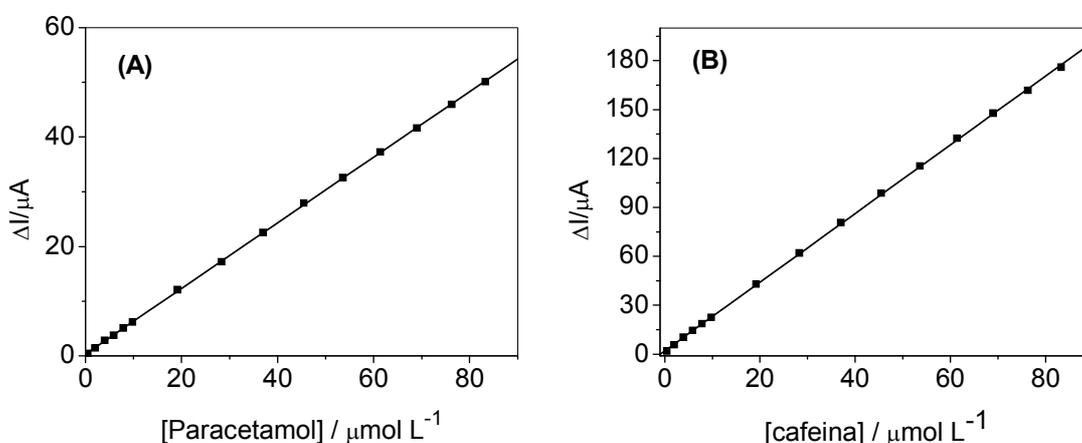


Figura 3.31 Curva analítica obtida para o (A) paracetamol e para a (B) cafeína empregando DPV. Condições experimentais iguais as da Figura 3.30.

A repetibilidade intra-dias foi determinada por medidas sucessivas no mesmo dia ($n = 10$) de soluções de paracetamol e cafeína $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. O desvio padrão relativo (RSD) obtido foi de 0,7% para o paracetamol e 0,2% para a cafeína.

A repetibilidade inter-dias foi avaliada em dias diferentes ($n = 5$) com soluções diferentes de paracetamol ou cafeína nas concentrações $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e o desvio padrão relativo (RSD) foi de 5,1% e 1,4%, respectivamente.

3.5.2.1. Estudo de interferentes em potencial e testes de adição e recuperação

O efeito de interferentes em potencial na determinação de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas foram avaliados para os excipientes normalmente presentes em amostras comerciais.

O efeito de interferentes em potencial foi investigado através da adição destes em uma solução contendo $1,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ paracetamol ou cafeína em tampão acetato (pH 4,5). Cada um dos possíveis interferentes foi adicionado à solução inicial em concentrações com proporções de 10:1, 1:1 e 1:10, os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos usando apenas a solução padrão de paracetamol ou de cafeína.

Sacarina, carbonato de sódio, ácido cítrico, dipirona e ácido acetilsalicílico, excipientes presentes nas amostras comerciais, foram testados como possíveis interferentes. Nenhuma das substâncias investigadas causou qualquer interferência na determinação do paracetamol e cafeína com exceção da dipirona, encontrada concomitantemente em algumas amostras comerciais, que causou interferência positiva na determinação de cafeína em concentração igual ou superior aquela de cafeína. Essa interferência deve-se ao fato da dipirona apresentar potencial de oxidação próximo da cafeína.

Os estudos de adição e recuperação de cada analito na mesma solução de amostra apresentaram recuperações médias de 97,7% para paracetamol e de 99,0% para a cafeína, indicando assim ausência de interferência das matrizes das amostras.

3.5.2.2. Aplicação do método voltamétrico na determinação de amostras comerciais

Amostras farmacêuticas comerciais contendo paracetamol e cafeína foram analisadas para determinação simultânea das duas substâncias, a fim de avaliar o método proposto.

Para a determinação simultânea destes analitos foi utilizado o método de adição de padrão. A Figura 3.32 mostra os voltamogramas obtidos empregando-se o método de adição de padrão para uma das amostras de produtos comerciais.

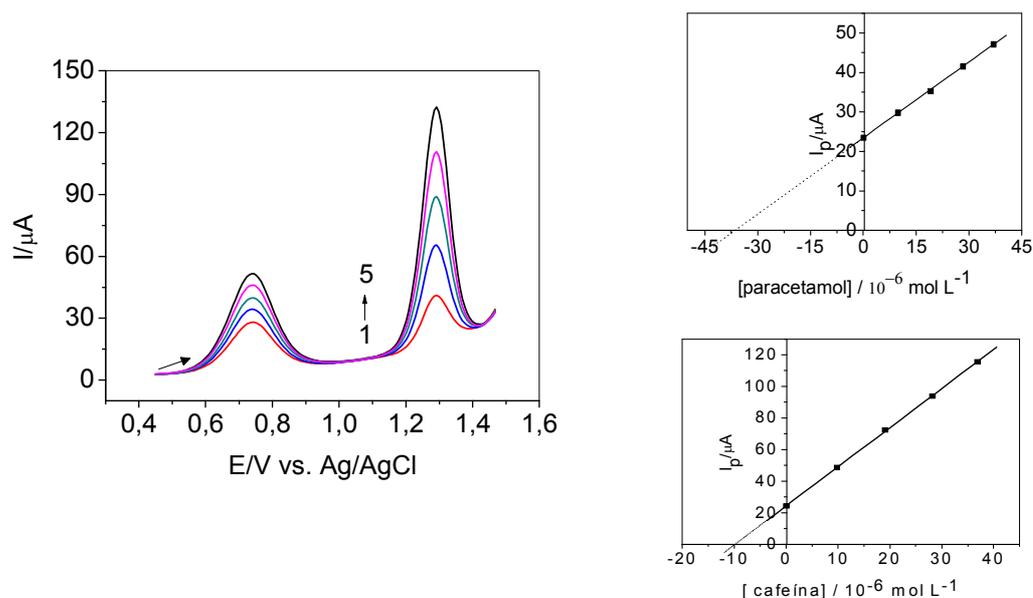


Figura 3.32 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas (produto comercial D): (1) amostra D ; (2) amostra D + $9,80 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; (3) amostra D + $1,90 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; amostra D + $2,80 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; amostra D + $3,70 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

A HPLC foi utilizada para fazer uma avaliação dos resultados obtidos com o método voltamétrico proposto para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas. Nas condições experimentais empregadas,

descritas na parte experimental, o paracetamol apresentou um tempo de retenção de 4,97 minutos e a cafeína um tempo de retenção de 5,29 minutos. O cromatograma típico obtido para o paracetamol e para a cafeína ($\lambda = 273 \text{ nm}$) é apresentado na Figura 3.33.

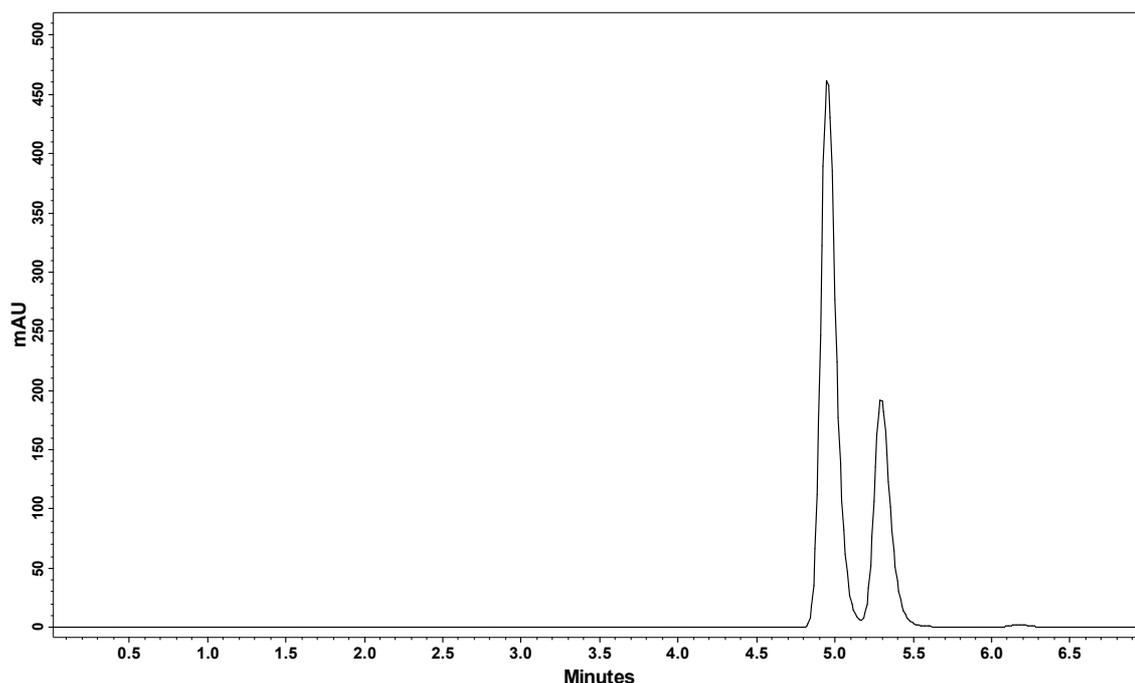


Figura 3.33 Cromatograma típico do paracetamol ($t = 4,97 \text{ min}$) e da cafeína ($t = 5,29 \text{ min}$) $\lambda = 273 \text{ nm}$, fase móvel acetonitrila/água (25:75 v/v) $\text{pH}_{\text{cond}} = 2,5$, com vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

A Figura 3.34 (A) e (B) mostra as curvas analíticas obtidas por HPLC para o paracetamol no intervalo de concentração de 1 a 6 ((1) $3,31 \times 10^{-4}$, (2) $6,61 \times 10^{-4}$, (3) $1,32 \times 10^{-3}$, (4) $1,65 \times 10^{-3}$, (5) $1,98 \times 10^{-3}$, (6) $2,31 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e para a cafeína no intervalo de concentração de 1 a 6 ((1) $5,15 \times 10^{-5}$, (2) $1,03 \times 10^{-4}$, (3) $2,06 \times 10^{-4}$, (4) $2,58 \times 10^{-4}$, (5) $3,09 \times 10^{-4}$, (6) $3,60 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) As equações da curvas obtidas foram:

$$A(\text{u.a.}) = 6,80 \times 10^4 + 3,26 \times 10^9 [\text{paracetamol}]$$

$$A(\text{u.a.}) = 17,8 \times 10^4 + 1,25 \times 10^{10} [\text{cafeína}]$$

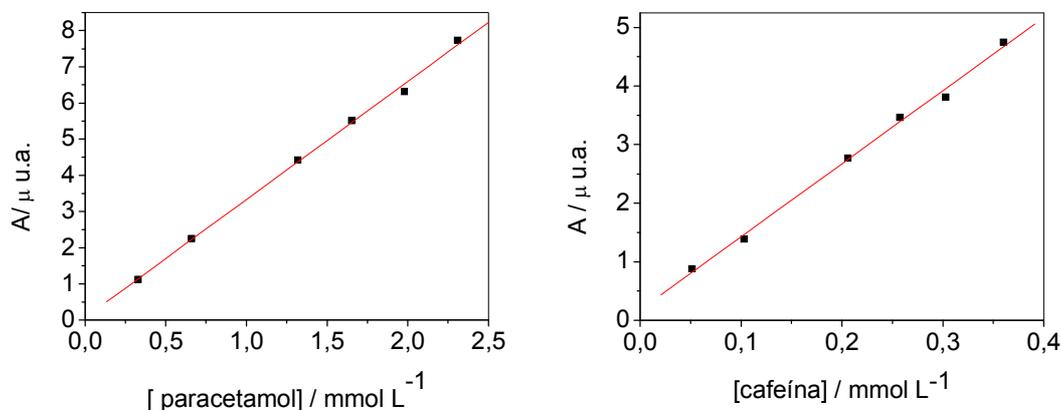


Figura 3.34 Curva analítica obtida para o paracetamol (A) e para (B) cafeína empregando HPLC, fase móvel acetonitrila/água (25:75 v/v) $\text{pH}_{\text{cond}} = 2,5$, com vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

A Tabela 3.10 apresenta os resultados obtidos para paracetamol e cafeína, determinados simultaneamente em quatro formulações farmacêuticas empregando o método proposto (DPV) e o método comparativo (HPLC).

Tabela 3.10- Resultados obtidos na determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas por DPV (método proposto) e HPLC (método comparativo)

Amostras	Valor Tabelado (mg/compr)	HPLC ^a (mg/compr)	DPV ^a (mg/ compr)	E_1^b (%)	
A	Paracetamol	500	525 ± 1	528 ± 9	+0,57
	Cafeína	65	67 ± 2	64 ± 1	- 4,5
B	Paracetamol	500	483 ± 18	483 ± 21	0
	Cafeína	65	61 ± 2	62 ± 4	+ 1,6
C	Paracetamol	150	142 ± 5	145 ± 16	+ 2,1
	Cafeína	50	48 ± 2	51 ± 1	+ 6,2
D	Paracetamol	500	479 ± 28	486 ± 15	+ 1,5
	Cafeína	65	65 ± 3	64 ± 2	- 1,5

a n=3

b Erro relativo (%) = $100 \times (\text{valor voltamétrico} - \text{valor HPLC}) / \text{valor HPLC}$.

Como pode ser observado na Tabela 3.10, os resultados obtidos por DPV estão em concordância com os resultados obtidos por HPLC. Aplicou-se o teste *t*-*pareado* para os resultados obtidos empregando-se o procedimento proposto e o procedimento de referência (HPLC). Para o paracetamol $t_{exp} = 2,54$ e para a cafeína $t_{exp} = 2,63$, ambos os valores estão abaixo do valor crítico tabelado ($t_{critico} = 3,18$, $\alpha = 0,05$), indicando que não há diferença significativa entre os teores encontrados em um nível de confiança de 95%. Ademais, os erros relativos encontrados estão dentro de um erro aceitável.

3.6. Determinação simultânea de ácido ascórbico e cafeína

3.6.1. Comparação da determinação do AA e da cafeína com o eletrodo de BDD e carbono vítreo (CG)

A Figura 3.35 mostra os voltamogramas de pulso diferencial para AA $2,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e cafeína $7,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrodo de BDD e eletrodo de carbono vítreo (CG), com correção de linha base e densidade de corrente para melhor visualização dos resultados. Os voltamogramas obtidos apresentaram boa resolução, entretanto, o voltamograma obtido empregando-se o eletrodo de BDD apresentou maior densidade de corrente.

Uma vez que AA é muito difícil de ser determinado eletroquimicamente em muitos eletrodos convencionais, devido a adsorção dos produtos da reação de oxidação desse analito^{42,48}, estudos de repetibilidade foram realizados. Neste estudo, para uma solução de AA $2,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ empregando os dois eletrodos,

RSDs de 1,0% e de 8,7% foram obtidos respectivamente para os eletrodos de BDD e GC (n = 10). Esse valor elevado do RSD para o eletrodo de GC é um indicativo da adsorção dos produtos de oxidação do AA sobre a superfície do eletrodo de GC, justificando também o emprego do eletrodo do BDD no presente trabalho.

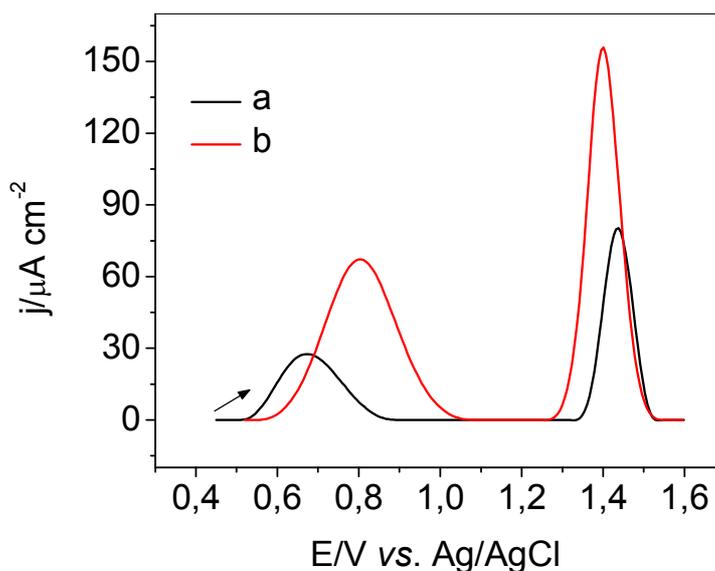


Figura 3.35 Voltamogramas de pulso diferencial em ácido sulfúrico 0,10 mol L⁻¹ para AA 2,90 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ e cafeína 7,90 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ em (a) eletrodo de CG e (b) eletrodo de BDD.

3.6.2. Determinação simultânea de AA e cafeína com eletrodo de BDD

Comparando os resultados obtidos anteriormente para o AA e para cafeína, utilizando-se as técnicas de voltametria de onda quadrada e de pulso diferencial, pode-se notar que não houve uma diferença acentuada entre os parâmetros analíticos obtidos. Sendo assim, selecionou-se a voltametria de pulso diferencial como técnica analítica para a determinação simultânea de AA e cafeína, uma vez que para a cafeína foram obtidos LD menor e sensibilidade maior.

Para a determinação simultânea utilizou-se como eletrólito suporte ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ uma vez que neste eletrólito a adsorção dos produtos da oxidação do AA sobre o eletrodo de BDD não foi significativa. Os parâmetros utilizados para a determinação simultânea por voltametria de pulso diferencial foram os mesmos selecionados para o AA (valores apresentados na Tabela 3.8).

Os voltamogramas de pulso diferencial apresentaram potenciais de picos anódicos em $0,770 \text{ V}$ para AA e $1,40 \text{ V}$ para cafeína, obtendo-se assim uma diferença entre os potenciais de pico de $0,630 \text{ V}$ (Figura 3.36), possibilitando desta maneira a determinação simultânea desses analitos.

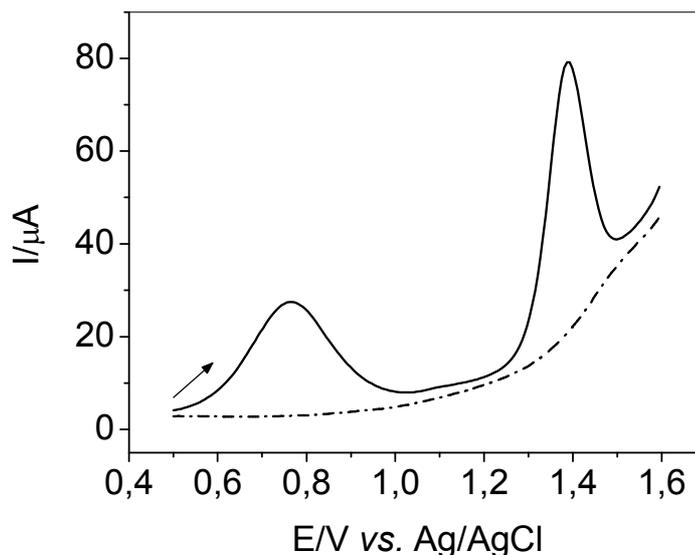


Figura 3.36 Voltamograma de pulso diferencial obtidos para o AA e para a cafeína simultaneamente nas concentrações $8,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (AA) e $4,30 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. ($t = 15 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 100 \text{ mV}$; $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$).

Em continuação a esse estudo, a resposta eletroquímica do AA e da cafeína um na presença do outro foi também investigada. O comportamento do AA (ou cafeína) foi testado na presença de um grande excesso de cafeína (ou AA) em solução de ácido sulfúrico.

A determinação individual de AA com a concentração variando de 1 a 5 ((1) $9,92 \times 10^{-6}$, (2) $2,98 \times 10^{-5}$, (3) $5,96 \times 10^{-5}$, (4) $9,84 \times 10^{-5}$, (5) $1,78 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) foi realizada em solução contendo cafeína em uma concentração fixa de $2,93 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (Figura 3.37. (A)). Por outro lado, a determinação individual de cafeína em concentração variando de 1 a 5 ((1) $3,80 \times 10^{-6}$, (2) $9,76 \times 10^{-6}$, (3) $2,68 \times 10^{-5}$, (4) $5,48 \times 10^{-5}$, (5) $8,31 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) foi realizada em solução contendo AA, a uma concentração fixa de $9,10 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (Figura 3.37 (B)).

A Figura 3.37 (A) mostra que o pico de corrente anódica do AA aumenta com o aumento da concentração do analito, mas não altera o sinal analítico da cafeína. Similarmente, como mostra a Figura 3.37 (B), mantendo-se a concentração de AA constante, o pico anódico de oxidação da cafeína aumenta com o aumento de sua concentração e a magnitude e potencial de pico para o AA não apresenta qualquer alteração.

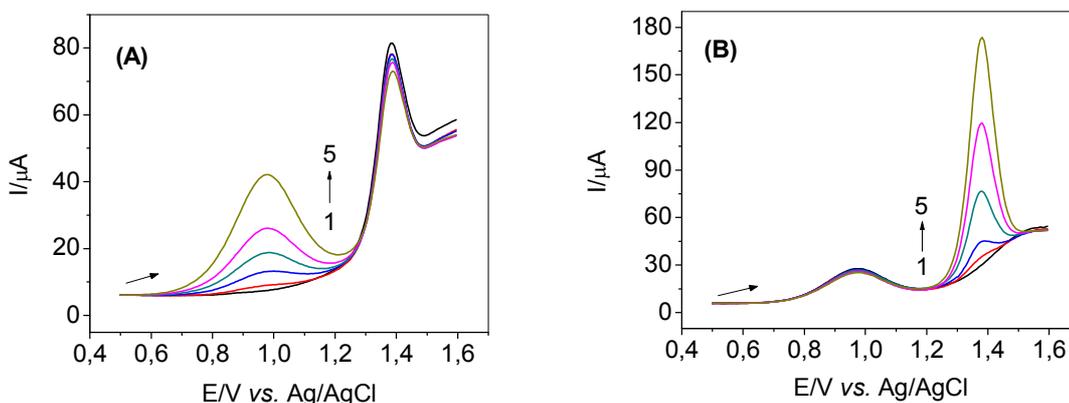


Figura 3.37 (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o AA em diferentes concentrações ($9,92 \times 10^{-6}$ a $1,78 \times 10^{-4}$), mantendo constante a concentração de cafeína em $2,90 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. (B) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a cafeína em diferentes concentrações ($3,80 \times 10^{-6}$ a $8,31 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), mantendo a concentração de AA constante ($9,10 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).

Após este estudo, a determinação de AA e cafeína foram realizadas com adições de diferentes concentrações, na célula eletroquímica, de ambos analitos simultaneamente. A Figura 3.38 mostra as curvas DPV registradas para as soluções contendo AA e cafeína em solução de ácido sulfúrico 0,10 mol L⁻¹. As curvas analíticas (Figura 3.39) mostraram uma boa resposta linear variando de AA de 1 a 10 ((1) $4,96 \times 10^{-6}$, (2) $1,94 \times 10^{-5}$, (3) $3,77 \times 10^{-5}$, (4) $5,50 \times 10^{-5}$, (5) $7,14 \times 10^{-5}$, (6) $8,69 \times 10^{-5}$, (7) $1,02 \times 10^{-4}$, (8) $1,54 \times 10^{-4}$, (9) $1,87 \times 10^{-4}$ e (10) $2,11 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e cafeína de 1 a 10 ((1) $1,99 \times 10^{-6}$, (2) $9,71 \times 10^{-6}$, (3) $1,89 \times 10^{-5}$, (4) $2,75 \times 10^{-5}$, (5) $3,57 \times 10^{-5}$, (6) $4,35 \times 10^{-5}$, (7) $5,08 \times 10^{-5}$, (8) $7,69 \times 10^{-5}$, (9) $9,35 \times 10^{-5}$ e (10) $1,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹)

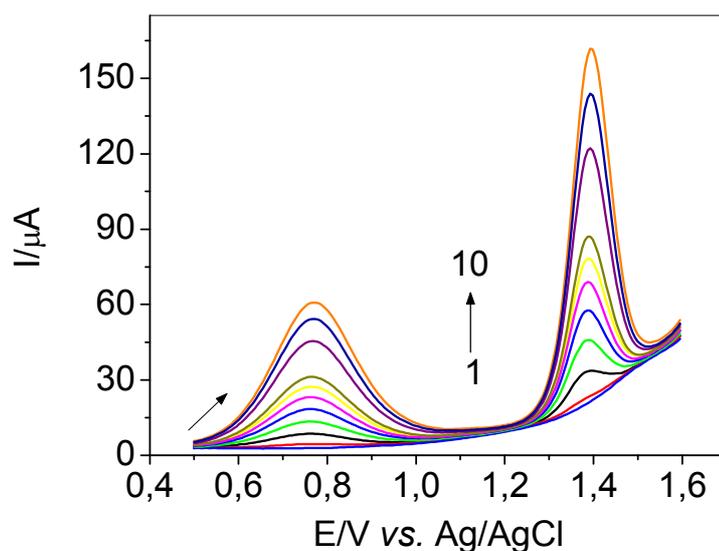


Figura 3.38 Voltamogramas de pulso diferencial para o AA e para a cafeína em diferentes concentrações em ácido sulfúrico. Concentrações de AA (1 a 10): $4,96 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $2,11 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e cafeína (1 a 10): $1,99 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $1,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($t = 15$ mV s⁻¹; $a = 100$ mV; $v = 60$ mV s⁻¹).

As equações correspondentes foram:

$$(I_{pa}/\mu A) = 0,500 + 2,73 \times 10^5 [AA]$$

$$(I_{pa}/\mu A) = 0,820 + 1,29 \times 10^6 [\text{cafeína}]$$

Sendo as concentrações em mol L⁻¹ e o coeficiente de correlação igual a 0,9999 para ambos. O limite de detecção (3 vezes o desvio do branco/inclinação) foi de $2,59 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para AA e $2,37 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para cafeína.

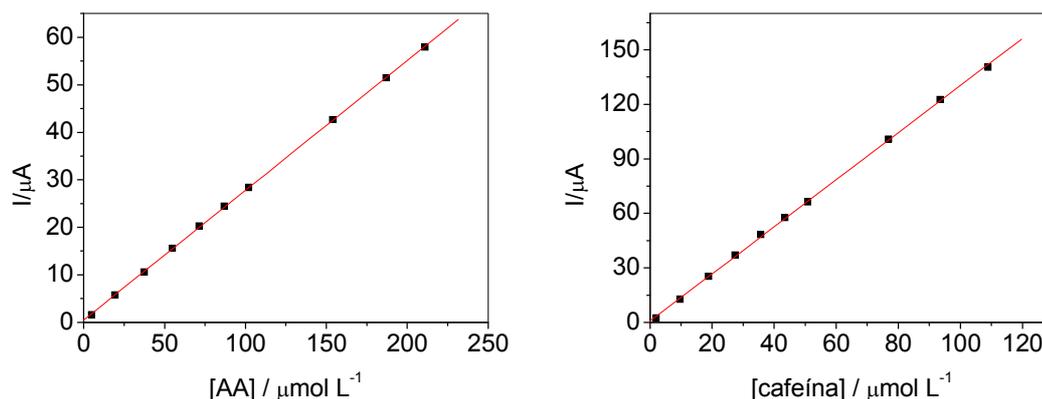


Figura 3.39 Curvas analíticas obtidas para o (A) AA e para a (B) cafeína empregando DPV nas condições experimentais mostradas na legenda da Figura 3.38.

A repetibilidade intra-dias foi determinada por medidas sucessivas no mesmo dia ($n = 10$) de soluções de AA $8,92 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e cafeína $2,95 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. O desvio-padrão relativo (RSD) obtido foi de 0,5% para o AA e 0,2% para a cafeína.

A repetibilidade inter-dias foi avaliada medindo-se em dias diferentes (5 dias, $n= 5$) diferentes soluções de AA $9,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e cafeína $4,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e o desvio padrão relativo (RSD) foi de 5,9% e 8,7%, respectivamente.

3.6.2.1. Estudo de interferentes em potencial e testes de adição e recuperação

O efeito de eventuais interferentes foi investigado adicionando-se os interferentes em uma solução contendo $1,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ AA ou cafeína em ácido

sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Cada um dos possíveis interferentes foi adicionado à solução inicial em concentrações com proporções de 10:1, 1:1 e 1:10, estes resultados obtidos foram comparados com o obtido usando apenas solução padrão de AA ou cafeína.

Sacarina, carbonato de sódio, ácido cítrico, paracetamol, dipirona e ácido acetilsalicílico, excipientes presentes nas amostras comerciais, foram testados. Nenhuma das substâncias investigadas causou qualquer interferência na determinação de AA e de cafeína, exceto a dipirona e o paracetamol. A dipirona causou uma interferência positiva sobre o sinal analito da cafeína nas mesmas concentrações que esta (como discutido anteriormente), e o paracetamol causou uma deformação no pico do AA uma vez que o potencial de oxidação dos dois são muito próximos (0,8V).

Nos estudos de adição e recuperação de cada analito na mesma solução de amostra apresentaram recuperações médias de 96,4% para AA e de para 97,3% para a cafeína, indicando assim ausência de interferência das matrizes nas amostras.

3.6.2.2. Aplicação do método voltamétrico na determinação de amostras comerciais com do procedimento analítico proposto

Amostras farmacêuticas comerciais contendo AA e cafeína foram analisadas para determinação simultânea das duas substâncias, a fim de avaliar o método proposto.

Para a determinação simultânea destes analitos foi utilizado o método de adição de padrão. A figura 3.40 mostra os voltamogramas obtidos pelo método de adição de padrão para uma das amostras de produtos comerciais.

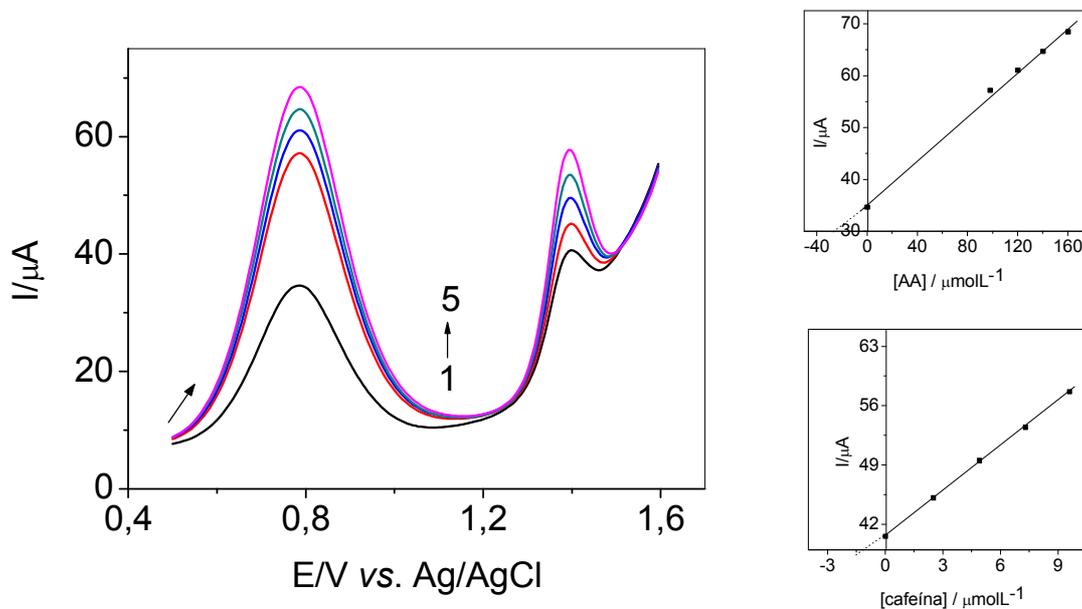


Figura 3.40 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a determinação simultânea de AA e cafeína em formulações farmacêuticas (produto comercial E): (1) amostra E ; (2) amostra E + $(9,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ AA}, 2,50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ cafeína})$; (3) amostra E + $(1,20 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ AA}, 4,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ cafeína})$; amostra E + $(1,40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ AA}, 7,30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ cafeína})$; amostra E + $(1,60 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ AA}, 9,60 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ cafeína})$.

A HPLC foi utilizada para comparação dos resultados obtidos com o método voltamétrico proposto para a determinação de AA e cafeína em formulações farmacêuticas. Nas condições experimentais empregadas, já descritas na parte experimental, o AA apresentou um tempo de retenção de 4,35 minutos e a cafeína um tempo de retenção de 1,35 minutos. Cromatogramas típicos do AA ($\lambda = 234\text{nm}$) e da cafeína ($\lambda = 273\text{nm}$) são apresentados nas Figuras 3.41 e 3.42.

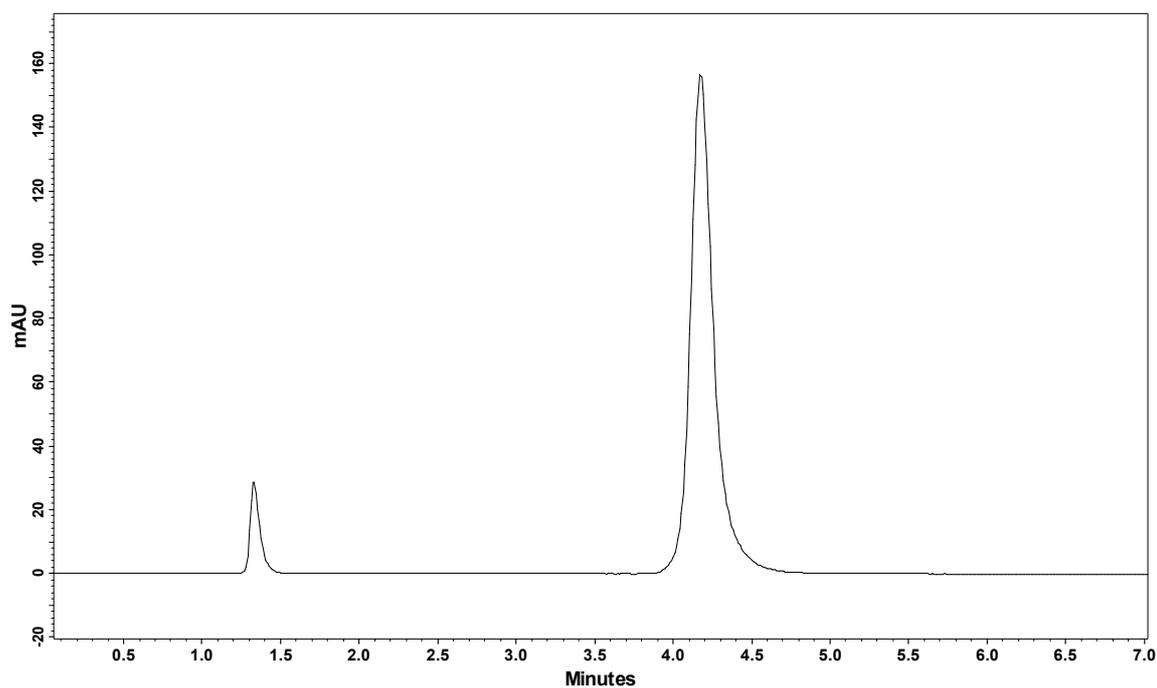


Figura 3.41. Cromatograma típico do padrão de ácido ascórbico ($t = 4,35\text{min}$; $\lambda = 234\text{nm}$), fase móvel metanol/água (35:65 v/v) $\text{pH}_{\text{cond.}} = 3,1$ com vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$.

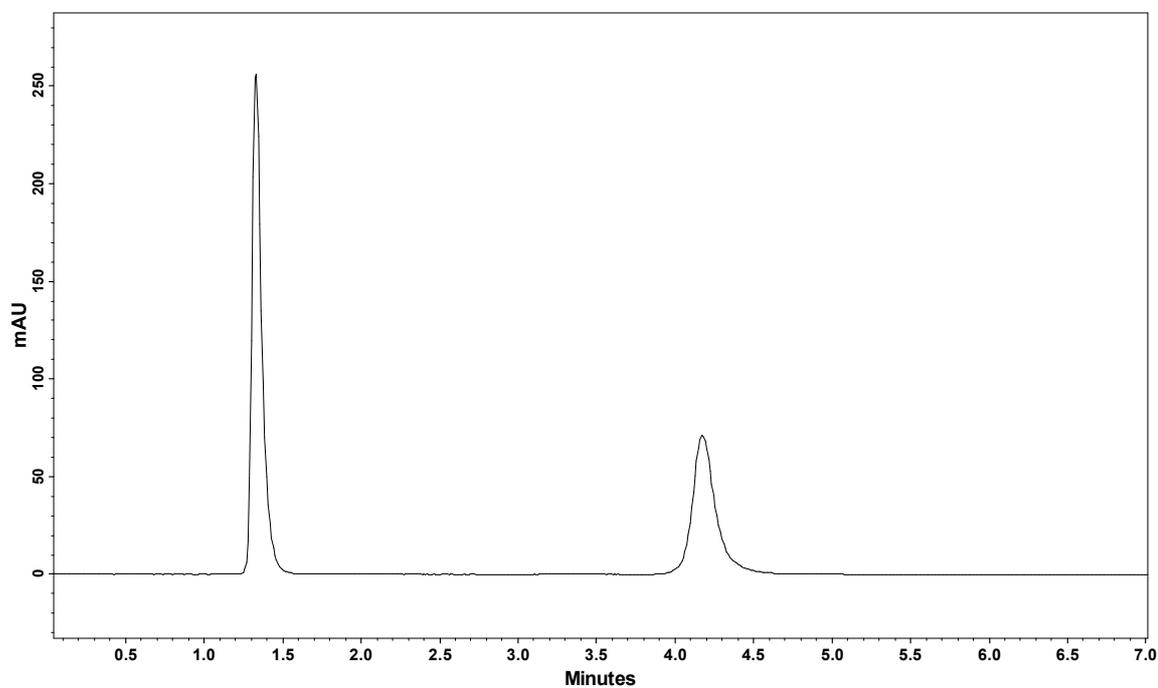


Figura 3.42 Cromatograma típico do padrão de cafeína ($t = 1,35\text{min}$; $\lambda = 273\text{nm}$), fase móvel metanol/água (35:65 v/v) $\text{pH}_{\text{cond.}} = 3,1$ com vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$.

A Figura 3.43 (A) e (B) mostra as curvas analíticas obtidas por HPLC para o (A) AA no intervalo de concentração de 1 a 6 ((1) $4,26 \times 10^{-6}$, (2) $1,02 \times 10^{-5}$, (3) $1,62 \times 10^{-5}$, (4) $2,22 \times 10^{-5}$, (5) $2,81 \times 10^{-5}$, (6) $3,41 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e para a (B) cafeína no intervalo de concentração de 1 a 6 ((1) $5,16 \times 10^{-5}$, (2) $1,03 \times 10^{-4}$, (3) $2,06 \times 10^{-4}$, (4) $2,58 \times 10^{-4}$, (5) $3,09 \times 10^{-4}$, (6) $3,61 \times 10^{-4} \text{ a mol L}^{-1}$.

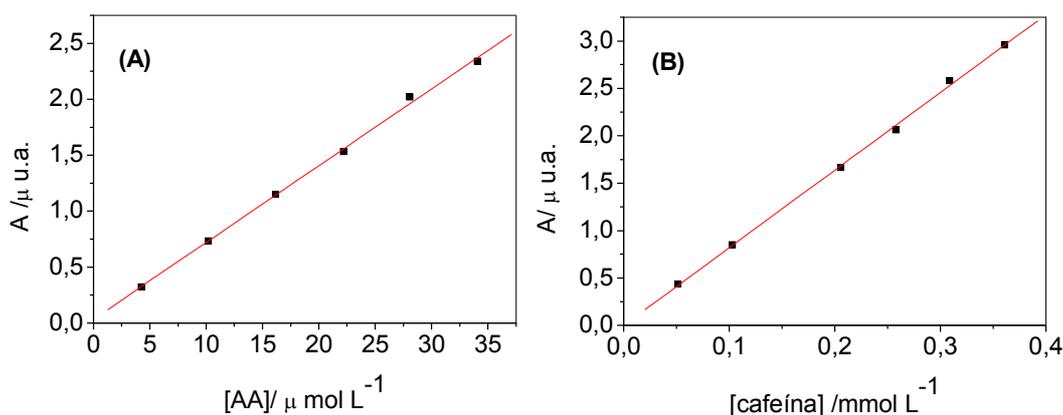


Figura 3.43 Curva analítica obtida para o (A) AA e (B) cafeína empregando HPLC, nas condições experimentais citadas nas legendas das Figuras 3.41 e 3.42.

As equações obtidas para as curvas analíticas foram:

$$A(\text{a.u.}) = 3,44 \times 10^4 + 6,86 \times 10^{10} [\text{AA}]$$

$$A(\text{a.u.}) = -1,11 \times 10^4 + 8,19 \times 10^9 [\text{cafeína}]$$

A Tabela 3.11 apresenta os resultados obtidos de AA e cafeína determinados simultaneamente em várias formulações farmacêuticas empregando o método proposto (DPV) e o método comparativo (HPLC).

Tabela 3.11 Resultados obtidos na determinação simultânea de AA e cafeína em formulações farmacêuticas por DPV (método proposto) e HPLC (método comparativo)

Amostras		Valor tabelado (mg/compr)	HPLC ^a (mg/compr)	DPV ^a (mg/ compr)	E ^b (%)
A	AA	400	293 ± 11	298 ± 3	+ 1,7
	Cafeína	100	93 ± 4	95 ± 1	+ 2,1
B	AA	100	84 ± 4	86 ± 1	+2,4
	Cafeína	20	20 ± 1	21 ± 1	+ 5,0
C	AA	100	66 ± 2	67 ± 1	+ 1,5
	Cafeína	50	53 ± 1	49 ± 0	- 7,5

a n=3

b Erro relativo (%) = $100 \times (\text{valor voltamétrico} - \text{valor HPLC}) / \text{valor HPLC}$.

Como pode ser observado na Tabela 3.11, os resultados obtidos por DPV estão em concordância com os resultados obtidos por HPLC. Aplicou-se o teste *t*-pareado para os resultados obtidos empregando-se o procedimento proposto e o procedimento de referência. Para o AA $t_{\text{exp}} = 2,34$ e para a cafeína $t_{\text{exp}} = 2,42$, ambos os valores estão abaixo do valor de tabelado ($t_{\text{crítico}} = 430$, $\alpha = 0,05$), indicando que não há diferença significativa entre os teores encontrados em um nível de confiança de 95%. Além disso, os erros relativos encontrados estão dentro de um erro aceitável.

Uma tabela comparativa (Tabela 3.12) é apresentada a seguir, a fim de resumir todos os parâmetros analíticos obtidos na determinação de cada analito estudado. Os dados são apresentados para as análises separadas e simultâneas dos analitos nas diferentes técnicas.

Tabela 3.12 - Comparação dos diferentes parâmetros analíticos obtidos na determinação dos analitos paracetamol, cafeína e AA utilizando as técnicas de DPV e SWV

	Analito	Técnica analítica	Intervalo de resposta linear (mol L⁻¹)	Sensibilidade (µA mol⁻¹ L)	Limite de detecção (mol L⁻¹)
Separada	paracetamol	SWV	$3,00 \times 10^{-7}$ a $2,12 \times 10^{-4}$	$6,16 \times 10^5$	$2,34 \times 10^{-7}$
		DPV	$6,00 \times 10^{-7}$ a $1,67 \times 10^{-4}$	$4,72 \times 10^5$	$4,98 \times 10^{-7}$
	AA	SWV	$3,98 \times 10^{-6}$ a $2,31 \times 10^{-4}$	$2,78 \times 10^5$	$3,84 \times 10^{-7}$
		DPV	$2,00 \times 10^{-6}$ a $2,31 \times 10^{-4}$	$2,30 \times 10^5$	$4,17 \times 10^{-7}$
	cafeína	SWV	$2,00 \times 10^{-6}$ a $2,86 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^6$	$1,44 \times 10^{-7}$
		DPV	$2,00 \times 10^{-6}$ a $9,10 \times 10^{-5}$	$2,27 \times 10^6$	$4,99 \times 10^{-8}$
Simultânea	paracetamol	DPV	$5,00 \times 10^{-7}$ a $8,33 \times 10^{-5}$	$5,99 \times 10^5$	$4,90 \times 10^{-7}$
	cafeína		$5,00 \times 10^{-7}$ a $8,33 \times 10^{-5}$	$2,11 \times 10^6$	$3,50 \times 10^{-8}$
	AA	DPV	$4,96 \times 10^{-6}$ a $2,11 \times 10^{-4}$	$2,73 \times 10^5$	$2,59 \times 10^{-7}$
	cafeína		$1,99 \times 10^{-6}$ a $1,09 \times 10^{-4}$	$1,29 \times 10^6$	$2,37 \times 10^{-8}$

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Na etapa inicial desse trabalho, um estudo ciclovoltagemétrico empregando-se o eletrodo de BDD para os analitos paracetamol, AA e cafeína foi realizado em diversos eletrólitos suporte, sendo esses caracterizados como processos irreversíveis.

Em uma segunda etapa, foram desenvolvidos métodos analíticos para a determinação voltamétrica por DPV e por SWV de paracetamol, AA e cafeína, separadamente, empregando-se um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD). Neste estudo foi demonstrada a possibilidade de se empregar as duas técnicas eletroanalíticas, sendo selecionada a voltametria de pulso diferencial, por apresentar algumas vantagens sobre a técnica voltamétrica de onda quadrada.

Os parâmetros estudados na voltametria de onda quadrada foram bastante importantes para um melhor entendimento dos sistemas de interesse.

O eletrodo de BDD apresentou uma melhora na resposta voltamétrica após passar por um pré-tratamento eletroquímico, onde se aplicou ao eletrodo uma corrente de $-1,0 \text{ A cm}^2$ por 180 s.

Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a viabilidade do emprego do eletrodo de BDD para a determinação de paracetamol, ácido ascórbico (AA) e cafeína em diferentes amostras utilizando voltametria de pulso diferencial.

Comparando-se os parâmetros analíticos obtidos na determinação de paracetamol, AA e cafeína individualmente, com aqueles obtidos simultaneamente (paracetamol e cafeína ou AA e cafeína) pode-se observar que os mesmos são

muito próximos, indicando assim que na determinação simultânea de dois analitos, não há interferência de um analito na determinação do outro analito e, vice-versa.

Os resultados das determinações simultâneas de paracetamol e cafeína e de AA e cafeína obtidos pelo procedimento proposto empregando DPV e pelo procedimento de referência empregando HPLC não apresentaram diferenças significativas, em um nível de confiança de 95% e, estão dentro de um erro relativo aceitável.

Diante dos resultados apresentados e discutidos, pode-se concluir que os métodos voltamétricos desenvolvidos nesta dissertação para a determinação de paracetamol, AA e cafeína em produtos farmacêuticos são adequados e poderão, em alguns casos, substituir o método cromatográfico com economia de reagentes e de equipamento, além de tempo menor de análise.

PROPOSTAS FUTURAS

Durante o desenvolvimento deste trabalho de dissertação surgiram idéias de novos trabalhos que poderiam ser desenvolvidos no futuro. Uma possibilidade é a determinação simultânea de AA, paracetamol e cafeína em fármacos. Outra possibilidade seria investigar a determinação simultânea de paracetamol, cafeína e ácido acetilsalicílico. Ademais, determinações em fluxo empregando células amperométricas contendo como eletrodo de trabalho o eletrodo BDD poderiam ser também investigadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HANS, H. History of anti-pyretic analgesic therapy. **The American Journal of Medicine**, v. 14, n. 75, p. 1-3, 1983.
2. BRUNTON, L. L. **Goodman e Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. 2007. 1984 p.
3. CONNORS, K. A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J. **Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists**. 2. ed. New York: John Wiley, 1986. 864 p.
4. BERGMAN, K.; MÜLLER, L.; TEIGEN, S. W. The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory (re) view. **Mutation Research- Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 349, p. 263-288, 1996.
5. BOSCH, M. E.; SANCHEZ, A. J. R.; ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B. Determination of paracetamol: Historical evolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 2, p. 291-321, 2006.
6. KISELY, S. R.; LAWRENCE, D.; PRESTON, N. J. The effect of recalling paracetamol on hospital admissions for poisoning in Western Australia. **Medical Journal of Australia**, v. 178, n.2, p. 72-+, 2003.
7. BRASIL. Ministério da saúde. ANVISA. Informe SNVS/Anvisa/UFARM nº 2. *Risco de intoxicação com analgésicos e antitérmicos 2002*. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 10 maio 2008.
8. VAN BENSCHOTEN, J. J.; LEWIS, J. Y.; HEINEMAN, W. R.; ROSTON, D. A.; KISSINGER, P. T. Cyclic Voltammetry Experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 772-776, 1983.
9. UNITED STATES PHARMACOPEIA. Official monographs. 21. ed. Rockville: USP, 1985. 1151 p.

10. BOSE, D.; DURGBANSHI, A.; MARTINAVARRO-DOMINGUEZ, A.; CAPELLA-PEIRO, M. E.; CARDA-BROCH, S.; ESTEVE-ROMERO, J. S. GIL-AGUSTI, M. T. Rapid determination of acetaminophen in physiological fluids by liquid chromatography using SDS mobile phase and ED detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 43, n. 6, p. 313-318, 2005.
11. FUJINO, H.; YOSHIDA, H.; NOHTA, H.; YAMAGUCHI, M. HPLC determination of acetaminophen in saliva based on precolumn fluorescence derivatization with 12-(3,5-dichloro-2,4,6-triazinyl)benzo[d]benzo[1',2'-6,5]isoindolo[1,2-b][1,3]thiazolidine. **Analytical Sciences**, v. 21, n. 9, p. 1121-1124, 2005.
12. JENSEN, L. S.; VALENTINE, J.; MILNE, R. W. EVANS, A. M. The quantification of paracetamol, paracetamol glucuronide and paracetamol sulphate in plasma and urine using a single high-performance liquid chromatography assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 3, p. 585-593, 2004.
13. MARTINEZ-ALGABA, C.; BERMUDEZ-SALDANA, J. M.; VILLANUEVA-CAMANAS, R. M.; SAGRADO, S.; MEDINA-HERNANDEZ, M. J. Analysis of pharmaceutical preparations containing antihistamine drugs by micellar liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 2, p. 312-321, 2006.
14. MCEVOY, E.; DONEGAN, S.; POWER, J.; ALTRIA, K. Optimisation and validation of a rapid and efficient microemulsion liquid chromatographic (MELC) method for the determination of paracetamol (acetaminophen) content in a suppository formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 1, p. 137-143, 2007.
15. LLORENT-MARTINEZ, E. J.; SATINSKY, D.; SOLICH, P.; ORTEGA-BARRALES, P.; MOLINA-DIAZ, A. Fluorimetric SIA optosensing in pharmaceutical analysis: Determination of paracetamol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 318-321, 2007.
16. MOREIRA, A. B.; OLIVEIRA, H. P. M.; ATVARIS, T. D. Z.; DIAS, I. L. T.; NETO, G.O.; ZAGATTO, E. A. G.; KUBOTA, L. T. Direct determination of paracetamol in powdered pharmaceutical samples by fluorescence spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, n. 1-2, p. 257-261, 2005.
17. ABDEL-WADOOD, H. M.; MOHAMED, N. A.; MOHAMED, F. A. Spectrofluorimetric determination of acetaminophen with N-bromosuccinimide. **Journal of Aoac International**, v. 88, n. 6, p. 1626-1630, 2005.

18. DEJAEGHER, B.; BLOOMFIELD, M. S.; SMEYERS-VERBEKE, J.; HEYDEN, Y. V. Validation of a fluorimetric assay for 4-aminophenol in paracetamol formulations. **Talanta**, v. 75, n. 1, p. 258-265, 2008.
19. RUENGSIAGOON, W.; LIAWRUANGRATH, S.; TOWNSHEND, A. Flow injection chemiluminescence determination of paracetamol. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 976-983, 2006.
20. ZHAO, S. L.; BAI, W. L.; YUAN, H. Y.; XIAO, D. Detection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, n. 2, p. 195-199, 2006.
21. CHIOU, J. F.; CHEN, S. L.; CHEN, S. M.; TSOU, S. S.; WU, C. Y.; CHU, J. S.; LIU, T. Z. Novel spectrophotometric method for RAPID quantifying acetaminophen concentration in emergent situation. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 16, n. 2, p. 36-40, 2008.
22. FILIK, H.; SENER, I.; CEKIC, S. D.; KILIC, E.; APAK, R. Spectrophotometric determination of paracetamol in urine with tetrahydroxycalix[4]arene as a coupling reagent and preconcentration with triton X-114 using cloud point extraction. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 6, p. 891-896, 2006.
23. SIRAJUDDIN; KHASKHELI, A. R.; SHAH, A.; BHANGER, M. L.; NIAZ, A.; MAHESAR, S. Simpler spectrophotometric assay of paracetamol in tablets and urine samples. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 68, p. 747-751, 2007.
24. NAVARRO, I.; GONZALEZARJONA, D.; ROLDAN, E.; RUEDA, M. Determination of paracetamol in tablets and blood-plasma by differential pulse voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 6, n. 6-8, p. 969-976, 1988.
25. VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determination of paracetamol in pharmaceutical products using a carbon paste biosensor modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 39-43, 2003.
26. CHRISTIE, I.; LEEDS, S.; BAKER, M.; KEEDY, F.; VADGAMA, P. Direct electrochemical determination of paracetamol in plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 272, n. 1, p. 145-150, 1993.

27. WANGFUENGGANAGUL, N.; CHAILAPAKUL, O. Electrochemical analysis of acetaminophen using a boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 841-847, 2002.
28. SHANGGUAN, X. D.; ZHANG, H. F.; ZHENG, J. B. Electrochemical behavior and differential pulse voltammetric determination of paracetamol at a carbon ionic liquid electrode. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 3, p. 1049-1055, 2008.
29. DUAN, L. S.; XIE, F.; ZHOU, F.; WANG, S. F. The electrochemical Behavior of acetaminophen on multi-walled carbon nanotubes modified electrode and its analytical application. **Analytical Letters**, v. 40, p. 2653-2663, 2007.
30. GOYAL, R. N.; SINGH, S. P. Voltammetric determination of paracetamol at C-60-modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 15, p. 3008-3012, 2006.
31. WANG, C. H.; LI, C. Y.; WANG, F.; WANG, C. F. Covalent modification of glassy carbon electrode with L-cysteine for the determination of acetaminophen. **Microchimica Acta**, v. 155, n. 3-4, p. 365-371, 2006.
32. WANG, S. F.; XIE, F.; HU, R. F. Carbon-coated nickel magnetic nanoparticles modified electrodes as a sensor for determination of acetaminophen. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 123, n. 1, p. 495-500, 2007.
33. ROIG, M. G.; RIVERA, Z. S.; KENNEDY, J. F. L-ascorbic acid: An overview. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 44, n. 1, p. 59-72, 1993.
34. HICKEY, S. ROBERTS, H. **Ascorbate**: the science of Vitamin C. Morrisville: Lulu Press, 2004. 264p.
35. ASARD, H.; MAY, J. M. SMIRNOFF, N. **Vitamin C**: function and biochemistry in animals and plants. London: Garland Science/BIOS Scientific, 2004. 358 p.
36. BUHL, F.; SZPIKOWSKA-SROKA, B.; GALKOWSKA, M. Determination of L-ascorbic acid after chromatographic separation. **Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc**, v. 18, n. 105, p. 368-371, 2005.

37. MANDL, J.; SZARKA, A.; BANHEGYI, G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 7, p. 1097-1110, 2009.
38. PADAYATTY, S. J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J. -H.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S. K.; LEVINE, M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 18-35, 2003.
39. PINNELL, S. R.; MURAD, S.; DARR, D. Induction of Collagen Synthesis by Ascorbic Acid: A Possible Mechanism. **Archives of Dermatology**, v. 123, n. 12, p. 1684-1686, 1987.
40. LEVINE, M.; WANG, Y.; PADAYATTY, S. J.; MORROW, J. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 17, p. 9842-9846, 2001.
41. RICE, R.; ALLRED, C.; MCCREERY, R. Fast heterogeneous electron-transfer rates for glassy-carbon electrodes without polishing or activation procedures **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 263, n. 1, p. 163-169, 1989.
42. TARASOVA, V. A.; KIRYUSHOV, V. N. Activation of solid electrodes made of platinum, gold, and a graphite-epoxy resin composite by mechanically cutting their surfaces in situ in the anodic voltammetry of ascorbic acid. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 56-60, 2005.
43. SHIN, D.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A.; MERKOCI, A.; WANG, J. Resistance to surfactant and protein fouling effects at conducting diamond electrodes. **Electroanalysis**, v. 17, n. 4, p. 305-311, 2005.
44. ARYA, S. P.; MAHAJAN, M.; JAIN, P. Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. **Analytica Chimica Acta**, v. 417, n. 1, p. 1-14, 2000.
45. IJERI; VIJAYKUMAR, S.; ALGARRA, M.; MARTINS, A. Electrocatalytic determination of vitamin c using calixarene modified carbon paste electrodes. **Electroanalysis**, v. 16, n. 24, p. 2082-2086, 2004.
46. MALINAUSKAS, A.; GARJONYTE, R.; MAZEIKIENE, R.; JUREVICIUTE, I. Electrochemical response of ascorbic acid at conducting and electrogenerated polymer modified electrodes for electroanalytical applications: a review. **Talanta**, v. 64, n. 1, p. 121-129, 2004.

47. WANG, B. Z.; NOGUCHI, T.; ANZAI, J. Layer-by-layer thin film-coated electrodes for electrocatalytic determination of ascorbic acid. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 415-418, 2007.
48. WANTZ, F.; BANKS, C. E.; COMPTON, R. G. Direct oxidation of ascorbic acid at an edge plane pyrolytic graphite electrode: a comparison of the electroanalytical response with other carbon electrodes. **Electroanalysis**, v. 17, n. 17, p. 1529-1533, 2005.
49. HU, I. F.; KUWANA, T. Oxidative mechanism of ascorbic-acid at glassy-carbon electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 3235-3239, 1986.
50. RUIZ, J. J.; ALDAZ, A.; DOMINGUEZ, M. Mechanism of L-ascorbic-acid oxidation and dehydro-L-ascorbic acid reduction on a mercury-electrode.1.acid-medium. **Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie**, v. 55, n. 15, p. 2799-2806, 1977.
51. FARMACOPÉIA Brasileira. 3. ed. São Palo: Atheneu. 1977. 1218 p.
52. VERMA, K. K.; PALOD, S. Determination of ascorbic acid in fruits and pharmaceuticals by titration with thallium(III). **Microchimica Acta**, v. 80, n. 5, p. 361-367, 1983.
53. PÉREZ-RUIZ, T.; MARTÍNEZ-LOZANO, C.; SANZ, A. Flow-injection chemiluminometric determination of ascorbic acid based on its sensitized photooxidation. **Analytica Chimica Acta**, v. 308, n. 1-3, p. 299-307, 1995.
54. VEAZEY, R. L.; NIEMAN, T. A. Chemiluminescence high-performance liquid chromatographic detector applied to ascorbic acid determinations. **Journal of Chromatography A**, v. 200, p. 153-162, 1980.
55. FINLEY, J. W.; DUANG, E. Resolution of ascorbic, dehydroascorbic and diketogulonic acids by paire-ion reversed-phase chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 207, n. 3, p. 449-453, 1981.
56. MEDINA, A. R.; FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; MOLINA DÍAZ, A. A. rapid and selective solid-phase UV spectrophotometric method for determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, n. 1-2, p. 247-254, 1999.

57. ZENG, W.M.; MARTINUZZI, F. MACGREGOR, A. Development and application of a novel UV method for the analysis of ascorbic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 5, p. 1107-1111, 2005.
58. KLESZCZEWSKI, T.; KLESZCZEWSKA, E. Flow injection spectrophotometric determination of -ascorbic acid in biological matters. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 4, p. 755-759, 2002.
59. DAI, H.; WU, X.; WANG, Y.; ZHOU, W.; CHEN, G. An electrochemiluminescent biosensor for vitamin C based on inhibition of luminol electrochemiluminescence on graphite/poly(methylmethacrylate) composite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 16, p. 5113-5117, 2008.
60. LERTANANTAWONG, B.; O'MULLANE, A. P.; ZHANG, J.; SURAREUNGCHAI, W.; SOMASUNDRUM, M.; BOND, A. M. Investigation of mediated oxidation of ascorbic acid by ferrocenemethanol using large-amplitude fourier transformed ac voltammetry under quasi-reversible electron-transfer conditions at an indium tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 17, p. 6515-6525, 2008.
61. OUKIL, D.; MAKHLOUFI, L. SAIDANI, B. Preparation of polypyrrole films containing ferrocyanide ions deposited onto thermally pre-treated and untreated iron substrate: Application in the electroanalytical determination of ascorbic acid. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 123, n. 2, p. 1083-1089, 2007.
62. TEIXEIRA, M. F. S.; RAMOS, L. A.; FATIBELLO-FILHO, O.; CAVALHEIRO, E. T. G. Carbon paste electrode modified with copper(II) phosphate immobilized in a polyester resin for voltammetric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical formulations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 2, p. 214-219, 2003.
63. KUMAR, S. A.; CHENG, H. W.; CHEN, S. M. Electroanalysis of ascorbic acid (vitamin C) using nano-ZnO/poly(luminol) hybrid film modified electrode. **Reactive & Functional Polymers**, v. 69, n. 6, p. 364-370, 2009.
64. KOMATSU, M.; FUJISHIMA, A. Detection of ascorbic acid in an ethanol-water mixed solution on a conductive diamond electrode. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 76, n. 5, p. 927-933, 2003.
65. DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Analytical methods for caffeine. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

66. SPILLER, G. A. **Caffeine**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 366 p.
67. JAMES, J. E. **Understanding caffeine: a biobehavioral analysis**. London: Sage, 1997. 226 p.
68. KERRIGAN, S.; LINDSEY, T. Fatal caffeine overdose: two case reports. **Forensic Science International**, v. 153, n. 1, p. 67-69, 2005.
69. SMITH, A. Effects of caffeine on human behavior. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 9, p. 1243-1255, 2002.
70. SAWYNOK, J. Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine **Drugs**, v. 49, n. 1, p. 37-50, 1995.
71. HANSEN, B. H.; DRYHURST, G. Electrochemical oxidation of theobromine and caffeine at pyrolytic graphite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 407-8, 1971.
72. SPATARU, N.; SARADA, B. V.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application. **Electroanalysis**, v. 14, n. 11, p. 721-728, 2002.
73. DING, M. Z.; ZOU, J. K. Centrifugal extraction procedure for the ultraviolet spectrophotometric determination of caffeine in beverages. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 381-384, 2008.
74. ISHLER, N. H.; FINUCANE, T. P.; BORKER, E. Rapid spectrophotometric determination of caffeine. **Analytical Chemistry**, v. 20, n. 12, p. 1162-1166, 1948.
75. KHANCHI, A. R.; MAHANI, M. K.; HAJIHOSSEINI, M.; MARAGHEH, M. G.; CHALOOSI, M.; BANI, F. Simultaneous spectrophotometric determination of caffeine and theobromine in Iranian tea by artificial neural networks and its comparison with PLS. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 1062-1068, 2007.
76. YAMAUCHI, Y.; NAKAMURA, A.; KOHNO, I.; KITAI, M.; HATANAKA, K.; TANIMOTO, T. Simple and rapid UV spectrophotometry of caffeine in tea coupled with sample pre-treatment using a cartridge column filled with polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 2, p. 185-188, 2008.

77. EVANS, R. L.; BILLEDEAU, S. M.; SIITONEN, P. H. Determination of caffeine and adrenergic amines in weight loss supplements by high performance liquid chromatography. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 230, p. U52-U52, 2005.

78. EVANS, R. L.; SIITONEN, P. H. Determination of caffeine and sympathomimetic alkaloids in weight loss supplements by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. 1, p. 61-67, 2008.

79. RODRIGUES, C. I.; MARTA, L.; MAIA, R.; MIRANDA, M.; RIBEIRINHO, M.; MAGUAS, C. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 5, p. 440-448, 2007.

80. SAITO, S. T.; FROEHLICH, P. E.; GOSMANN, G.; BERGOLD, A. M. Full validation of a simple method for determination of catechins and caffeine in Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) using HPLC. **Chromatographia**, v. 65, n. 9-10, p. 607-610, 2007.

81. YAMAUCHI, Y.; NAKAMURA, A.; KITAI, M.; HATANAKA, K.; KOHNO, I.; TANIMOTO, T. Improved sample pre-treatment for determination of caffeine in tea using a cartridge filled with polyvinylpyrrolidone (PVPP). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 1393-1396, 2007.

82. FENSKE, M. Caffeine determination in human saliva and urine by TLC and ultraviolet absorption densitometry. **Chromatographia**, v. 65, n. 3-4, p. 233-238, 2007.

83. INJAC, R.; SRDJENOVIC, B.; PRIJATELJ, M.; BOSKOVIC, M.; KARLJIKOVIC-RAJIC, K.; STRUKELJ, B. Determination of caffeine and associated compounds in food, beverages, natural products, pharmaceuticals, and cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. 2, p. 137-143, 2008.

84. ITO, M.; SUZUKI, T.; YADA, S.; KUSAI, A.; NAKAGAMI, H.; YONEMOCHI, E.; TERADA, K. Development of a method for the determination of caffeine anhydrate in various designed intact tablets by near-infrared spectroscopy: A comparison between reflectance and transmittance technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4-5, p. 819-827, 2008.

85. ZEN, J. M.; TING, Y. S.; SHIH, Y. Voltammetric determination of caffeine in beverages using a chemically modified electrode. **Analyst**, v. 123, n. 5, p. 1145-1147, 1998.
86. SABA, P.; BROWN, W. A.; OMANOVIC, S. Interactive behavior of caffeine at a platinum electrode surface. **Materials Chemistry and Physics**, v. 100, n. 2-3, p. 285-291, 2006.
87. BRUNETTI, B.; DESIMONI, E.; CASATI, P. Determination of caffeine at a Nafion-covered glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 19, n. 2-3, p. 385-388, 2007.
88. LY, S. Y.; JUNG, Y. S.; KIM, M. H.; HAN, I. K.; JUNG, W. W.; KIM, H. S. Determination of caffeine using a simple graphite pencil electrode with square-wave anodic stripping voltammetry. **Microchimica Acta**, v. 146, n. 3-4, p. 207-213, 2004.
89. AKLILU, M.; TESSEMA, M.; REDI-ABSHIRO, M. Indirect voltammetric determination of caffeine content in coffee using 1,4-benzoquinone modified carbon paste electrode. **Talanta**, v. 76, n. 4, p. 742-746, 2008.
90. BABU, V. R. S.; PATRA, S.; KARANTH, N. G.; KUMAR, M. A.; THAKUR, M. S. Development of a biosensor for caffeine. **Analytica Chimica Acta**, v. 582, n. 2, p. 329-334, 2007.
91. MUSZALSKA, I.; ZAJAC, M.; CZAJKOWSKI, K.; NOGOWSKA, M. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, ascorbic acid and phenylephrine hydrochloride in pharmaceutical formulations by HPLC. **Chemia Analityczna**, v. 45, n. 6, p. 825-833, 2000.
92. DINC, E.; OZDEMIR, A.; BALEANU, D. An application of derivative and continuous wavelet transforms to the overlapping ratio spectra for the quantitative multiresolution of a ternary mixture of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in tablets. **Talanta**, v. 65, n. 1, p. 36-47, 2005.
93. SUN, S.; LIU, G.; WANG, Y. Simultaneous determination of acetaminophen, caffeine, and chlorphenamine maleate in paracetamol and chlorphenamine maleate granules. **Chromatographia**, v. 64, n. 11, p. 719-724, 2006.
94. BOUHSAIN, Z.; GARRIGUES, S.; DELAGUARDIA, M. Simultaneous stopped-flow determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulations by Fourier transform infrared spectrometry with partial least-squares data treatment. **Analyst**, v. 121, n. 12, p. 1935-1938, 1996.

95. ZEN, J. M.; TING, Y. S. Simultaneous determination of caffeine and acetaminophen in drug formulations by square-wave voltammetry using a chemically modified electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 342, n. 2-3, p. 175-180, 1997.
96. LAU, O. W.; LUK, S. F.; CHEUNG, Y. M. Simultaneous determination of ascorbic acid, caffeine and paracetamol in drug formulations by differential-pulse voltammetry using a glassy-carbon electrode. **Analyst**, v. 114, n. 9, p. 1047-1051, 1989.
97. PRODAN, M.; GERE-PASZTI, E.; FARKAS, O.; FORGACS, E. Validation and simultaneous determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations by RP-HPLC. **Chemia Analityczna**, v. 48, n. 6, p. 901-907, 2003.
98. WANG, A.; SUN, J.; FENG, H. J.; GAO, S.; HE, Z. G. Simultaneous determination of paracetamol and caffeine in human plasma by LC-ESI-MS. **Chromatographia**, v. 67, n. 3-4, p. 281-285, 2008.
99. KHOSHAYAND, M. R.; ABDOLLAHI, H.; SHARIATPANAHI, M.; SAADATFARD, A.; MOHAMMADI, A. Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by chemometric methods. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 70, n. 3, p. 491-499, 2008.
100. KULIKOV, A. U.; VERUSHKIN, A. G. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, guaifenesin and preservatives in syrups by micellar LC. **Chromatographia**, v. 67, n. 5-6, p. 347-355, 2008.
101. DINC, E.; BALEANU, D. Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical least-squares and principal component regression techniques. **Farmaco**, v. 57, n. 1, p. 33-37, 2002.
102. ALTUN, M. L. HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyrone. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 521-528, 2002.
103. MOREIRA, A. B.; DIAS, I. L. T.; NETO, G. O.; ZAGATTO, E. A. G.; KUBOTA, L. T. Simultaneous spectrofluorimetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical preparations in solid-phase using partial least squares multivariate calibration. **Analytical Letters**, v. 39, n. 2, p. 349-360, 2006.

104. TAVALLALI, H.; SHEIKHAEI, M. Simultaneous kinetic determination of paracetamol and caffeine using Cu(II)-neocuproine in presence of dodecyl sulfate by H-point standard addition method. **Indian Journal of Chemistry- Section A: Inorganic, Bio-Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 812-816, 2009.
105. BLANCO, M.; ALCALA, M. Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 2-3, p. 280-286, 2006.
106. BOUHSAIN, Z.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. PLS-UV spectrophotometric method for the simultaneous determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulations. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 357, n. 7, p. 973-976, 1997.
107. VIDAL, A. D.; BARRALES, P. O.; DIAZ, A. M. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in pharmaceuticals by means of a single flow-through UV multiparameter sensor. **Microchimica Acta**, v. 141, n. 3-4, p. 157-163, 2003.
108. EMRE, D.; OZALTIN, N. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 847, n. 2, p. 126-132, 2007.
109. RUIZ MEDINA, A.; FERNANDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; MOLINA-DIAZ, A. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet pls multiptosensing device. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, n. 5, p. 983-992, 1999.
110. DINÇ, E.; BALEANU, D.; ONUR, F. Spectrophotometric multicomponent analysis of a mixture of metamizol, acetaminophen and caffeine in pharmaceutical formulations by two chemometric techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 5-6, p. 949-957, 2001.
111. REIVHARD, J. A. D. K. **Diamond films handbook**. New York: Marcel Dekker, 2002. 686 p.
112. SUSSMANN, R. S. **CVD diamond for electronic devices and sensors**. New York: John Wiley, 2009. 571 p.

113. PLESKOV, Y. V. Electrochemistry of diamond: a review. **Russian Journal Electrochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1275-1291, 2002.
114. KRAFT, A. Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, n. 5, p. 355-385, 2007.
115. PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Application of diamond electrodes to electrochemical processes. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 2, p. 191-199, 2005.
116. HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, R.; STOTTER, J.; CVACKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y.; SWAIN, G. M. Conductive diamond thin-films in electrochemistry. **Diamond and Related Materials**, v. 12, n. 10-11, p. 1940-1949, 2003.
117. FERRO, S. Synthesis of diamond. **Journal of Materials Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 2843-2855, 2002.
118. PLESKOV, Y. V. Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1045-1050, 2000.
119. POFERL, D. J.; GARDNER, N. C.; ANGUS, J. C. Growth of boron-doped diamond seed crystals by vapor deposition. **Journal of Applied Physics**, v. 44, n. 4, p. 1428-1434, 1973.
120. FUJIMORI, N.; IMAI, T.; DOI, A. Characterization of conducting diamond films. **Vacuum**, v. 36, n. 1-3, p. 99-102, 1986.
121. DE BARROS, R. D. M.; RIBEIRO, M. C.; AN-SUMODJO, P. T.; JULIAO, M. S. D.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, N. G. Boron-doped CVD diamond films. Part 1. History, production and characterization. **Quimica Nova**, v. 28, n. 2, p. 317-325, 2005.
122. BAIRU, S. G.; STEFAN, R. I.; VAN STADEN, J. F. Polycrystalline diamond-based electrochemical sensors and their applications in inorganic and organic analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 145-153, 2003.

123. JULIÃO, M. S. D.; ALMEIDA, E. C.; LA SCALEA, M. A.; FERREIRA, N. G.; COMPTON, R. G.; SERRANO, S. H. P. Voltammetric Behavior of Nitrofurazone at Highly Boron Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 17, n. 3, p. 269-274, 2005.
124. LOURENÇÃO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; MAZO, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 748-752, 2009.
125. PECKOVA, K.; MUSILOVA, J.; BAREK, J. Boron-doped diamond film electrodes new tool for voltammetric determination of organic substances. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 148-172, 2009.
126. 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**, v. 76, n. 3, p. 685-689, 2008.
127. SARTORI, E. R.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA, R. C.; FATIBELLO, O. Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need of previous alkaline hydrolysis step. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 360-366, 2009.
128. ANDRADE, L. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; CASS, Q. B.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 12, n. 13, p. 1475-1480, 2009.
129. BABYAK, C.; SMART, R. R. Electrochemical detection of trace concentrations of cadmium and lead with a boron-doped diamond electrode: Effect of KCl and KNO₃ electrolytes, interferences and measurement in river water. **Electroanalysis**, v. 16, n. 3, p. 175-182, 2004.
130. DRAGOE, D.; SPATARU, N.; KAWASAKI, R.; MANIVANNAN, A.; SPATARU, T.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Detection of trace levels of Pb²⁺ in tap water at boron-doped diamond electrodes with anodic stripping voltammetry. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 12, p. 2437-2441, 2006.

131. SONG, Y.; SWAIN, G. M. Development of a method for total inorganic arsenic analysis using anodic stripping voltammetry and a Au-coated, diamond thin-film electrode. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 6, p. 2412-2420, 2007.
132. ALFARO, M. A. Q.; FERRO, S.; MARTINEZ-HUITLE, C. A.; VONG, Y. M. Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2006.
133. YU, H. B.; WANG, H.; QUAN, X.; CHEN, S.; ZHANG, Y. B. Amperometric determination of chemical oxygen demand using boron-doped diamond (BDD) sensor. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. p. 2280-2285, 2007.
134. YU, H. B.; MA, C. J.; QUAN, X.; CHEN, S.; ZHAO, H. M. Flow injection analysis of chemical oxygen demand (COD) by using a boron-doped diamond (BDD) electrode. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 6, p. 1935-1939, 2009.
135. YAGI, I.; NOTSU, H.; KONDO, T.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 473, n. 1-2, p. 173-178, 1999.
136. SALAZAR-BANDA, G. R.; ANDRADE, L. S.; NASCENTE, P. A. P.; PIZANI, P. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 22, p. 4612-4619, 2006.
137. GIRARD, H.; SIMON, N.; BALLUTAUD, D.; HERLERN, M.; ETCHEBERRY, A. Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes. **Diamond and Related Materials**, v. 16, n. 2, p. 316-325, 2007.
138. SIMON, N.; GIRARD, H.; BALLUTAUD, D.; GHODBANE, S.; DENEUVILLE, A.; HERLEM, M.; ETCHEBERRY, A. Effect of H and O termination on the charge transfer of moderately boron doped diamond electrodes. **Diamond and Related Materials**, v. 14, n. 3-7, p. 1179-1182, 2005.
139. SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 22-23, p. 4021-4026, 2004.
140. WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. Hoboken, New York: John Wiley, 2006. 250 p.

141. BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. New York: Oxford University, 1993. 427 p.

142. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thomson, 2007. 999 p.

143. MIRCESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIC, S.; LOVRIC, M. **Square-wave voltametry**. Theory and application. New York: Springer, 2007. 201 p.

144. FRANETA, J. T.; AGBABA, D.; ERIC, S.; PAVKOV, S.; ALEKSIC, M.; VLADIMIROV, S. HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. **Farmaco**, v. 57, n. 9, p. 709-713, 2002.

145. AKAY, C.; DEGIM, I. T.; SAYAL, A.; AYDIN, A.; OZKAN, Y.; GUL, H. Rapid and simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and their degradation and toxic impurity products by HPLC in pharmaceutical dosage forms. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 167-173, 2008.

146. GOYAL, R. N.; GUPTA, V. K.; OYAMA, M.; BACHHETI, N. Differential pulse voltammetric determination of paracetamol at nanogold modified indium tin oxide electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 7, n. 8, p. 803-807, 2005.

147. FELIX, F. S.; BRETT, C. M. A.; ANGNES, L. Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 5, p. 1622-1627, 2007.

148. GOSSER JR, D. K. **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**. New York: VCH, 1994. 154 p.

149. DOS REIS, A. P.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Micelle-mediated method for simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid by differential pulse voltammetry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1567-1573, 2008.