



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
UNIDADE ACADÊMICA DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE EPINEFRINA EM FÁRMACO POR  
ANÁLISE DE INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) E ANÁLISE POR  
INJEÇÃO EM FLUXO (FIA) COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA**

Lya Christina da Costa Brito



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação       Tese

#### 2. Nome completo do autor

Lya Christina da Costa Brito

#### 3. Título do trabalho

DETERMINAÇÃO DE EPINEFRINA EM FÁRMACO POR ANÁLISE DE INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) E ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA) COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Santos Andrade, Professor do Magistério Superior**, em 21/01/2022, às 14:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **LYA CHRISTINA DA COSTA BRITO, Discente**, em 31/01/2022, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2562424** e o código CRC **BB04C153**.

---

Referência: Processo nº 23070.065361/2021-14

SEI nº 2562424

LYA CHRISTINA DA COSTA BRITO

**DETERMINAÇÃO DE EPINEFRINA EM FÁRMACO POR  
ANÁLISE DE INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) E ANÁLISE POR  
INJEÇÃO EM FLUXO (FIA) COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás/Universidade Federal de Catalão, como pré-requisito necessário para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Dr. Leonardo Santos Andrade

Catalão – GO

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFCAT.

Brito, Lya Christina da Costa  
DETERMINAÇÃO DE EPINEFRINA EM FÁRMACO POR  
ANÁLISE DE INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) E ANÁLISE POR  
INJEÇÃO EM FLUXO (FIA) COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA /  
Lya Christina da Costa Brito. - 2021.  
59, f.

Orientador: Prof. Leonardo Santos Andrade.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Catalão, Instituto  
de Química, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química,  
Catalão, 2021.

Bibliografia.  
Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de  
tabelas.

1. BIA. 2. FIA. 3. Epinefrina. 4. Eletrodo de diamante. I. Andrade,  
Leonardo Santos, orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Ata nº 15 da sessão de Defesa de Tese/Dissertação de Lya Christina da Costa Brito, que confere o título de Mestre(a) em Química, na área de concentração em Química.

Ao três dias do mês de dezembro de dois mil e vinte um, a partir das 14.00 horas, na sala [meet.google.com/qzd-aapr-rfx](https://meet.google.com/qzd-aapr-rfx), realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese/Dissertação intitulada "DETERMINAÇÃO DE EPINEFRINA EM FÁRMACO POR ANÁLISE DE INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) E ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA) COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA" por meio de vídeo conferência, onde os programas de pós-graduação stricto sensu em funcionamento encontram-se provisoriamente vinculados à Universidade Federal de Goiás, em virtude de procedimentos técnicos relacionados à CAPES, já sendo realizada a transferência da Biblioteca Digital de Dissertações e Teses (BDTD). Assim, justifica-se os nomes das instituições neste documento, uma no cabeçalho (UFG), outra no corpo do texto (UFCAT). Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Leonardo Santos Andrade (PPGQ-Mestrado/UFCAT) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Sheila Cristina Canobre (UFU), membro titular externo; Professor Doutor Edison Aparecido Laurindo (UNIFEI), membro titular externo. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata (X) Aprovada ( ) Reprovado(a) pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Leonardo Santos Andrade, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

DETERMINAÇÃO DE EPINEFRINA EM MEDICAMENTO POR ANÁLISE DE INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) E ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA) COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA Não houve alteração no título



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Santos Andrade, Professor do Magistério Superior**, em 03/12/2021, às 18:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **EDISON APARECIDO LAURINDO, Usuário Externo**, em 03/12/2021, às 19:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sheila Cristina Canobre, Usuário Externo**, em 03/12/2021, às 19:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



[https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2542446** e o código CRC **B70082E2**.

---

Referência: Processo nº 23070.065361/2021-14

SEI nº 2542446

Os Programas de Pós-Graduação stricto sensu em funcionamento na Universidade Federal de Catalão (UFCAT), em virtude de procedimentos técnicos relacionados à CAPES, continuam provisoriamente vinculados à Universidade Federal de Goiás (UFG), por isso, todos os elementos pré-textuais do trabalho apresentado estão identificados como Universidade Federal de Goiás/Universidade Federal de Catalão em implantação, em função da migração da BDTD ter ocorrido a partir de 16 de agosto de 2021, assim como pelo fato das pesquisas e produtos serem realizados na UFCAT.

“O que dá o verdadeiro sentido ao encontro é a busca, e é preciso andar muito para se alcançar o que está perto”.

José Saramago

Dedico esse trabalho ao meu filho José Paulo que me trouxe serenidade e força para finalizar mais essa etapa da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me concedido saúde e sabedoria ao longo desta jornada.

Aos meus pais Delvair e Paulo, por toda a dedicação e empenho em minha criação e formação e pelo acolhimento nas horas difíceis.

Ao meu esposo Paulo Henrique por me apoiar, incentivar e sempre torcer pelo meu sucesso.

Ao meu filho José Paulo por tornar meus dias mais leves e felizes.

Ao professor Dr. Leonardo Santos Andrade pela orientação e por toda contribuição no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Eduardo M. Richter do IQ/UFU pela célula BIA utilizada neste trabalho.

Aos colegas do LAPAM pela força, amizade e momentos de descontração. Em especial, a Gabriela pelo auxílio nas horas de necessidade e pela grandiosidade em dividir seus conhecimentos.

Ao CNPq, CAPES e CNPq pelos apoios financeiros concedidos, os quais foram essenciais à realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho! Meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

Nesta dissertação apresenta-se o desenvolvimento e validação de método eletroquímico visando seu emprego para determinação eletroquímica de epinefrina (EP) em medicamento por meio da análise por injeção em batelada (BIA) e análise por injeção em fluxo (FIA), utilizando a técnica de amperometria. As análises eletroquímicas foram realizadas utilizando como eletrodo de trabalho um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) pré-tratado catodicamente. A caracterização eletroquímica da EP sob eletrodo de DDB mostrou um pico de oxidação do analito com maior sinal eletroquímico em pH 7,0 utilizando como eletrólito suporte tampão fosfato 0,01 mol L<sup>-1</sup>. As melhores condições obtidas na determinação eletroquímica de EP pelo uso do sistema BIA foram: velocidade de injeção de 70 µL s<sup>-1</sup>, volume de injeção de 100 µL e aplicação de um potencial 0,85V×Ag/AgCl (KCl sat.). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos pelo método BIA com detecção amperométrica foram de 0,05 µmol L<sup>-1</sup> e 0,1 µmolL<sup>-1</sup>, respectivamente. O desvio padrão relativo (DPR) de 10 análises sucessivas na mesma concentração de EP foi de 1,37%, evidenciando ótima repetibilidade. Para o sistema FIA com detecção amperométrica, as melhores condições para os parâmetros investigados foram obtidas em 200 µL para o volume de injeção e 3,0 mL min<sup>-1</sup> para velocidade injeção, com um potencial aplicado de 0,85 V × Ag/AgCl (KCl sat.). Os LD e LQ obtidos para a determinação eletroquímica de EP realizados no sistema FIA foram de 1,0 µmol L<sup>-1</sup> e 4,0 µmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, com DPR de 4,45% (n = 10). As recuperações médias na aplicação dos métodos para a determinação eletroquímica de EP em medicamento (ampolas de EP) variaram entre 113% e 119% sendo a precisão obtida para os dois métodos (FIA e BIA) inferiores a 20%, o que demonstra a boa exatidão e precisão dos métodos desenvolvidos.

**Palavras-chave:** BIA; FIA; Epinefrina; Eletrodo de diamante.

## ABSTRACT

This master's thesis presents the development and validation of an electrochemical method aiming its use for the electrochemical determination (amperometry) of epinephrine (EP) in a drug using batch injection analysis (BIA) or flow injection analysis (FIA) systems. The electrochemical analyzes were performed using a cathodically pretreated boron-doped diamond (BDD) electrode as working electrode. The electrochemical characterization of EP under a BDD electrode showed an analyte oxidation peak with higher electrochemical signal at pH 7.0 using 0.01 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer electrolyte. The best conditions obtained in the electrochemical determination of EP using the BIA system were: injection rate of 70 μL s<sup>-1</sup>, injection volume of 100 μL and application of a potential 0.85 V × Ag/AgCl (sat. KCl). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) obtained by the BIA method with amperometric detection were 0.05 μmol L<sup>-1</sup> and 0.1 μmol L<sup>-1</sup>, respectively. The relative standard deviation (RSD) of 10 successive analyzes at the same EP concentration was 1.37%, showing excellent repeatability. For the FIA system with amperometric detection, the best conditions for the investigated parameters were obtained at 200 μL for injection volume and 3.0 mL min<sup>-1</sup> for injection speed, with an applied potential of 0.85 V × Ag/AgCl (sat. KCl). The LOD and LOQ obtained for the electrochemical determination of EP performed in the FIA system were 1.0 μmol L<sup>-1</sup> and 4.0 μmol L<sup>-1</sup>, respectively, with a RSD of 4.45% (n = 10). The average recoveries in the application of both methods (FIA and BIA) for electrochemical determination of EP in pharmaceutical formulation (ampoules) ranged between 113% and 119%, with the accuracy lower than 20%, which demonstrates the good accuracy and precision of the developed methods.

Keywords: BIA; FIA; Epinephrine; Diamond electrode.

## LISTAS DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 1.</b> Estrutura da molécula de Epinefrina.....   | 3  |
| <b>FIGURA 2.</b> Esquema de varredura de uma janela de potencial na VC (A) sistema reversível (B) Voltamograma de uma reação reversível de um ciclo de varredura. ....  | 6  |
| <b>FIGURA 3:</b> Cronoamperograma para o processo de A) oxidação e B) redução. ....   | 7  |
| <b>FIGURA 4.</b> Apresentação do esquema de montagem da célula BIA. (1) placa metálica, (2) Eletrodo de trabalho, (3) Eletrodo de referência, (4) Contra-eletrodo, (5) Entrada para micropipeta eletrônica e (6) Entrada para agitação da solução. ....                               | 8  |
| <b>FIGURA 5.</b> Etapas de operação do processo BIA e amperograma obtido. ....  | 9  |
| <b>FIGURA 6.</b> Esquema representativo do sistema FIA. Em (A) canal onde pasa o eletrólito - suporte, em (B) carregamento da alça de amostragem e em (C) dispersão da amostra no eletrólito suporte.....   | 10 |
| <b>FIGURA 7.</b> Suporte de teflon para o eletrodo de trabalho (DDB): (A) suporte aberto mostrando o compartimento onde o eletrodo de trabalho é colocado (B) eletrodo de DDB sendo colocado no suporte e (C) suporte fechado pronto para ser usado nas análises eletroquímicas. .... | 19 |
| <b>FIGURA 8.</b> Célula eletroquímica convencional e os eletrodos utilizados.....   | 20 |
| <b>FIGURA 9.</b> Imagem do sistema BIA, utilizado no trabalho com a pipeta eletrônica. ER = eletrodo de trabalho, CE = contra-eletrodo e ER = eletrodo de referência. ....  | 21 |
| <b>FIGURA 10.</b> (I) Representação esquemática e (II) foto ilustrativa do sensor eletroquímico utilizado nas análises por CLAE-EC. ....  | 22 |
| <b>FIGURA 11.</b> Imagem do sistema FIA e o sistema de injeção utilizado no trabalho. Eletrodo de referência (ER), contra-eletrodo (CE), eletrodo de trabalho (ET) e eletrólito suporte (ES).....   | 22 |
| <b>FIGURA 12.</b> Voltamograma cíclico da caracterização do eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente em eletrólito de tampão fosfato 0,01 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ . ....   | 27 |
| <b>FIGURA 13.</b> Voltamogramas cíclicos da EP 0,5 mmol L <sup>-1</sup> com variação de pH (2 a 8) em tampão fosfato 0,01 mol L <sup>-1</sup> . $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .....   | 28 |
| <b>FIGURA14.</b> A) Voltametria cíclica de EP (1,3 x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> ) em 1 mol L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . B) Voltametria cíclica da EP (1,7 x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> ) em pH 3. $v = 2,0 \text{ V/min.}$ ..                | 29 |
| <b>FIGURA 15.</b> Mecanismo eletroquímico da oxidação da Epinefrina proposto por Hawley et al. (1966). ....   | 31 |
| <b>FIGURA16.</b> Relação I <sub>pa</sub> x pH e E <sub>pa</sub> x pH obtidos da VC da EP (0,5 mmol L <sup>-1</sup> ), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .....   | 32 |

- FIGURA 17.** Influência da velocidade de injeção de 50  $\mu\text{L}$  de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na resposta de corrente obtida com o sistema BIA com detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Potencial aplicado de 0,50 V x Ag(s)/AgCl(s) (KCl sat.). Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidades de injeção:  $10 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $40 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $120 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $210 \mu\text{L s}^{-1}$ ..... 33
- FIGURA 18.** Influência do volume de solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) injetado na resposta de corrente obtida com o sistema BIA com detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0). Potencial aplicado de 0,50 V x Ag/AgCl ( $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ). Volumes de injeção:  $50 \mu\text{L}$ ,  $60 \mu\text{L}$ ,  $70 \mu\text{L}$ ,  $80 \mu\text{L}$ ,  $90 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{L}$ ,  $110 \mu\text{L}$ ,  $120 \mu\text{L}$  e  $130 \mu\text{L}$ . Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$  ..... 34
- FIGURA 19.** Voltamograma hidrodinâmico obtido para o sistema BIA a partir da injeção de  $100 \mu\text{L}$  de solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ . ..... 35
- FIGURA 20.** Cronoamperograma obtido para a detecção eletroquímica referente à obtenção do LD ( $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na determinação eletroquímica da EP no sistema BIA por detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ . E =  $+0,85 \text{ V x Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.).Volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ .. 37
- FIGURA 21.** Respostas amperométricas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA de soluções de EP de concentrações de a)  $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , b)  $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , c)  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , d)  $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  e)  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ , Volume da injeção de  $100 \mu\text{L}$  e potencial aplicado de  $0,85 \text{ V x Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.). ..... 38
- FIGURA 22.** Curvas analíticas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA com detecção amperométrica de soluções de EP nas concentrações de a)  $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , b)  $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , c)  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , d)  $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  e)  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{s}^{-1}$ , Volume de injeção de  $100 \mu\text{L}$  e potencial aplicado de  $0,85 \text{ V x Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.<sup>1</sup>). Curvas em preto e vermelho referem-se as sequências crescente e decrescente de injeções, respectivamente. .... 38
- FIGURA 23.** Avaliação de repetibilidade ( $n = 10$ ) na resposta obtida com o sistema BIA com detecção amperométrica para a determinação de EP ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ . E =  $+0,85 \text{ V x Ag/AgCl}$  (KCl sat.). Volume de injeção de  $100 \mu\text{L}$ . ..... 39
- FIGURA 24.** Influência da vazão (velocidade de injeção) de  $50 \mu\text{L}$  de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na resposta de corrente obtida com o sistema FIA com detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Potencial aplicado de 0,50 V x Ag/AgCl (KCl sat.). Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0). Velocidades de injeção:  $40 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ ;  $60 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $70 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $80 \mu\text{L s}^{-1}$ . .... 42
- FIGURA 25.** Influência do volume de solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) injetado na resposta de corrente obtida com o sistema FIA com detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Potencial aplicado de 0,50 V x Ag(s)/AgCl(s) (KCl sat.). Volumes de injeção:  $50 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{L}$ ,  $150 \mu\text{L}$ ,  $200 \mu\text{L}$  e  $250 \mu\text{L}$ . Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ . ..... 44

- FIGURA 26.** Voltamograma hidrodinâmico obtido para o sistema FIA a partir da injeção de 200  $\mu\text{L}$  de solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ . ..... 45
- FIGURA 27.** Cronoamperograma obtido na detecção eletroquímica de EP referente à obtenção do LD ( $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) no sistema FIA por detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ .  $E = + 0,85 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$  (KCl sat.). Volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ . ..... 46
- FIGURA 28.** Respostas amperométricas obtidas sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente após injeções em triplicata no sistema FIA de soluções de EP de concentrações de a)  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , b)  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , c)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , d)  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  e)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ , Volume de injeção de 200  $\mu\text{L}$  e Potencial aplicado de  $0,85 \text{ V} \times \text{Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.). ..... 47
- FIGURA 29.** Curvas analíticas obtidas após injeções em triplicata no sistema FIA com detecção amperométrica de soluções de EP nas concentrações de a)  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , b)  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , c)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , d)  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  e)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ , Volume da injeção de 200  $\mu\text{L}$  e Potencial aplicado de  $0,85 \text{ V} \times \text{Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.). Curvas em preto e vermelho referem-se às sequências crescente e decrescente de injeções, respectivamente. .... 48
- FIGURA 30.** Avaliação de repetibilidade ( $n = 10$ ) na resposta obtida com o sistema FIA com detecção amperométrica de EP ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ .  $E = +0,85 \text{ V} \times \text{Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.), Volume de injeção de 200  $\mu\text{L}$ . ..... 49

**LISTA DETABELAS**

|  |    |
|--|----|
| <b>TABELA 1.</b> Propriedades físico-químicas da Epinefrina.....   | 3  |
| <b>TABELA 2.</b> Lista de reagentes usados e sua respectiva procedência .....  | 17 |
| <b>TABELA 3.</b> Melhores condições avaliadas para o sistema BIA com detecção amperométrica de EP.....   | 36 |
| <b>TABELA 4.</b> Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia obtidas na determinação eletroquímica de EP em três níveis de concentração para o sistema BIA com detecção amperométrica. Eletrólito suporte tampão fosfato (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7), volume de injeção de 100 µL, velocidade injeção de 70 µLs <sup>-1</sup> . E = 0,85VxAg/AgCl (KCl sat.).....    | 40 |
| <b>TABELA 5.</b> Resultado obtido do teste de adição e recuperação em amostra farmacêutica comercial. ....   | 41 |
| <b>TABELA 6.</b> Parâmetros avaliados com o sistema FIA com detecção amperométrica de EP.....  | 46 |
| <b>TABELA 7.</b> Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia obtidos na determinação eletroquímica de EP em três níveis de concentração para o sistema FIA com detecção amperométrica. Eletrólito suporte tampão fosfato (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7), volume de injeção de 200 µL, velocidade de injeção de 50 µLs <sup>-1</sup> . E = 0,85VxAg/AgCl (KCl sat.)..... | 50 |
| <b>TABELA 8.</b> Resultado obtido do teste de adição e recuperação em amostra farmacêutica comercial. ....   | 50 |
| <b>TABELA 9.</b> Comparação das respostas analíticas dos métodos BIA e FIA com detecção amperométrica para EP.....   | 51 |
| <b>TABELA 10.</b> Dados relatados na literatura referentes à determinação de EP em amostras farmacêuticas usando técnicas eletroquímicas. ....   | 53 |

## LISTA DE ABREVEATURAS

- AMP** - Amperometria
- Anvisa** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BIA** - Batch Injection Analysis (Análise por Injeção em Batelada)
- CE** - Contra - Eletrodo
- CQ** - Controle de Qualidade
- CV** - Coeficiente de variação
- CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DPR** - Desvio Padrão Relativo
- E**- Potencial
- EP**- Epinefrina
- Ep<sub>a</sub>**- potencial de pico anódico
- ER** - Eletrodo de Referência
- ES** - Eletrólito Suporte
- ET** - Eletrodo de Trabalho
- DDB** - Diamante Dopado com Boro
- FIA** - Flow Injection Analysis (Análise por Injeção em Fluxo)
- Ip<sub>a</sub>** - Corrente de pico anódico
- LD** - Limite de Detecção
- LQ** - Limite de Quantificação
- pH**- Potencial hidrogeniônico
- R%** - Recuperação percentual
- RDO** - Reação de Desprendimento de Oxigênio
- SNC** - Sistema Nervoso Central
- TF** - Tampão fosfato
- UV** - Ultravioleta
- VC** - Voltametria Cíclica

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1 ASPECTOS GERAIS .....   | 1         |
| 1.2 EPINEFRINA.....   | 2         |
| 1.3 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS.....   | 5         |
| 1.3.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA .....   | 5         |
| 1.3.2 AMPEROMETRIA .....  | 6         |
| 1.4 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) .....                               | 8         |
| 1.5 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA) .....                                  | 10        |
| 1.6 ELETRODO DIAMANTE DOPADO COM BORO E DETECÇÃO<br>ELETROQUÍMICA DE EP ..... | 11        |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | <b>16</b> |
| <b>3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....                                      | <b>17</b> |
| 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES .....  | 17        |
| 3.2 EQUIPAMENTOS .....  | 18        |
| 3.3 CÉLULA ELETROQUÍMICA CONVENCIONAL .....                                   | 18        |
| 3.4 CÉLULA ELETROQUÍMICA - BIA.....   | 20        |
| 3.5 CÉLULA ELETROQUÍMICA – FIA .....  | 21        |
| 3.6 METODOLOGIA.....  | 23        |
| 3.6.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA EP .....                                | 23        |
| 3.6.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA DETECÇÃO NO SISTEMA BIA<br>.....          | 23        |
| 3.6.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA DETECÇÃO NO SISTEMA FIA<br>.....          | 24        |
| 3.6.4 VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO .....  | 24        |
| 3.6.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....                                     | 25        |
| 3.6.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO.....  | 26        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | <b>27</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.1 PERFIL E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA EP .....                                  | 27        |
| 4.2 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE EP EM SISTEMA BIA COM<br>DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA..... | 33        |
| 4.2.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIA .....  | 36        |
| 4.2.1.1 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....                                      | 36        |
| 4.2.1.2 LINEARIDADE .....  | 37        |
| 4.2.1.3 REPETIBILIDADE DO MÉTODO .....   | 39        |
| 4.2.1.4 EXATIDÃO E PRECISÃO .....  | 40        |
| 4.2.1.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO .....  | 41        |
| 4.3 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE EP EM SISTEMA FIA COM<br>DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA..... | 42        |
| 4.3.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....   | 46        |
| 4.3.1.1 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....                                      | 46        |
| 4.3.1.2 LINEARIDADE .....  | 47        |
| 4.3.1.3 REPETIBILIDADE .....   | 48        |
| 4.3.1.4 EXATIDÃO E PRECISÃO .....  | 49        |
| 4.3.1.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO .....  | 50        |
| 4.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS BIA E FIA .....  | 51        |
| <b>5 CONCLUSÃO .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>6 REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>55</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS

A epinefrina (EP), ou adrenalina, é um neurotransmissor do grupo das catecolaminas que é liberada pelo sistema nervoso simpático e pela medula supra-renal como sinal de respostas fisiológicas imediatas, como frio, medo, fadiga, choque, perigo, por isso chamada de mecanismo de luta ou fuga (HARPER, 1982).

A EP desempenha um papel muito importante no funcionamento do sistema nervoso central (SNC), renal, hormonal e sistema cardiovascular, atuando como reguladora da pressão arterial, da frequência cardíaca, do metabolismo do glicogênio, bem como bronco dilatador para a asma. A EP também é utilizada em diversos tipos de tratamentos hospitalares como ataques de coração, asma, glaucoma além de ser utilizada no tratamento de emergência para reações alérgicas leves ou severas, como choque anafilático (MICHAEL; WIGHTMAN, 1999).

Quanto às indicações clínicas, os usos mais comuns visam aliviar o distúrbio respiratório causado por broncoespasmo, proporcionar alívio rápido das reações de hipersensibilidade a fármacos e outros alérgenos e prolongar a ação de anestésicos locais (SILVA, 2002). Tornando assim, a análise qualitativa e quantitativa fundamental para o controle de qualidade desse medicamento.

Ressaltando que todo produto farmacêutico deve atender às especificações de qualidade, cabe ao setor de controle de qualidade (CQ) da indústria farmacêutica avaliar e liberar os medicamentos, de maneira confiável, utilizando método de análise eficaz no menor tempo possível. Dentre os métodos oficiais propostos nas farmacopéias para o CQ dos fármacos, na sua maioria, destacam-se as técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Entretanto, cabe ressaltar que, apesar de muito eficientes, estas técnicas demandam equipamentos de alto custo, mão de obra especializada e grande volume de reagentes. (LOPES-JUNIOR, 2012).

Neste contexto, a busca por métodos mais rápidos, seletivos, sensíveis e de baixo custo para as análises de CQ torna-se essencial e necessária. Assim, o interesse na química redox da EP está associada ao desenvolvimento de um

método eletroanalítico que seja eficaz para determinação e quantificação da epinefrina em medicamentos, visando a importância no CQ.

As técnicas eletroanalíticas são baseadas nas propriedades elétricas mensuráveis (corrente, potencial, carga, condutividade ou resistência) de um analito em solução quando este é submetido a uma diferença de potencial entre eletrodos em uma célula eletroquímica, com a finalidade de se obter informações fundamentais sobre propriedades do analito (BRONDANI, 2010).

Sendo a EP uma substância eletroativa, métodos eletroanalíticos podem ser bastante promissores para aplicação do CQ de medicamentos que contenham EP. Uma das técnicas que vem se destacando nos últimos anos na determinação de fármacos é a análise por injeção por batelada, ou BIA (do inglês *Batch Injection Analysis*). O curto tempo de contato entre o analito e o eletrodo de trabalho durante as análises no sistema BIA possui como vantagem a baixa contaminação da superfície do eletrodo (QUINTINO, 2003; STEFANO, 2016).

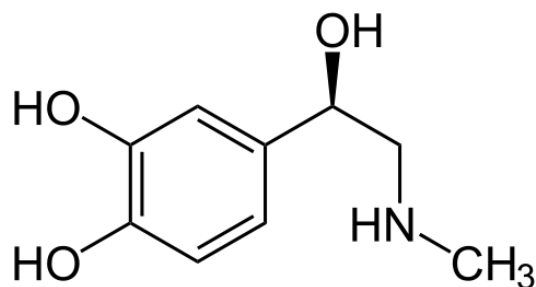
O sistema FIA apresenta dentre suas características atrativas a alta velocidade de análise, sensibilidade elevada, baixo limite de detecção e boa reprodutibilidade, sendo muito utilizado em pesquisa e indústria. Outra vantagem do sistema FIA está relacionada ao consumo mínimo de amostra e de reagentes, levando a geração de menor quantidade de resíduos químicos (QUITINO e ANGNES, 2004).

O eletrodo de trabalho para a detecção do analito torna-se, juntamente como o método de análise, o ponto chave para o sucesso da determinação eletroanalítica. Em outras palavras, o material de eletrodo deve apresentar características tais como alta estabilidade, sensibilidade e seletividade suficiente para a quantificação do composto na amostra. Nesse sentido, o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD, da sigla em inglês Boron-Doped Diamond) atende as características citadas para a aplicação em medicamentos (KUZMANOVIC et al., 2015).

## 1.2 EPINEFRINA

A EP ou 1-(3,4-dihidroxiifenil)-2-metilaminoetanol(FIGURA1) desempenha um papel importante no sistema nervoso e ajuda a manter a

atividade física normal do corpo, incluindo frequência cardíaca, pressão arterial e atuação no sistema nervoso simpático (GILMAN, 2006).



**FIGURA 1.** Estrutura da molécula de Epinefrina.

Além disso, a adrenalina prolonga o efeito de anestésicos locais por meio da diminuição do fluxo sanguíneo local. No coração, pode restaurar os batimentos cardíacos no caso de uma parada cardíaca (GOODMAN; GILMAN, 2006). As propriedades físico-químicas deste composto são apresentadas na TABELA 1.

**TABELA 1.** Propriedades físico-químicas da Epinefrina

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>Fórmula molecular</b> | C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> |
| <b>Massa molecular</b>   | 183,20 g mol <sup>-1</sup>                     |
| <b>pKa</b>               | 8,88   |

No Brasil, a EP é encontrada comercialmente em ampolas sendo também utilizada na manipulação de pomadas ou géis específicos, e sua aquisição somente pode ser realizada com prescrição médica. A EP injetável é geralmente encontrada em concentrações de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> e sua aplicação pode ser via endovenosa/intravenosa, intramuscular ou subcutânea.

Quando administrada rapidamente em doses farmacológicas por via intravenosa, a EP provoca um efeito característico sobre a pressão arterial, a qual sofre rápida elevação até atingir o pico proporcional a dose, além dos efeitos vasculares sobre as arteríolas menores e respiratórias, tendo poderosa ação broncodilatadora e metabólica. (SACIOTO, 2014).

A solução injetável de EP pode sofrer degradação química via processo de oxirredução, evidenciada pela cor vermelha acastanhada. Para que esta

degradação não ocorra é utilizado como antioxidante o bissulfito como excipiente (YOSHIDA; STELLA, 2002).

No Brasil, os ensaios de controle de qualidade de fármacos são realizados com base nas referências oficiais da Farmacopéia Brasileira, 6ª edição de acordo com a resolução do colegiado RDC - no 298 (BRASIL- 2017). Uma vez que esta não possui normas e especificações para o controle de qualidade da EP, o procedimento adotado neste trabalho foi fundamentado na metodologia fornecida pela Farmacopeia Americana (USP - 2006). A USP estabelece que para a determinação de EP em soluções injetáveis seja realizado o ensaio utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE/UV). Esta técnica apresenta como vantagens robustez, seletividade e reprodutibilidade, as quais são indispensáveis no âmbito regulamentador. Entretanto, apesar de muito eficientes, as análises por CLAE são dispendiosas, principalmente devido ao alto custo na obtenção e manutenção de equipamentos, grande geração de resíduos pelo uso dos solventes orgânicos na fase móvel, baixa frequência analítica e complexidade de operação. Assim, torne-se fundamental a busca por métodos analíticos mais simples, rápidos e que gerem menos resíduos.

Neste contexto, os métodos eletroquímicos apresentam-se como uma alternativa bastante atrativa, especialmente considerando-se a rapidez e sensibilidade da técnica, a depender do material de eletrodo. Na literatura, existem poucos trabalhos relacionados à determinação de EP por métodos eletroquímicos (LEITE et al., 2003; FELIX et al., 2006, WANG et al., 2006; ASLANOGLU et al., 2008; BRONDANI et al., 2009; THIAGARAJAN et al., 2009, ZARE& NASIRIZADEH, 2010; BABAEI, *et al.*, 2011; SOCHR et al., 2013; PARANHOS, 2014; ZHANG *et al.* 2016). O baixo número de trabalhos relativos a esse tipo de estudo abre uma margem de exploração científica significativa para o desenvolvimento de novas técnicas para a determinação eletroquímica de EP. Estes trabalhos encontram-se devidamente descritos em seção posterior desta dissertação.

As principais técnicas eletroquímicas utilizadas na caracterização e na determinação de EP neste trabalho foram voltametria cíclica e amperometria. Nesse sentido, alguns fundamentos destas técnicas encontram-se descritas a seguir.

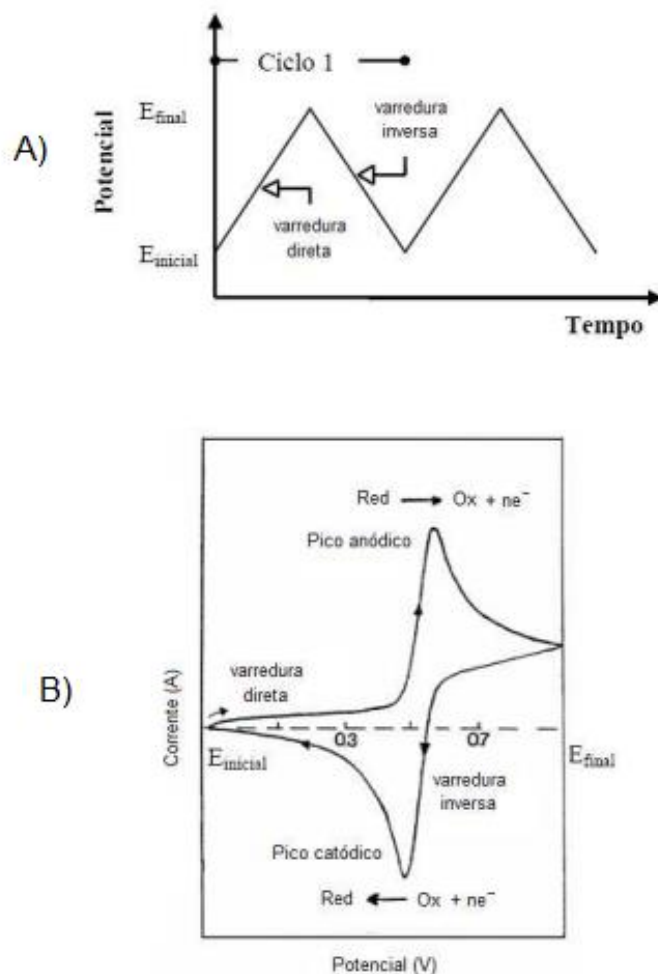
## 1.3 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

### 1.3.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica (VC) é um dos métodos voltamétricos mais empregados para a obtenção de informações sobre o comportamento eletroquímico do analito a partir das respostas de corrente resultantes de processos de oxidação ou redução que ocorrem na superfície de um eletrodo de trabalho durante a varredura do potencial. O potencial é aplicado entre os eletrodos de referência e trabalho em forma de varredura, correspondente a uma onda triangular (FIGURA 2A). Assim, a varredura de potencial é feita em uma direção e em seguida, na direção inversa enquanto a corrente é medida, constituindo um ciclo, em velocidade de varredura constante, sendo, então, registrado na forma de um gráfico de corrente registrada em função do potencial aplicado, denominado como voltamograma (FIGURA 2B). Quando se utiliza esta técnica, pode-se empregar um ciclo parcial, um ciclo inteiro ou até mesmo vários ciclos (SKOOG *et al.*, 2006; HARRIS, 2012).

Quando o potencial é varrido no sentido direto e ocorrendo a oxidação da espécie eletroativa, um pico de corrente é gerado. Este pico de corrente é chamado de corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ). Quando o processo ocorre no sentido inverso ocorrendo a redução da espécie eletroativa, um pico de corrente é gerado, sendo denominado de pico de corrente catódica ( $I_{pc}$ ).

Assim, a partir da leitura do voltamograma, informações essenciais para o desenvolvimento da metodologia eletroquímica são apresentadas, como: respostas anódicas e/ou catódicas, faixa de potencial onde os processos ocorrem, intensidade da corrente gerada além do distanciamento dos potenciais de picos dos sistemas redox, caso se façam presentes. (BRONDANI, 2010).



**FIGURA 2.** Esquema de varredura de uma janela de potencial na VC (A) sistema reversível (B) Voltamograma de uma reação reversível de um ciclo de varredura. Fonte: SOUZA, 2011

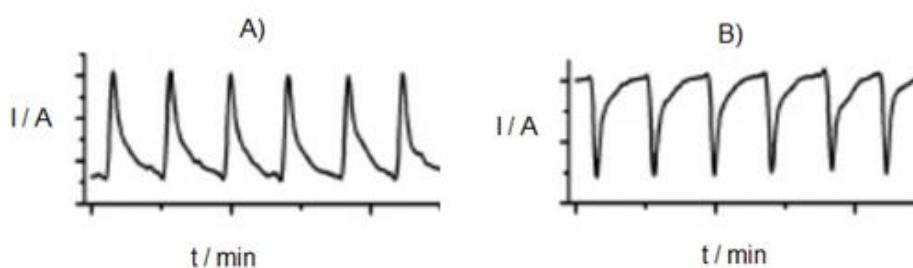
### 1.3.2 AMPEROMETRIA

A amperometria é uma técnica eletroanalítica que envolve a aplicação de um potencial constante para oxidação ou redução de uma espécie a um eletrodo de trabalho e a medição subsequente da corrente registrada em estado estacionário. Normalmente, a magnitude da corrente medida depende da concentração da substância oxidada ou reduzida e, portanto, este método pode ser usado para várias aplicações analíticas (ADELOJU, 2005)

Este método oferece a capacidade de distinguir seletivamente uma série de espécies eletroativas em solução por meio da seleção criteriosa do potencial

aplicado e/ou escolha do material do eletrodo. Nos casos em que um potencial não específico é aplicado, a corrente resultante do processo pode ser devido à contribuição de várias espécies eletroativas. Nesse sentido, a escolha cuidadosa do potencial de aplicação bem como da composição do eletrólito de suporte também pode ser útil para melhorar a seletividade dos métodos amperométricos. Nos casos em que o oxigênio interfere na medição, sua remoção por purga da solução com um gás inerte, como nitrogênio ou argônio, pode ser necessária.

Vários métodos analíticos empregam medições amperométricas como parte de seus procedimentos. Uma resposta amperométrica (oxidação ou redução) típica de um sensor eletroquímico sob condição de sucessivas injeções de analito é mostrada na FIGURA 3.



**FIGURA 3:** Cronoamperograma para o processo de A) oxidação e B) redução.  
Fonte: Autora

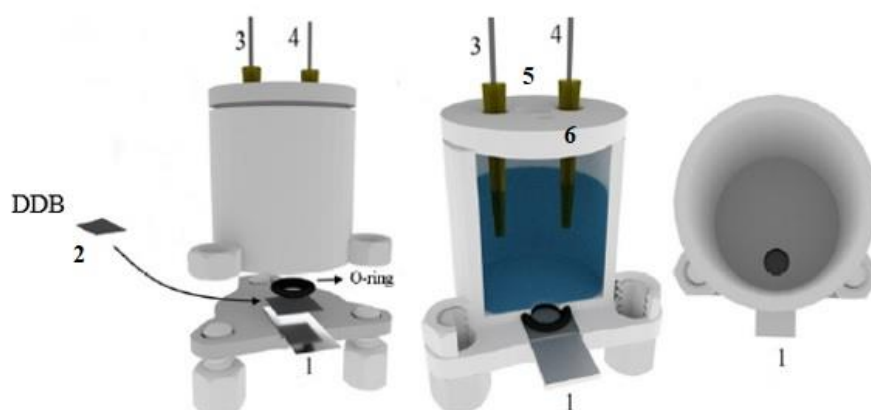
Observa-se nos cronoamperogramas da FIGURA 3 que, a cada injeção, há um aumento rápido na corrente registrada com o tempo para os processos de oxidação (FIGURA 3A) ou redução (FIGURA 3B) de cada injeção, a qual que atinge um valor máximo (oxidação) ou mínimo (redução) e decai rapidamente. Dessa forma, o sinal amperométrico é observado na forma de um pico. Em soluções onde o transporte de massa da espécie eletroativa em direção à superfície do eletrodo é devido apenas ao processo de difusão (e neste caso, em condições de fluxo constante) um aumento linear no módulo de corrente registrada com a concentração da espécie deve ser observado.

Quando correlacionada a métodos de alta velocidade, tais como análise por injeção de fluxo (FIA) e análise por injeção em batelada (BIA), esta técnica é muito utilizada por apresentar respostas rápidas, boa reprodutibilidade,

sensibilidade, simplicidade de execução e tempo reduzido de análise (BACKES et al., 2017)

#### 1.4 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA)

A técnica BIA surgiu no início da década de 1990 como um sistema portátil para realização de análises com detecção eletroquímica, utilizando-se de pequenas alíquotas ( $\mu\text{L}$ ) de analito que são injetadas com o auxílio de uma micropipeta (mais comumente eletrônica) diretamente na superfície do eletrodo de trabalho imerso em um volume de solução inerte (WANG; TAHA, 1991). O sistema possui configuração “*wall-jet*” (quando a ponteira da micropipeta e o eletrodo de trabalho ficam em lados opostos na célula) e, assim, todas as injeções são feitas com a mesma distância entre a ponteira e a superfície do eletrodo (QUINTINO & ANGNES 2004). Na FIGURA 4 encontra-se esquematizado a montagem do sistema BIA, utilizado nesta pesquisa.

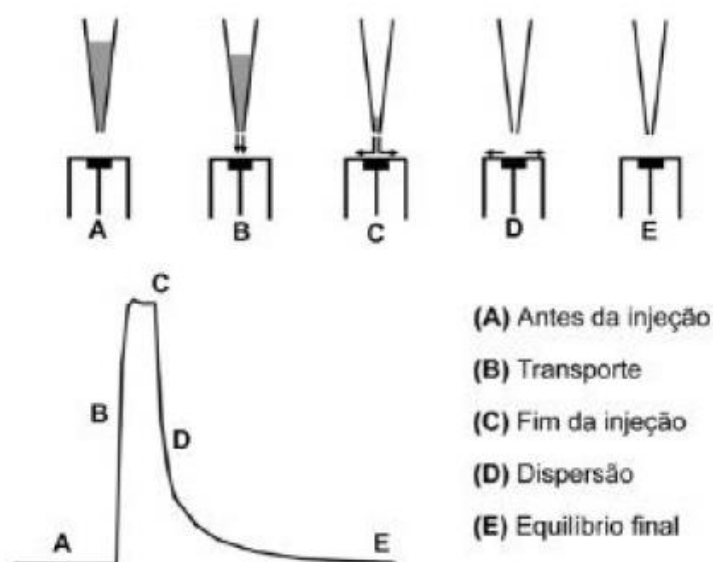


**FIGURA 4.** Apresentação do esquema de montagem da célula BIA. (1) placa metálica, (2) Eletrodo de trabalho, (3) Eletrodo de referência, (4) Contra-eletrodo, (5) Entrada para micropipeta eletrônica e (6) Entrada para agitação da solução. Fonte: Adaptado de SILVA, 2019.

Na parte inferior (base da célula) há um orifício situado mais ao centro da célula onde é colocado o eletrodo de trabalho (2). A área do eletrodo é determinada por um anel de vedação chamado *o-ring*, e o contato elétrico é feito com uma placa metálica (1). A tampa superior da célula possui orifícios para

fixação dos eletrodos de referência (3) e contra-eletrodo (4). Um terceiro orifício é utilizado para fixação da micropipeta eletrônica (5) a qual estará no sentido oposto ao do eletrodo de trabalho. Um quarto orifício (6), localizado na tampa superior, permite o controle do mecanismo de agitação, quando necessário, no sentido de dispersar a solução analisada da superfície do eletrodo para o eletrólito de suporte. A célula feita de polietileno comporta, geralmente, volumes acima de 100 mL, os quais são suficientes para que medições eletroquímicas sejam realizadas.

A difusão do analito em direção à superfície do eletrodo resulta em picos de oxidação ou redução. Na FIGURA 5 é apresentado o processo de oxidação da espécie analisada.



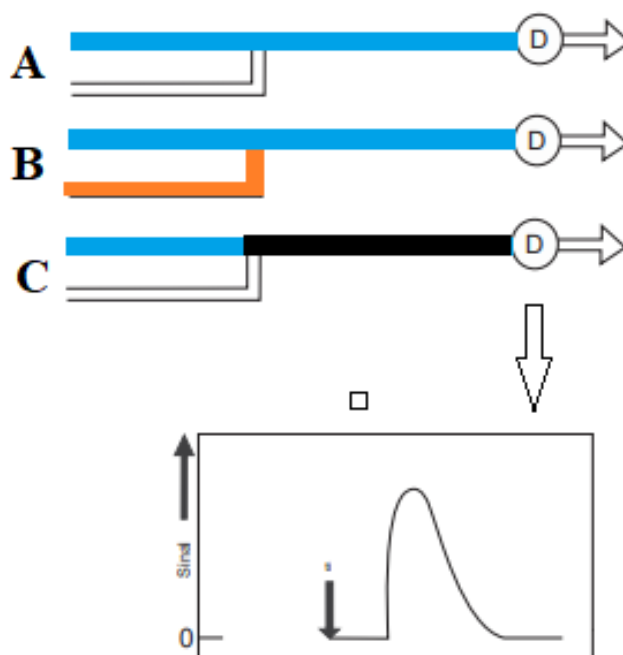
**FIGURA 5.** Etapas de operação do processo BIA e amperograma obtido.  
 Fonte: QUINTINO & ANGNES, 2004.

Na etapa A do cronoamperograma mostrado na FIGURA 5, a corrente constante registrada deve-se ao processo de oxidação do eletrólito suporte. Após a injeção (B), tem-se o aumento rápido da corrente com a formação de um pico proveniente do processo de oxidação do analito de interesse, o qual é transportado até a superfície do eletrodo de trabalho por convecção. A corrente registrada atinge um valor máximo (C) até o fim da injeção. No final da injeção, há uma queda rápida até a linha de base (D). Neste momento, o analito passa a ser diluído pelo eletrólito suporte, voltando a atingir o equilíbrio existente antes

da injeção (E). A magnitude do sinal de corrente registrada é proporcional as concentrações injetadas. (QUINTINO & ANGNES, 2004).

### 1.5 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

A análise por injeção em fluxo (do inglês *flow injection analysis*, FIA) consiste em uma injeção rápida da amostra em um fluxo contínuo de uma solução de transporte, que tem a função de fazer a amostra chegar ao detector por meio de uma bomba peristáltica ou qualquer outro propulsor. O canal com a solução de transporte é bombeada continuamente até o detector, tal como identificado na FIGURA 6A.



**FIGURA 6.** Esquema representativo do sistema FIA. Em (A) canal onde pasa o eletrólito - suporte, em (B) carregamento da alça de amostragem e em (C) dispersão da amostra no eletrólito suporte. Fonte: adaptado de SILVA-JÚNIOR (2011).

No ponto (A) tem-se a passagem do eletrólito suporte continuamente até o sensor. O canal em que a amostra se encontra é chamado de alça de amostragem e, primeiramente é carregada em B sendo, em seguida, injetada no canal com solução transporte. No ponto (C), a amostra sofre dispersão ao se misturar a solução transporte e é levada até ao sensor e, posteriormente,

descartada. Em sendo o detector um sensor eletroquímico, ao passar por ele, as espécies eletroativas presentes na amostra podem sofrer processo de oxidação ou redução e serem detectadas por meio de técnicas eletroquímicas presentes em um potenciostato.

As condições de dispersão da amostra (vazão e volume) podem ser variadas para que se obtenha o melhor sinal analítico possível. Comumente, os sistemas por FIA são constituídos por um propulsor da solução, geralmente bombas peristálticas livres de pulsos, sistemas de introdução e mistura da amostra, detecção e armazenamento de dados (SILVA-JÚNIOR 2011).

A vantagem de se utilizar a técnica FIA incluem, fundamentalmente, simplicidade e versatilidade que permite a adição de etapas no percurso antes da detecção do analito, como tratamento de amostras, processo de separação, reações ou aquecimento (QUINTINO, ANGNES 2004). O uso de técnicas automatizadas possibilita a realização de um maior número de determinações diárias, além de vantagens econômicas devido ao baixo custo (SKOOG *et al.*, 2010).

## **1.6 ELETRODO DIAMANTE DOPADO COM BORO E DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE EP**

A detecção eletroquímica possui características bastante atraentes, tais como alta sensibilidade, simplicidade, instrumentação relativamente de baixo custo, e grande margem de aplicação. Para tanto, é indispensável que a escolha de materiais eletródicos possa ser pautada em características como alta resistência química em diversos pHs, baixa corrente de fundo e extensa janela eletroquímica, principalmente em meio aquoso.

Dentre os eletrodos que vêm recebendo destaque nos últimos anos nas áreas de eletroquímica e eletroanalítica está o eletrodo de filme de diamante dopado com boro (DDB). O diamante (hibridização  $sp^3$ ) é um isolante elétrico que pode se tornar eletricamente ativo quando dopado com um átomo aceptor de elétrons em sua estrutura, como o boro, que possui um elétron a menos, tornando-o um semicondutor do tipo p.

As principais propriedades do DDB incluem: (a) baixa adsorção de substâncias devido a hibridização  $sp^3$  do carbono; (b) maior intervalo de potencial

com baixa corrente residual; (c) baixa e estável corrente de fundo; (d) menor risco de envenenamento; (e) elevada janela de potencial em meio aquoso (até 4 V) e (f) alta condutividade (BARROS, et al., 2005; CALIXTO, SANTOS, CAVALHEIRO, 2014; KONDO, HORITANI, YUASA, 2012; PARANHOS, 2014).

O comportamento eletroquímico do eletrodo de DDB é determinado por suas propriedades físicas, químicas e eletrônicas, e estas, por sua vez, são profundamente influenciadas pela quantidade e tipo de dopante, fatores morfológicos e defeitos no filme, presença de impurezas, orientação cristalográfica e terminação da superfície do eletrodo (SALAZAR-BANDA, 2006).

As suas propriedades elétricas são fortemente afetadas pelas terminações da superfície do eletrodo (hidrogênio ou oxigênio) o qual pode ser controlada por tratamento eletroquímico utilizando ácido sulfúrico. Assim, a superfície pode ser modificada por (SUFFREDINI, 2004):

**Ativação anódica:** onde ocorre a oxidação da água pela aplicação de um potencial positivo ou corrente positiva, gerando gás oxigênio, produzindo terminações de oxigênio na superfície do eletrodo.

**Ativação catódica:** onde há redução da água pela aplicação de um potencial negativo ou corrente negativa, gerando gás hidrogênio, produzindo terminações de hidrogênio na superfície do eletrodo.

A determinação da ativação a ser realizada deve ser feita avaliando-se o melhor desempenho, reversibilidade, detectabilidade e estabilidade para o analito em estudo.

Poucos trabalhos foram encontrados relatando a utilização do eletrodo DDB na determinação de EP em fármacos ou outras matrizes. Dentre eles está o trabalho de SOCHR et al (2014) que determinou EP em urina humana enriquecida com recuperações satisfatórias (98% a 102%) utilizando eletrodo DDB em voltametria de onda quadrada obtendo faixa linear de  $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,998$ ) e limite de detecção de  $0,21 \mu\text{mol. L}^{-1}$  que foram alcançados sem qualquer modificação química e pré-tratamento do eletrodo de trabalho.

PARANHOS (2014) utilizou eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente em ácido sulfúrico para determinar e quantificar EP utilizando VPD, obtendo-se limites de detecção e quantificação de  $5,04 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $16,79 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, com boa linearidade no intervalo de concentração investigado ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

A determinação simultânea de onze bioaminas, dentre elas a EP, foi realizada por ZHANG et al. (2016) pelo uso do eletrodo de DDB em um potencial otimizado de 700 mV, com uma faixa linear de  $0,010 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $0,400 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9984$ ), limite de detecção de  $2 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$  e limite de quantificação de  $8 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Apesar do baixo número de trabalhos relatando a utilização do eletrodo DDB na determinação eletroquímica de EP, vários trabalhos vêm demonstrando as aplicações do eletrodo de DDB em várias classes de medicamentos (PEREIRA et al., 2013, GIMENES et al., 2013; PEREIRA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; SILVA et al., 2016; COSTA et al., 2016), o que evidencia sua eficiência frente a aplicações eletroanalíticas.

A determinação eletroquímica de EP também foi investigada sobre outros eletrodos, tais como biossensores de eletrodo de pasta de carbono modificado (LEITE et al., 2003; BRONDANI, 2010), biossensor de tecido vegetal (FELIX et al., 2006), carbono vítreo modificado (ASLANOGLU, *et al.*, 2008; ZARE& NASIRIZADEH et al., 2010; BABAEI *et al.*, 2011), eletrodo modificado com nanopartículas de paládio (THIAGARAJAN et al., 2009) e eletrodo modificado com nanopartículas de ouro (WANG *et al.* 2006).

De acordo com LEITE, et al. 2003 o desenvolvimento de um eletrodo bienzimático obteve sucesso para mostrar o efeito sinérgico de duas enzimas (lacase e peroxidase) na determinação de catecolaminas utilizando VPD. Os limites de detecção observados foram 0,027, 0,025, 0,024, 0,026  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , para dopamina, adrenalina, l-dopa e isoprenalina, respectivamente.

BRONDANI (2010), determinaram EP em formulações farmacêuticas por voltametria de onda quadrada, utilizando biossensor. A curva analítica foi linear para concentrações de adrenalina de 0,99 a 213  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9998$ ) com um limite de detecção de 0,293  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O biossensor demonstrou estabilidade adequada e boa repetibilidade e reprodutibilidade, com um desvio padrão relativo de 3,7% e 4,8%, respectivamente.

FELIX *et al* (2006) desenvolveram um biossensor de tecido vegetal utilizando as enzimas polifenol oxidase, presentes nas fibras dos frutos de uma palmeira (*Livistonachinensis*), associado à análise de injeção em fluxo para determinar a epinefrina em amostras farmacêuticas. O biossensor forneceu uma resposta linear para a epinefrina na faixa de concentração de 50 a 350  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

<sup>1</sup>. O limite de detecção estimado para este intervalo foi de  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o coeficiente de correlação de 0,998, trabalhando sob uma vazão de  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$  e utilizando um loop de amostra de  $100 \mu\text{L}$ . A repetibilidade foi de 3,1% para 10 determinações consecutivas.

ASLANOGLU, et al (2008) utilizaram eletrodo de carbono vítreo modificado com poli (1-metilpirrol) para a quantificação da adrenalina que exibiu respostas de corrente estáveis e sensíveis a ela. A resposta de corrente linear foi obtida na faixa de  $0,75$  a  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  com um limite de detecção de  $0,17 \mu\text{mol L}^{-1}$  para adrenalina por voltametria de onda quadrada. O eletrodo modificado foi eficaz para determinar simultaneamente adrenalina, ácido ascórbico e ácido úrico em uma mistura, sendo possível identificar os picos anódicos sobrepostos das três espécies em três picos voltamétricos bem definidos na voltametria cíclica.

THIAGARAJAN, et al. (2009) utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme híbrido de platina-ouro (Pt-Au) nanoestruturado detectaram os neurotransmissores; epinefrina, norepinefrina individualmente e na presença de ácido ascórbico em soluções tamponadas com fosfato pH 7,0. As análises foram realizadas por VPD e obtido LD de  $57 \mu\text{mol L}^{-1}$  e faixa de trabalho de  $63$  a  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

ZARE & NASIRIZADEH (2010) relataram que o eletrodo de carbono vítreo modificado por hematoxilina apresentou excelente atividade eletrocatalítica para a oxidação da EP. O limite de detecção de  $0,024 \mu\text{mol L}^{-1}$  e duas faixas de calibração linear de  $0,2$  a  $78,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $78,3$  a  $319,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram obtidos utilizando VPD. O eletrodo modificado se mostrou eficaz não apenas na detecção de ácido ascórbico, EP e ácido úrico, mas também na determinação simultânea de cada componente em uma mistura.

BABAEI et al. (2011) demonstrou que a determinação simultânea de epinefrina e paracetamol pode ser realizada em nanotubo de carbono de parede simples / quitosana / eletrodo de carbono vítreo modificado por líquido iônico. Os experimentos VPD mostraram que as correntes de pico de oxidação de EP e paracetamol foram proporcionais às concentrações correspondentes nas faixas de  $1$  a  $580 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,5$  a  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. O DPR em um nível de concentração de  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  de EP e  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  de paracetamol foram 1,69% e 1,82%, respectivamente. O limite de detecção foi estimado em  $0,09 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

O trabalho de WANG et al (2006) utilizando eletrodo modificado com nanopartículas de ouro demonstrou a possibilidade de detecção voltamétrica da EP, em tampão fosfato pH 7,0, onde obteve-se limite de detecção de  $0,06 \mu\text{mol L}^{-1}$  e faixa linear de trabalho linear para a concentração de EP na faixa de  $0,1$  a  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $10$  a  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  com coeficientes de correlação de  $0,9963$  e  $0,9969$ , respectivamente.

Assim, com a necessidade de elaboração de um método analítico sensível e rápido para analisar os níveis de EP em medicamentos, o presente trabalho visa desenvolver e aplicar uma metodologia analítica de injeção por análise em batelada (BIA) em comparação com injeção por análise em fluxo (FIA) utilizando eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) pré-tratado catodicamente como detector eletroquímico empregando a detecção/determinação por amperometria.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar métodos eletroanalíticos empregando os sistemas BIA e FIA associados à detecção amperométrica com eletrodo DDB para a determinação e quantificação de epinefrina em medicamentos.

Têm-se como objetivos específicos:

- Avaliar o perfil voltamétrico da epinefrina em diferentes pH's do eletrólito suporte e definir as melhores condições para as determinações eletroquímicas de EP;
- Obter as melhores condições dos parâmetros investigados para determinação da EP para os métodos BIA e FIA propostos;
- Validar os métodos propostos em relação a linearidade, repetibilidade, limites de detecção e quantificação e estudo dos interferentes.
- Aplicar o método proposto para determinação de epinefrina em amostra de medicamento comercial contendo o analito (ampolas);

### 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para o preparo das soluções aquosas utilizou-se água desionizada do sistema de purificação Milli-Q (Merck). Todos os reagentes utilizados apresentavam pureza analítica. Na TABELA 2 constam os reagentes usados neste estudo com sua respectiva procedência.

**TABELA 2.** Lista de reagentes usados e sua respectiva procedência

| REAGENTE                              | ORIGEM        |
|---------------------------------------|---------------|
| Fosfato de potássio monobásico anidro | Synth         |
| Ácido sulfúrico                       | Synth         |
| Hidróxido de sódio                    | Synth         |
| Epinefrina                            | Sigma-Aldrich |
| Ácido fosfórico                       | Synth         |
| Ácido clorídrico                      | Synth         |

Para as análises eletroquímicas, uma solução estoque de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de EP foi preparada dissolvendo-se  $0,1832 \text{ g}$  de EP em de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em um volume de  $10 \text{ mL}$ . Para a preparação da solução de EP, um banho ultrassônico (Ecosonics®) foi utilizado para dissolução de EP durante cerca de  $30 \text{ min}$ , na ausência de luz, para minimizar a decomposição do analito, seguindo a recomendação de trabalhos da literatura (SILVA, et al, 2007; PARANHOS, 2014).

As soluções utilizadas para avaliação dos parâmetros de detecção dos sistemas BIA e FIA para a construção das curvas analíticas e validação dos métodos foram preparadas a partir da diluição da solução estoque supracitada, diluídas em tampão fosfato pH 7. A solução tampão fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2–8) foi preparada utilizando  $0,1361 \text{ g}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em um balão volumétrico de  $100 \text{ mL}$ , o qual foi completado com água desionizada. O pH foi ajustado utilizando ácido fosfórico ou hidróxido de sódio.

### 3.2 EQUIPAMENTOS

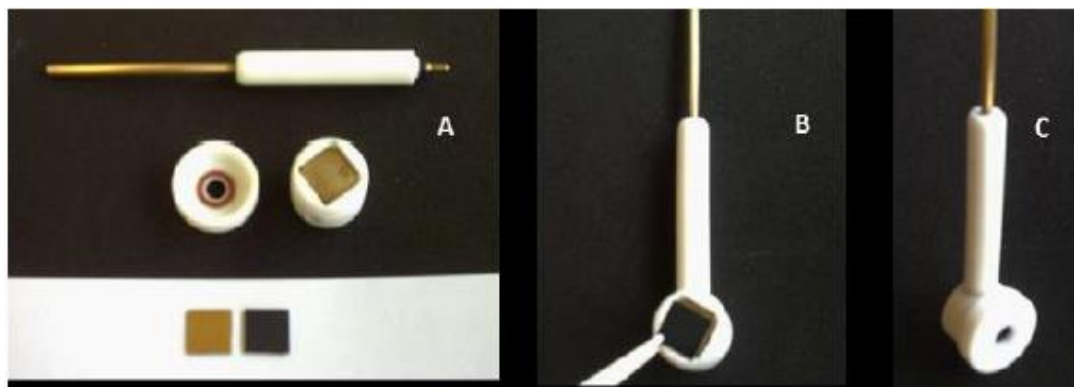
Para as análises eletroquímicas, utilizou-se um sistema Potenciostato/Galvanostato modelo PGSTAT 128N da AUTOLAB. As variáveis eletroquímicas foram controladas por meio do *software* GPES versão 4.9. Os dados obtidos foram processados por meio do programa *Origin*8.0 que gerou as figuras dos voltamogramas e cronoamperogramas apresentados nesta dissertação.

Os outros equipamentos utilizados foram: balança analítica (OHAUS, Adventurer), pHmetro (GEHAKA, PG 1800), purificador de água (MERCK, Milli-Q), banho ultrassônico (ECO-SONICS), micropipeta eletrônica (PIPETMAN® M P300), agitador magnético (VELP SCIENTIFICA), fonte de tensão/corrente (INSTRUTHERM) e bomba peristáltica (Minipuls 3- GILSON).

### 3.3 CÉLULA ELETROQUÍMICA CONVENCIONAL

As caracterizações eletroquímicas deste trabalho, bem como o pré-tratamento do eletrodo de DDB, foram realizadas em modo batelada, utilizando-se a técnica de da voltametria cíclica e empregando-se uma célula eletroquímica do tipo convencional (3 eletrodos) acoplada ao Potenciostato/Galvanostato.

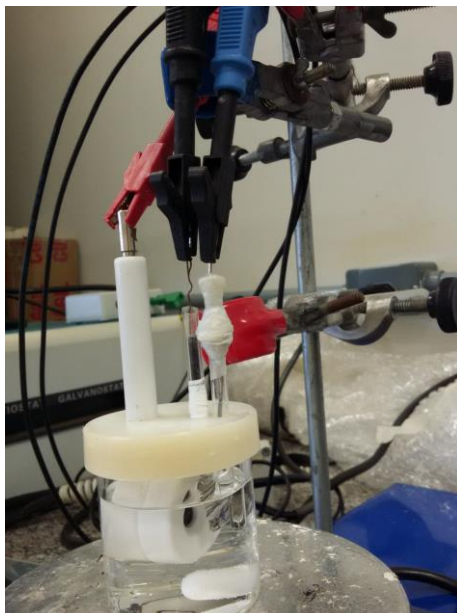
O eletrodo de trabalho (ET) utilizado foi o DDB com área igual a 1,2 cm<sup>2</sup>, o qual foi introduzido em um suporte de Teflon permitindo uma área exposta de 0,32 cm<sup>2</sup> (FIGURA 7). Como contra eletrodo (CE) utilizou-se uma placa de platina com área de 1,5 cm<sup>2</sup> embutida em tubo de vidro.



**FIGURA 7.** Suporte de teflon para o eletrodo de trabalho (DDB): (A) suporte aberto mostrando o compartimento onde o eletrodo de trabalho é colocado (B) eletrodo de DDB sendo colocado no suporte e (C) suporte fechado pronto para ser usado nas análises eletroquímicas.

Fonte: DE AMORIM, 2015.

Para as medidas da voltametria cíclica utilizou-se célula eletroquímica convencional com os eletrodos de trabalho (DDB), de referência (Ag (s) /AgCl (s) em KCl KCl sat.) E um contra eletrodo de platina. Para construção do eletrodo de referência realizou-se eletrodeposição de um filme de cloreto de prata (AgCl) em um fio de prata (Ag) utilizando solução saturada de KCl e aplicando-se uma corrente anódica de 100 mA por 30 s. Após o procedimento de deposição, o fio de Ag (s) /AgCl (s) foi inserido numa microponteira de 100  $\mu$ L que apresentava a menor extremidade (ponta da micropipeta) parcialmente fechada por uma junção porosa. A microponteira foi preenchida com uma solução saturada de KCl. Na FIGURA8 encontra-se a imagem da célula eletroquímica com três eletrodos utilizada neste trabalho.



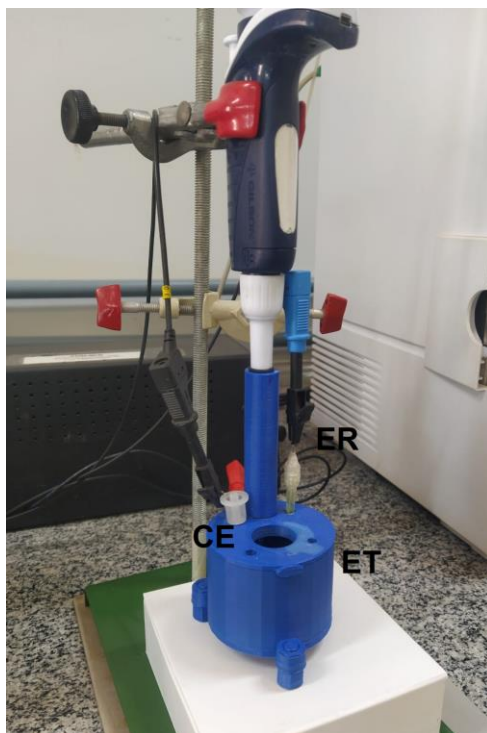
**FIGURA 8.** Célula eletroquímica convencional e os eletrodos utilizados.  
Fonte:Autora

O eletrodo de DDB utilizado neste trabalho foi sintetizado pela técnica de deposição de vapor químico assistida por filamento quente HF-CVD (Hot Filament Chemical Vapor Deposition), com a temperatura do filamento compreendida entre 2440 °C e 2560 °C, e foi produzido pelo Centro Suíço de Eletrônica e Microtécnica (CSEM), Neuchâtel, Suíça. O teor nominal de dopagem do eletrodo utilizado foi de 8000 ppm de boro com uma área exposta de 0,32 cm<sup>2</sup>.

### 3.4 CÉLULA ELETROQUÍMICA - BIA

A célula utilizada para determinação eletroquímica de EP no sistema BIA (FIGURA9) possui capacidade de 100 mL, uma tampa superior com 3 furos: um para entrada do eletrodo de referência Ag(s)/AgCl(s) (KCl sat.), outro para o contra eletrodo (fio de platina) e um terceiro para entrada da micropipeta eletrônica. A parte inferior da célula contém um orifício onde é colocado o eletrodo de trabalho (DDB) e o contato elétrico, que consiste de uma placa de aço - inox. A área do eletrodo de trabalho é delimitada por um O-ring (0,32 cm<sup>2</sup>).

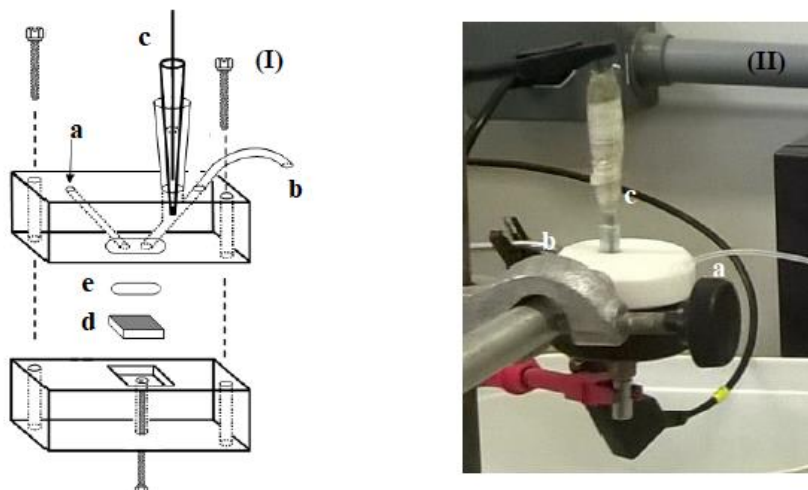
Uma micropipeta eletrônica foi utilizada para realizar as injeções, a qual pode efetuar injeções de volumes que variam entre 20  $\mu\text{L}$  e 300  $\mu\text{L}$  e velocidades de injeção que variaram de 10  $\mu\text{L s}^{-1}$  a 210  $\mu\text{L s}^{-1}$ .



**FIGURA 9.** Imagem do sistema BIA, utilizado no trabalho com a pipeta eletrônica. ER = eletrodo de trabalho, CE = contra-eletrodo e ER = eletrodo de referência. Fonte: Autora

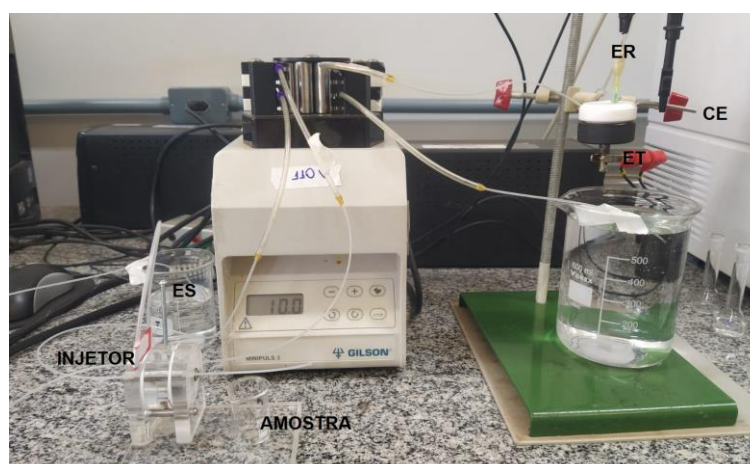
### 3.5 CÉLULA ELETROQUÍMICA – FIA

A célula eletroquímica utilizada no sistema FIA (FIGURA 10) é constituída por dois blocos de Teflon<sup>®</sup>. Na parte superior, encontram-se 3 orifícios para conexão do eletrodo de referência (Ag/AgCl) (c), contra-eletrodo (aço inoxidável) que também é utilizado como canal de saída de fluxo (b) e entrada de fluxo na célula (a). Na parte inferior, um parafuso fixado tem a função de fazer o contato elétrico com o eletrodo de trabalho (d). Um anel a base de silicone (e) é responsável pela vedação do sensor, impedindo que a solução escape através da junção existente entre os dois blocos de Teflon<sup>®</sup>.



**FIGURA 10.** (I) Representação esquemática e (II) foto ilustrativa do sensor eletroquímico utilizado nas análises por CLAE-EC. Fonte: ANDRADE et al., 2009

O sistema FIA utilizado (FIGURA 11) consiste de linha única, sendo a propulsão do eletrólito realizada por meio de bomba peristáltica de baixos pulsos (MINIPULS 3, GILSON®). O injetor adotado no sistema consiste de uma peça de acrílico, com um eixo central que permite a troca de canais do sistema FIA por meio de uma alavanca. Assim, o fluxo segue normalmente com o eletrólito por um canal e, quando é necessário injetar amostra no sistema, faz-se a aspiração desta solução para a alça de amostragem. A injeção é realizada movimentando-se a alavanca para frente, fazendo o fluxo percorrer por outro canal que passa pela alça e leva a amostra até a célula eletroquímica. Ao retornar a alavanca para a posição original a alça é liberada para uma nova injeção.



**FIGURA 11.** Imagem do sistema FIA e o sistema de injeção utilizado no trabalho. Eletrodo de referência (ER), contra-eleto-rodo (CE), eletrodo de trabalho (ET) e eletrólito suporte (ES). Fonte: Autora.

### **3.6 METODOLOGIA**

#### **3.6.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA EP**

Segundo a literatura (SALAZAR–BANDA et al, 2006, SUFFREDINI et al, 2004), a mudança das terminações na superfície do eletrodo do DDB pode afetar de maneira significativa o sinal analítico, o tipo de pré-tratamento da superfície do eletrodo de DDB foi avaliado.

A resposta eletroquímica da EP no eletrodo de DDB foi avaliada por VC com eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Assim, antes do início das medidas eletroquímicas, o eletrodo de DDB foi submetido à limpeza com água desionizada e posterior condicionamento eletroquímico de sua superfície.

O condicionamento do eletrodo de DDB envolveu pré-tratamento anódico com duração de 1 min seguido de pré-tratamento catódico por 3 min, ambos utilizando uma densidade de corrente de  $1,0 \text{ A cm}^2$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Uma placa de platina foi utilizada como contra-eletrodo e uma fonte de tensão/corrente forneceu a corrente necessária em cada pré-tratamento, como descrito por DE AMORIM, 2015.

O pré-tratamento catódico foi realizado diariamente antes do início das análises. Após o pré-tratamento do eletrodo de DDB, realizam-se 60 varreduras (VC) em solução contendo somente eletrólito suporte escolhido para as medições eletroquímicas do analito (fosfato  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  em pH 7) para a estabilização da superfície do eletrodo. Essas medidas foram realizadas no intervalo de potencial de 0,0 a  $1,5 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$  (KCl sat.) na velocidade de varredura de potencial de  $250 \text{ mV s}^{-1}$ .

Após o pré-tratamento descrito, as medidas de VC foram realizadas em célula convencional para investigar o comportamento eletroquímico da EP no eletrólito de suporte (Tampão Fosfato) na faixa de pH 2-8. As análises foram realizadas com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , adicionando  $200 \mu\text{L}$  de solução padrão de EP com concentração de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  à célula eletroquímica.

#### **3.6.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA DETECÇÃO NO SISTEMA BIA**

Os parâmetros avaliados no sistema BIA foram a velocidade de injeção e volume de injeção. Para isso, os estudos foram realizados pela injeção de

solução padrão de EP  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  fixando-se o volume de injeção em  $50 \mu\text{L}$  e variando-se a velocidade das injeções em  $10 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $40 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $120 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $210 \mu\text{L s}^{-1}$ . Após determinada a melhor condição de velocidade de injeção, fixou-se seu valor e variou-se o volume de injeção entre  $10 \mu\text{L}$  e  $130 \mu\text{L}$ . Todas as medidas foram realizadas em triplicata e cada ponto da curva foi obtido pela média aritmética do sinal de corrente registrado de cada injeção.

Após realização e avaliação dos resultados obtidos em cada etapa do desenvolvimento, os estudos foram conduzidos adotando-se as melhores condições estabelecidas.

### **3.6.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA DETECÇÃO NO SISTEMA FIA**

Os parâmetros avaliados no sistema BIA foram vazão e volume de injeção. Para isso, os estudos foram realizados pela injeção de solução padrão de EP  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  fixando-se o volume de injeção em  $50 \mu\text{L}$  e variando-se a vazão em  $40 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $70 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $80 \mu\text{L s}^{-1}$ . Após determinada a melhor condição de vazão, fixou-se seu valor e variou-se o volume de injeção em  $50 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{L}$ ,  $150 \mu\text{L}$ ,  $200 \mu\text{L}$  e  $250 \mu\text{L}$ .

Todas as medidas foram realizadas em triplicata e cada ponto da curva foi obtido pela média aritmética do sinal de corrente registrado de cada injeção. Após realização e avaliação dos resultados obtidos em cada etapa do desenvolvimento, os estudos foram conduzidos adotando as melhores condições estabelecidas.

### **3.6.4 VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO**

Os voltamogramas hidrodinâmicos foram obtidos em solução tampão fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Soluções padrão de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de EP foram injetadas nos sistemas BIA e FIA, ambos com detecção amperométrica, nas melhores condições de velocidade de injeção/vazão e volume de injeção obtidos. Os potenciais foram aplicados em uma faixa variando de  $+0,50 \text{ V x Ag/AgCl (KCl sat.)}$  a  $+1,00 \text{ V x Ag/AgCl (KCl sat.)}$ . Todas as medidas foram realizadas em

triplicata e cada ponto da curva foi obtido pela média aritmética do sinal de corrente registrado de cada injeção.

### 3.6.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para determinação qualitativa e/ou quantitativa do analito de interesse, assegurando a confiabilidade das medições químicas. Os parâmetros avaliados no estudo da validação do método para determinação eletroquímica de EP foram curva analítica (linearidade), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão intradia e interdida. Os parâmetros descritos foram avaliados seguindo as orientações presentes em BRASIL - 2017.

A faixa linear de trabalho foi determinada com base na curva de regressão linear obtida a partir da média dos resultados em triplicata apresentados pelas injeções nas melhores condições de análise para ambos os sistemas (BIA e FIA). As concentrações de EP utilizadas foram de  $0,05 \mu\text{molL}^{-1}$  a  $50 \mu\text{molL}^{-1}$ .

O método para determinação dos LD e LQ adotado neste trabalho foi feito pela relação sinal-ruído, onde a razão sinal-ruído deve ser maior ou igual a 2:1 para LD e no mínimo de 10:1 para o LQ.

Após avaliação dos melhores parâmetros da detecção amperométrica nos sistemas BIA e FIA, estudos foram realizados para determinação da repetibilidade das metodologias propostas, sendo este parâmetro avaliado através do desvio padrão relativo (DPR) das respostas de 10 injeções sequenciais de EP numa concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de EP para o sistema BIA e  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o sistema FIA.

De acordo com BRASIL (2017) “A exatidão de um método analítico é obtida por meio do grau de concordância entre resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro”. Essa pode ser expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente dada pela equação abaixo:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concetração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Já a precisão tem como objetivo avaliar a proximidade dos resultados obtidos entre ensaios independentes. Normalmente, a precisão é expressa como coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), sendo calculado de acordo com a equação:

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média determinada}} \times 100$$

Assim, para avaliação da exatidão e precisão dos sistemas BIA e FIA com detecção amperométrica, foram realizados estudos em três níveis diferentes contemplando o intervalo linear da faixa de trabalho, em triplicata em cada nível: i) nível baixo, ii) nível intermediário e iii) nível alto.

Foram realizadas análises intradia (realizadas no mesmo dia) e interdia (realizados em três dias consecutivos). Todas as análises foram feitas em triplicata para cada nível de concentração.

### **3.6.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO**

Uma vez validado, o método foi aplicado para a determinação eletroanalítica de EP em amostras de medicamentos nos sistemas BIA e FIA com detecção amperométrica. As ampolas de EP (ADREN® 1,0 mg mL<sup>-1</sup>) foram obtidas junto à Secretária de Saúde de Catalão-GO. Para determinação da EP, foram realizadas diluições do conteúdo das ampolas no eletrólito suporte tampão fosfato em pH 7 de modo a enquadrarem-se dentro da faixa de concentração das curvas analíticas obtidas para determinação da recuperação para ambos os métodos (BIA e FIA), sendo cada análise realizada em triplicata.

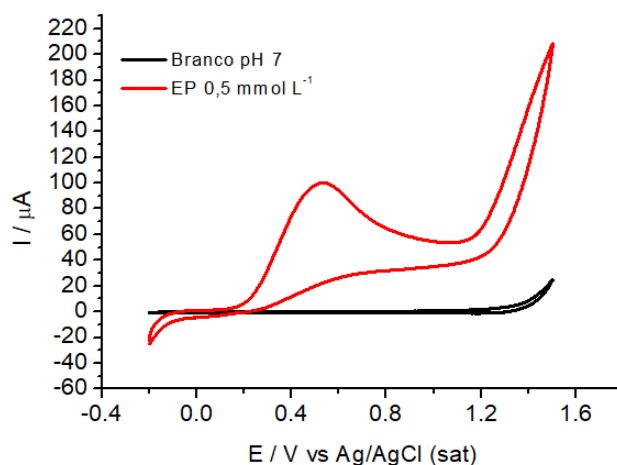
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PERFIL E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA EP

Tradicionalmente, como as superfícies dos eletrodos de DDB recém preparados são hidrofóbicas, deve-se realizar uma drástica polarização anódica/catódica em meio ácido, o que torna o eletrodo bem menos hidrofóbico (às vezes até hidrofílico), permitindo que medidas eletroquímicas sejam possíveis de serem realizadas (HUPERT et al, 2003, SALAZAR-BANDA, et al., 2006, PLESKOV, 2000). O tratamento eletroquímico consiste em uma ativação dos sítios ativos da superfície dos eletrodos (em terminações de hidrogênio ou oxigênio), podendo alterar a taxa de transferência eletrônica.

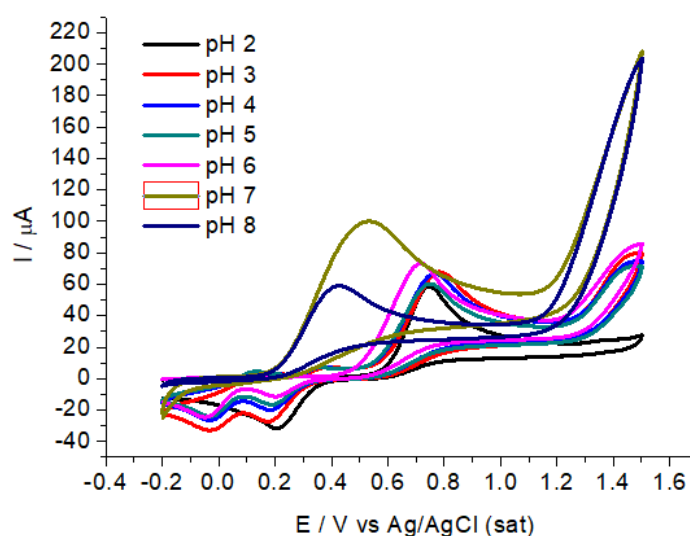
Alguns trabalhos relatam o pré-tratamento catódico do eletrodo DDB em formulações farmacêuticas, como a determinação hidroquinona (CUNHA et al, 2013), prometazina e codeína (PEREIRA et al, 2014), amlodipina e atenolol (SILVA et al, 2016), entre outros. SUFFREDINI et al. (2004) descreveu que o pré-tratamento catódico diminui o limite de detecção eletroanalítico para moléculas orgânicas, além de garantir resultados confiáveis e reproduzíveis. Paranhos (2014), relata que sinais eletroquímicos maiores foram obtidos com o pré-tratamento catódico quando comparado ao pré-tratamento anódico para determinação de EP utilizando o eletrodo DDB.

Diante disso, optou-se por trabalhar com o eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente na determinação eletroquímica de EP. A FIGURA 12 mostra os resultados obtidos da avaliação do sinal eletroquímico da EP em resposta ao eletrodo pré-tratado catodicamente.



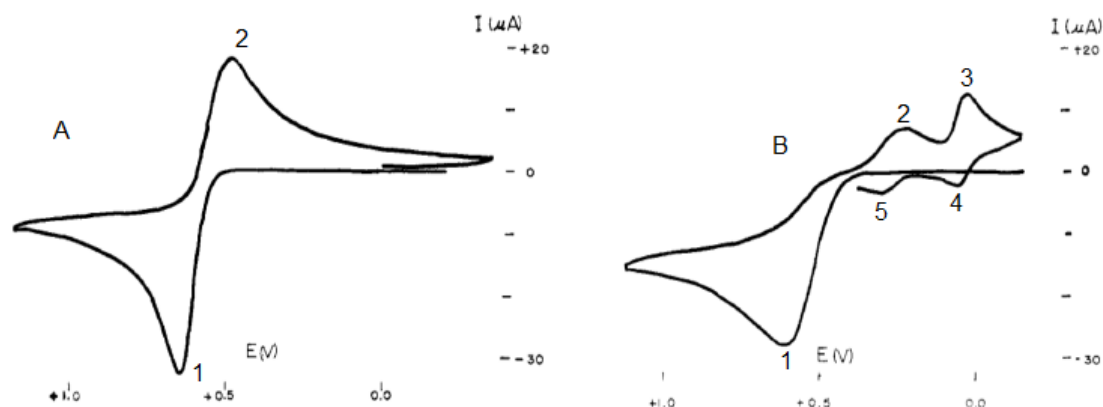
**FIGURA 12.** Voltamograma cíclico da caracterização do eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente em eletrólito de tampão fosfato 0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0.  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Conforme observado no voltamograma cíclico mostrado na FIGURA 12, a EP apresenta um perfil voltamétrico do tipo irreversível, ou seja, somente o processo de oxidação foi observado dentro do intervalo de potencial investigado. Após a região do potencial de pico de oxidação da EP (a partir de  $\sim 1,1$  V x Ag(s)/AgCl(s) (KCl sat.)), observa-se um aumento exponencial da corrente registrada, o qual é característico da reação de desprendimento de oxigênio (RDO) promovida pela oxidação eletroquímica da água. Os resultados da caracterização eletroquímica da EP em diferentes pH estão mostrados na FIGURA 13.



**FIGURA 13.** Voltamogramas cíclicos da EP  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  com variação de pH (2 a 8) em tampão fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Ao avaliar o comportamento da EP na VC em diferentes pH's (FIGURA 13) pode-se observar que os voltamogramas cíclicos respondem tanto à processos de oxidação como de redução da epinefrina, dependendo do pH. Hawley et al. (1966) propuseram um mecanismo redox para a oxidação da EP sobre eletrodo de pasta de carbono em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a partir de voltamogramas cíclicos realizados em meio ácido (FIGURA 14) e respaldados pelo mecanismo mostrado na FIGURA 15.



**FIGURA 14.** A) Voltametria cíclica de EP ( $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) em  $1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . B) Voltametria cíclica da EP ( $1,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) em pH 3.  $v = 2,0 \text{ V/min}$ . Fonte: Adaptado de Hawley et al. (1966).

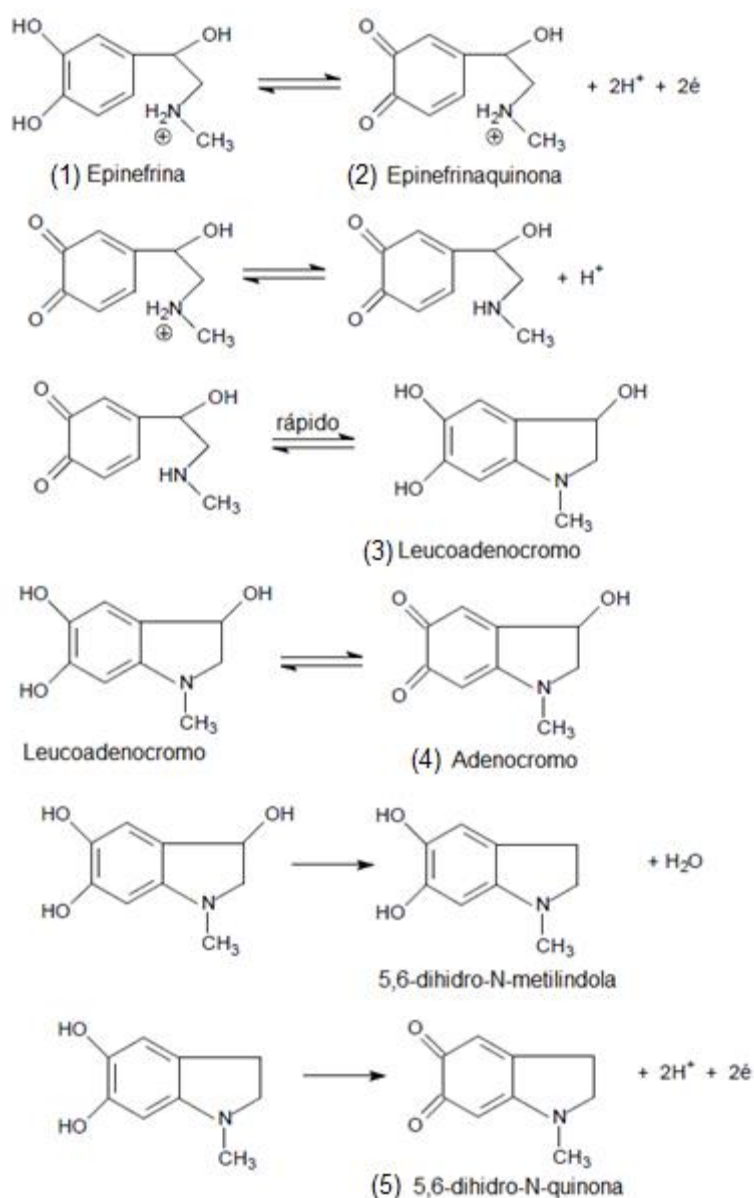
É importante ressaltar que os voltamogramas cíclicos mostrados na FIGURA 14 possuem configuração de medição distinta daquela que é aplicada nos dias atuais. Nestes voltamogramas, o sentido da varredura anódica é feito da direita para a esquerda, sendo as correntes anódicas e catódicas registradas com sinais negativo e positivos, respectivamente. Apesar das configurações atuais (e utilizadas neste trabalho) serem apresentadas de modo inverso ao apresentado pelos referidos autores, isso não altera em nada a interpretação dos resultados.

Assim, segundo o mecanismo proposto por Hawley et al. (1966), no VC realizado para oxidação da EP em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4 1 \text{ mol L}^{-1}$  (FIGURA 14A), a varredura anódica apresenta um pico de oxidação (1) perto de 0,7 V, o qual corresponde à oxidação da EP com formação de uma quinona de cadeia aberta (Epinefrinaquinona). Na varredura reversa, somente um pico de redução (2) é observado, sendo atribuído à redução da quinona à EP. Em pH 3, entretanto, o VC obtido (FIGURA 14B) mostra um resultado bastante diferente. Da mesma forma como no VC da FIGURA 14A, na varredura anódica da FIGURA 14B observa-se um pico de oxidação da EP (1) em  $\sim 0,6 \text{ V}$  (formação de Epinefrinaquinona), somente um pouco deslocado para um valor menos anódico quando comparado ao da FIGURA 14A. Entretanto, na varredura reversa o pico de redução desta quinona à EP (2) é observado ocorrer em menor intensidade de corrente e outro pico catódico (3) bem como outros dois picos anódicos (4 e 5) aparecem na sequência do voltamograma. O pico 3 corresponde à redução

do produto de ciclização (adenocromo) à leucoadenocromo e o pico 4 corresponde à oxidação do leucoadenocromo à adenocromo. Segundo os autores, o par redox adenocromo-leuadenocromo foi identificado em decorrência da coloração vermelha observada na região da superfície do eletrodo, a qual é típica da oxidação da EP à adenocromo. O pico 5 do VC da FIGURA 14B foi identificado como sendo fruto da oxidação do 5,6-dihidro-N-metilindola (formado pela desidratação do leucoadenocromo) à 5,6-dihidro-N-quinona.

Em pH menores do que 3, a epinefrina é protonada em grande extensão ( $pK_a = 8,88$ ) e, conseqüentemente, somente o par redox EP-Epinefrinaquinona é observado. Por outro lado, a partir de pH 3 a quinona não é protonada o suficiente para impedir a formação dos produtos descritos no VC da FIGURA 14B. A FIGURA 15 sumariza as semi-reações envolvidas durante os processos de oxidação e redução eletroquímica da EP descritos na FIGURA 14.

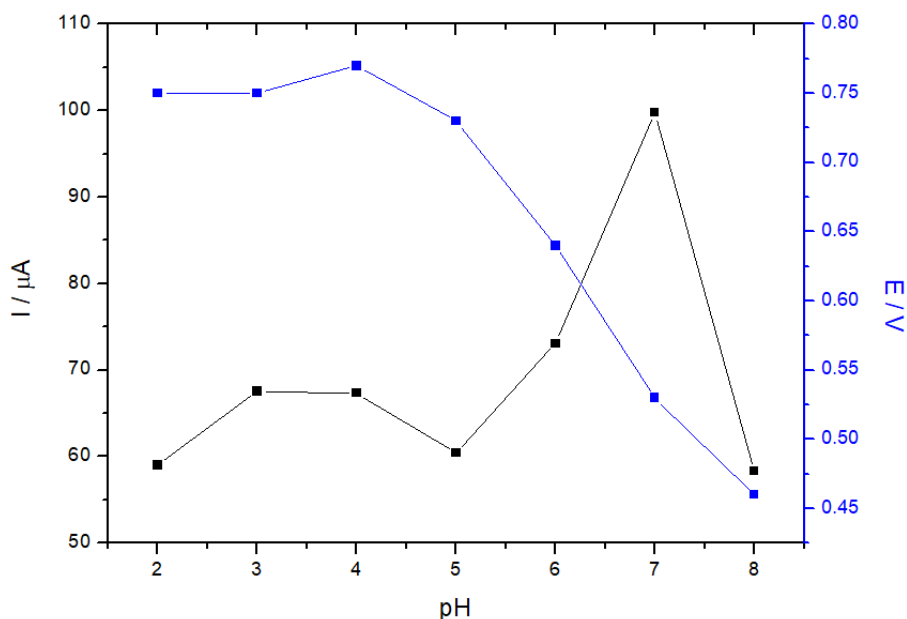
Os VC obtidos neste trabalho (FIGURA 13) foram obtidos em eletrólito diferente do mecanismo proposto por Hawley et al. (1966). Apesar disso, parte de suas observações foi considerada para a atribuição dos picos de redução encontrados em meio ácido. Nos VC obtidos em meio neutro e alcalino (pH 7 e 8), os pH estão mais próximos do valor do  $pK_a$  da EP, o que confere à molécula de EP um caráter diferenciado (mais próximo do neutro) e que pode ter levado ao perfil de irreversibilidade da EP observado nestas condições.



**FIGURA 15.** Mecanismo eletroquímico da oxidação da Epinefrina proposto por Hawley et al. (1966). Fonte: Adaptado de SACILOTO, 2014.

Quanto à influência do pH sobre a corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) e o potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ), a FIGURA 16 mostra que menores sinais de corrente de oxidação da EP são obtidos em pH menores e maiores que 7. O perfil da curva de  $I_{pa}$  em função do pH mostra que o maior sinal de corrente de oxidação é obtido em pH 7. De acordo com Saciloto (2014), como a EP possui um  $pK_a$  de 8,88, possivelmente, em pH mais elevados ocorre um aumento da forma desprotonada da EP em solução, a qual deve possuir menor atividade eletroquímica levando, portanto, a diminuição das correntes de pico de oxidação

observadas. Por outro lado, as menores  $I_{pa}$  observadas em meio ácido provavelmente decorrem do fato de que como o processo de oxidação envolve a liberação de  $2H^+$ /molécula (FIGURA 15), quanto maior a concentração de íons  $H^+$  maior a dificuldade do processo de oxidação da EP ocorrer, já que o equilíbrio tende a se deslocar no sentido de formação de reagentes.



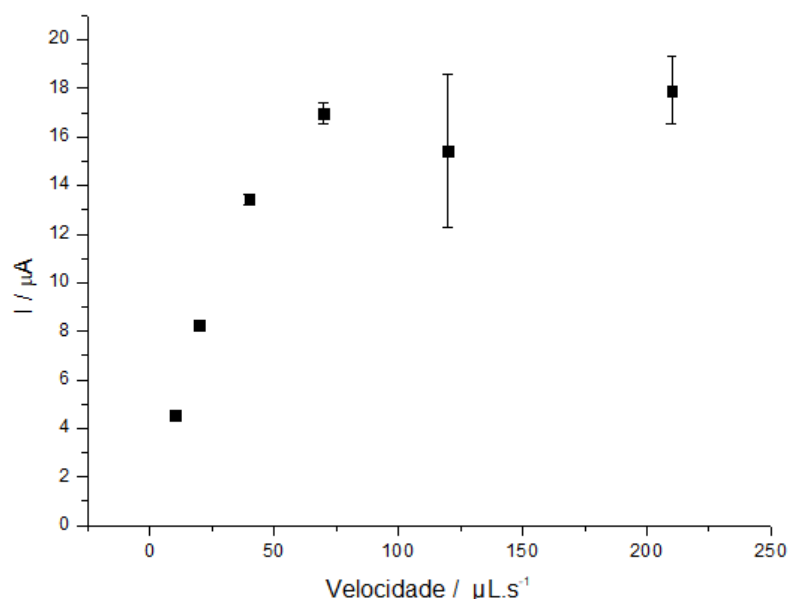
**FIGURA16.** Relação  $I_{pa}$  x pH e  $E_{pa}$  x pH obtidos da VC da EP ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ),  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

Ainda com relação à FIGURA 16, verifica-se que o  $E_{pa}$  mostra um deslocamento do potencial para valores menos anódicos quanto maior o valor do pH. Os dados experimentais no intervalo de pH 4 a pH 8 apresentaram um decaimento linear do  $E_{pa}$  com uma inclinação de  $82 \text{ mV/pH}$ . De acordo com a literatura (HAWLEY et al., 1967; SACIOTO, 2014), a reação de oxidação eletroquímica da EP é sugerida envolver o mesmo número de prótons e elétrons e, portanto, uma inclinação próxima de  $\sim 60 \text{ mV/pH}$  deveria ser esperada, tal como ocorreu ainda que de forma menos aproximada.

Assim, o melhor resultado em relação à intensidade de sinal e perfil dos picos para o processo eletroquímico de oxidação da EP foi o obtido em pH 7 e o desenvolvimento do método proposto para determinação de EP em medicamentos utilizando os sistemas BIA e FIA apresentados a seguir foram todos realizados neste pH.

## 4.2 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE EP EM SISTEMA BIA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA

O desempenho do sistema BIA com detecção amperométrica foi avaliado por meio dos parâmetros de velocidade de injeção e volume de injeção. O parâmetro de velocidade de injeção foi investigado fixando-se o volume de injeção de uma solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em  $50 \mu\text{L}$  e variando-se os valores entre  $10 \mu\text{L s}^{-1}$  a  $210 \mu\text{L s}^{-1}$ . Ambos parâmetros foram programados a partir do próprio mecanismo eletrônico presente na micropipeta eletrônica utilizada. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e o potencial aplicado nessas determinações foi de  $0,50 \text{ V x Ag/AgCl (KCl sat.)}$  (próximo do  $E_{pa}$  para EP na VC) e os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 17.

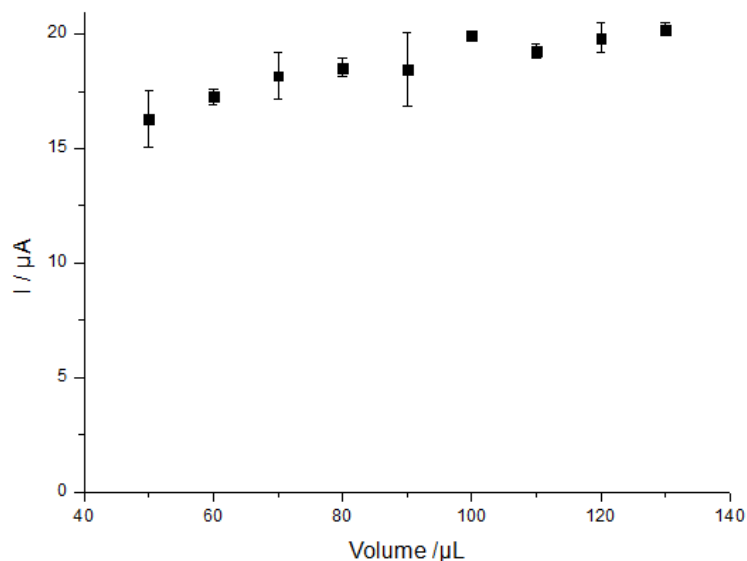


**FIGURA 17.** Influência da velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L}$  de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na resposta de corrente obtida com o sistema BIA com detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Potencial aplicado de  $0,50 \text{ V x Ag(s)/AgCl(s) (sat.)}$ . Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidades de injeção:  $10 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $40 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $120 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $210 \mu\text{L s}^{-1}$ .

De acordo com os resultados apresentados na FIGURA 17, observa-se um aumento nos sinais decorrentes de oxidação com o aumento da velocidade de injeção, tendendo a um patamar a partir  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ . Este patamar observado

decorre de limitações envolvendo o transporte de massa do analito em direção à superfície do eletrodo de DDB, ou seja, a partir  $70 \mu\text{L s}^{-1}$  o processo passa a ser controlado majoritariamente por difusão e maiores aumentos na velocidade de injeção, de fato, não devem ser mais esperados. Cabe ressaltar que em velocidades de injeção maiores ( $120 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $210 \mu\text{L s}^{-1}$ ) o desvio das medidas realizadas em triplicatas foram nitidamente maiores, o que parece demonstrar limitações do sistema para altos valores de velocidades de injeção. Portanto, considerando-se a intensidade do sinal amperométrico obtido, juntamente com reprodutibilidade das medidas, a velocidade de injeção mais adequada para a determinação de EP foi considerada ser em  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ .

Uma vez determinado a melhor condição de velocidade de injeção, a avaliação da influência do volume injetado foi feita, agora, fixando-se o valor da velocidade de injeção em  $70 \mu\text{L s}^{-1}$  e variando-se os volumes de injeção da solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) de  $50 \mu\text{L}$  a  $130 \mu\text{L}$ . A FIGURA 18 mostra os resultados dessa medida.

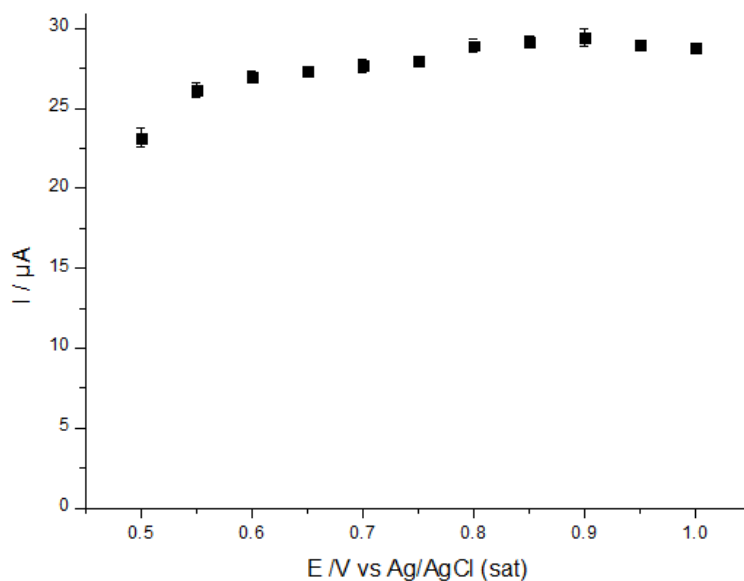


**FIGURA 18.** Influência do volume de solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) injetado na resposta de corrente obtida com o sistema BIA com detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Potencial aplicado de  $0,50 \text{ V x Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.). Volumes de injeção:  $50 \mu\text{L}$ ,  $60 \mu\text{L}$ ,  $70 \mu\text{L}$ ,  $80 \mu\text{L}$ ,  $90 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{L}$ ,  $110 \mu\text{L}$ ,  $120 \mu\text{L}$  e  $130 \mu\text{L}$ . Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ .

É possível observar na FIGURA 18 que os sinais de corrente de oxidação da EP não apresentam uma variação significativa com o aumento do volume de

solução de EP injetada. A variação do volume de injeção de 60  $\mu\text{L}$  para 130  $\mu\text{L}$  (mais que o dobro) resultou em um aumento de apenas 20% no sinal de corrente, o que já demonstra certo grau de saturação da solução nas regiões próximas da superfície do eletrodo no sistema BIA, onde ocorre a reação de oxidação. De qualquer forma, o volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$  foi selecionado como a melhor condição por apresentar maior sinal de corrente.

Uma vez definidas as melhores condições de pH, velocidade de injeção e volume de injeção, o parâmetro eletroquímico de potencial aplicado também foi investigado. Para isso, a partir da injeção de solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) no sistema BIA, e sob as melhores condições descritas (velocidade de injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$  e volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$ ), variou-se o potencial aplicado nos valores de 0,50 V a 1,00 V xAg(s)/AgCl(s) (KCl sat.). Todas as injeções foram realizadas em triplicatas e os resultados dessa medida são apresentados na FIGURA 19.



**FIGURA 19.** Voltamograma hidrodinâmico obtido para o sistema BIA a partir da injeção de 100  $\mu\text{L}$  de solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) sobre eletrodo de DDB pré-tratado catódicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ .

A partir dos dados mostrados na FIGURA 19 verifica-se que o sinal de corrente obtido apresenta pouca variação com o aumento do potencial aplicado, o que de certa forma já era esperado dado que o potencial mínimo aplicado nesta

medição já encontra-se próximo do potencial de pico da EP neste pH (ver FIGURA 12). A diferença entre o valor mínimo de corrente registrado no potencial de 0,50 V x Ag(s)/AgCl(s) (KCl sat.) e o máximo no potencial de 0,90 V x Ag(s)/AgCl(s) (KCl sat.) foi de aproximadamente 15%. Portanto, o valor do potencial selecionado como a condição mais adequada para a determinação eletroquímica da EP pelo método BIA foi de 0,85 V x Ag(s)/AgCl(s) (KCl sat.) em função de seu valor corrente ser praticamente o mesmo do obtido em 0,90 V x Ag(s)/AgCl(s) (KCl sat.) e também por estar um pouco mais distante da região de RDO (oxidação da água) minimizando um pouco mais sua influência no processo. Na TABELA 3 são sumarizados parâmetros avaliados e os valores selecionados como as melhores condições para análise eletroquímica pelo método BIA.

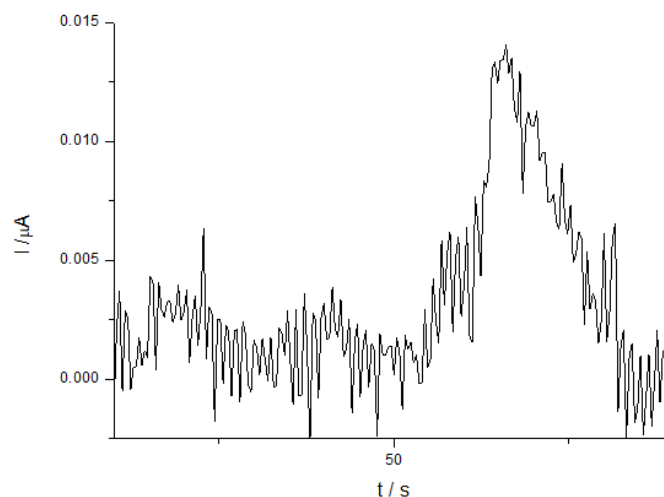
**TABELA 3.**Melhores condições avaliadas para o sistema BIA com detecção amperométrica de EP.

| <b>Parâmetro</b>   | <b>Faixa estudada</b>                            | <b>Melhor valor</b>    |
|--|--|------------------------|
| <b>pH</b>  | 2-8  | 7                      |
| <b>Velocidade da injeção</b>                             | 10 $\mu\text{Ls}^{-1}$ - 210 $\mu\text{Ls}^{-1}$ | 70 $\mu\text{Ls}^{-1}$ |
| <b>Volume da injeção</b>                                 | 50 $\mu\text{L}$ - 130 $\mu\text{L}$             | 100 $\mu\text{L}$      |
| <b>Potencial aplicado<br/>(xAg(s)/AgCl(s)(KCl sat.))</b> | 0,50 V – 1,0 V                                   | 0,85 V                 |

#### 4.2.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIA

##### 4.2.1.1 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O método para determinação dos LD e LQ foram determinados pela relação sinal-ruído, onde a razão sinal-ruído deve ser maior ou igual a 2:1 para determinação do LD e no mínimo de 10:1 para determinação do LQ. A FIGURA 20 mostra o cronoamperograma obtido para o LD obtido.

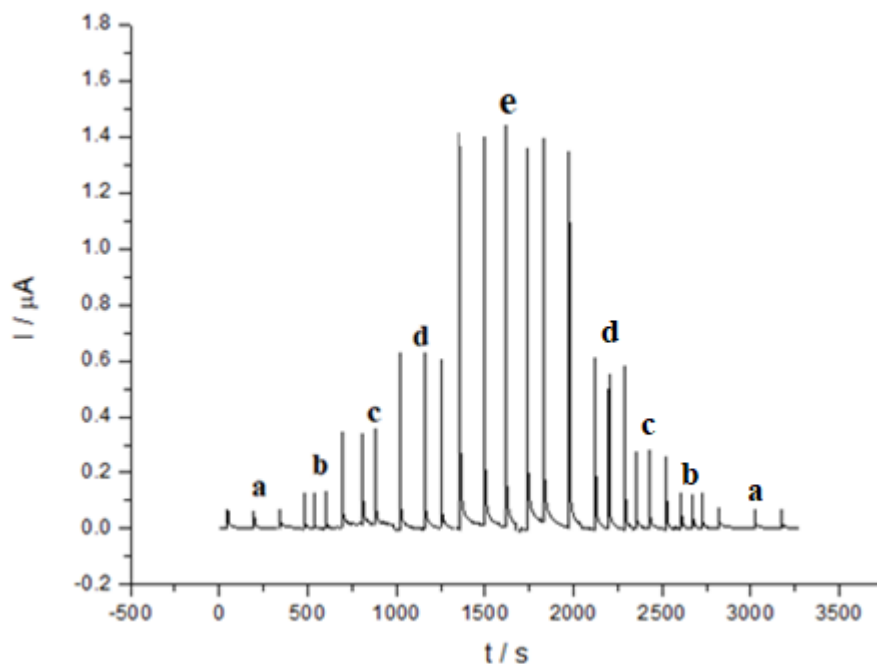


**FIGURA 20.** Cronoamperograma obtido para adeteccção electroquímica referente à obtenção do LD ( $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na determinação electroquímica da EP no sistema BIA por detecccção amperométrica sobre electrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ .  $E = +0,85 \text{ V} \times \text{Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.). Volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ .

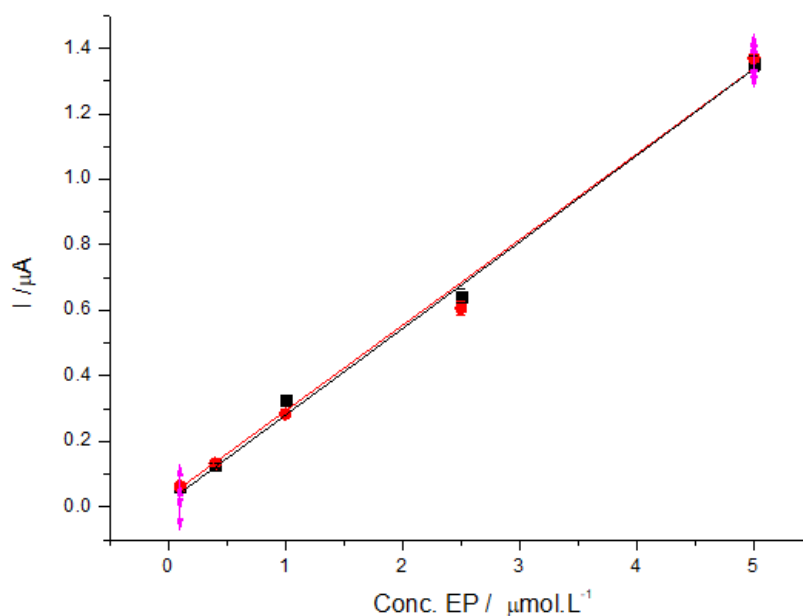
De acordo com a FIGURA 20, verifica-se que sinal obtido para determinação do LD, de fato, respalda o critério estabelecido em BRASIL (2017). Os valores de LD e LQ obtidos na determinação electroquímica da EP no sistema BIA por detecccção amperométrica sobre electrodo de DDB pré-tratado catodicamente foram, portanto de  $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

#### 4.2.1.2 LINEARIDADE

A linearidade do método foi avaliada a partir da construção de uma curva analítica obtida em um intervalo de concentração de EP de  $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Cada ponto da curva foi obtido a partir das médias aritméticas dos resultados provenientes das injeções em triplicata e sob as melhores condições pré-determinadas (TABELA 3). As FIGURAS 21 e 22 mostram os resultados obtidos no cronoamperograma e curva analítica, respectivamente.



**FIGURA 21.** Respostas amperométricas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA de soluções de EP de concentrações de a)  $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , b)  $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , c)  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , d)  $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  e)  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ , Volume da injeção de  $100 \mu\text{L}$  e potencial aplicado de  $0,85 \text{ V} \times \text{Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.).

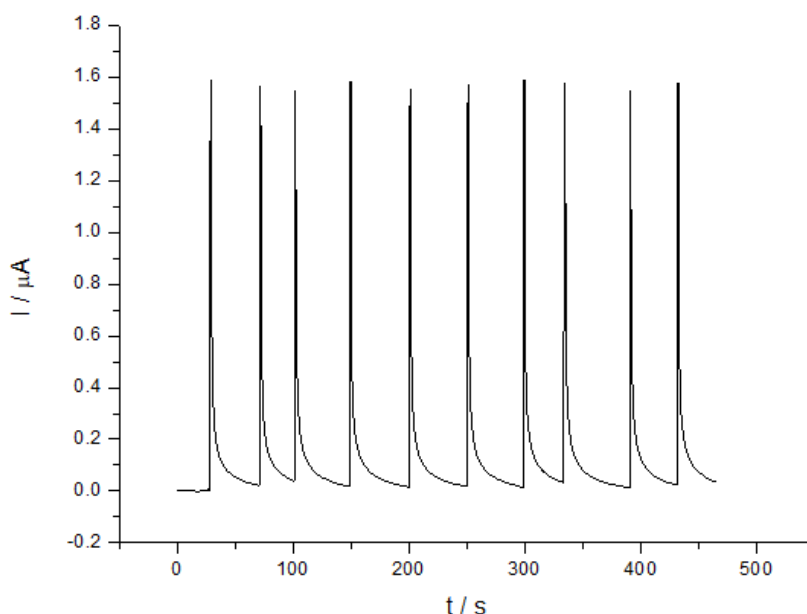


**FIGURA 22.** Curvas analíticas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA com detecção amperométrica de soluções de EP nas concentrações de a)  $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , b)  $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , c)  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , d)  $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  e)  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{s}^{-1}$ , Volume de injeção de  $100 \mu\text{L}$  e potencial aplicado de  $0,85 \text{ V} \times \text{Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.). Curvas em preto e vermelho referem-se as sequências crescente e decrescente de injeções, respectivamente.

As soluções padrão de EP foram injetadas em ordem de concentração crescente e decrescente no sistema BIA com detecção amperométrica (FIGURA 21) e apresentaram boa linearidade nas faixas de concentrações estudadas nas duas ordens descritas (FIGURA 22). Excelentes valores de coeficientes de correlação obtidos para as curvas realizadas nas ordens crescente e decrescente foram obtidos (0,992 e 0,996 respectivamente). Além disso, os valores dos coeficientes angulares obtidos em ambas as curvas apresentaram ótima concordância entre si ( $0,26 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ ), demonstrando que não foi observado contaminação do eletrodo, o que poderia gerar sinais eletroquímicos discrepantes em função de possíveis produtos de oxidação adsorvidos.

#### 4.2.1.3 REPETIBILIDADE DO MÉTODO

Um método analítico adequado requer que o sinal obtido tenha elevada estabilidade. Nesse sentido, com base nos valores selecionados na TABELA 3, foram realizados estudos de repetibilidade ( $n = 10$ ) com uma concentração de EP de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A FIGURA 23 mostra o resultado dessa medida.



**FIGURA 23.** Avaliação de repetibilidade ( $n = 10$ ) na resposta obtida com o sistema BIA com detecção amperométrica para a determinação de EP ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ .  $E = +0,85 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl (KCl sat.)}$ . Volume de injeção de  $100 \mu\text{L}$ .

De acordo com os resultados mostrados na FIGURA 23, as correntes registradas apresentaram um valor médio de  $1,57 \pm 0,02 \mu\text{A}$ , com um desvio padrão relativo (DPR) de apenas 1,37%, evidenciando que o sistema BIA proposto apresentou excelente estabilidade no sinal obtido pela injeção sucessiva de 10 amostras de EP na mesma concentração.

O baixo valor de DPR pode ser atribuído não somente à estabilidade do eletrodo de DDB às análises, mas também à precisão das injeções proporcionadas pela micropipeta utilizada devido a seu mecanismo eletrônico de injeção, além do posicionamento fixo e próximo à superfície do eletrodo de DDB no sistema BIA, possibilitando que o transporte de massa aconteça por migração até o sensor seguida da dispersão do analito (QUINTINO & ANGNES, 2004). Além disso, a frequência de análise do método BIA desenvolvido foi estimada ser, a partir da FIGURA 23, de 40 análises por hora, o que demonstra elevada rapidez para obtenção de repostas.

#### 4.2.1.4 EXATIDÃO E PRECISÃO

A exatidão do método proposto foi avaliada a partir de ensaios de recuperação intradia e interdia em triplicata para as concentrações intermediárias de EP da curva analítica ( $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão expressa como porcentagem de desvio entre as quantidades adicionadas e as recuperadas (%), nas concentrações analisadas. Os resultados dessas medidas estão mostrados na TABELA 4.

**TABELA 4.** Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia obtidas na determinação eletroquímica de EP em três níveis de concentração para o sistema BIA com detecção amperométrica. Eletrólito suporte tampão fosfato ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7), volume de injeção de  $100 \mu\text{L}$ , velocidade injeção de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ .  $E = 0,85 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl (KCl sat.)}$ .

| EP<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | 1° dia         | 2° dia        | 3° dia         | Média (n=9)    |
|----------------------------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
|                                  | Exatidão (%)   | Exatidão (%)  | Exatidão (%)   | Precisão (%)   |
| 0,1                              | $106 \pm 16$   | $113 \pm 18$  | $99,9 \pm 8,8$ | $106 \pm 6,0$  |
| 1,0                              | $95,9 \pm 6,1$ | $105 \pm 11$  | $90,8 \pm 4,2$ | $97,2 \pm 7,3$ |
| 5,0                              | $111 \pm 4,7$  | $101 \pm 1,6$ | $106 \pm 5,1$  | $106 \pm 4,9$  |

A partir dos dados apresentados na TABELA 4, pode-se concluir que os resultados obtidos estão dentro das normas de aceitação do método (BRASIL, 2017), a qual estabelece que os valores de precisão e exatidão devem ser inferiores à variação de 20% e a faixa de teor entre 80 e 120%.

Portanto, os valores obtidos mostraram que o método BIA com detecção amperométrica utilizando o eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente como detector eletroquímico para a determinação de EP apresentou um desempenho eficiente, sensível e reprodutível.

#### 4.2.1.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Dentro da validação do método, o método BIA foi aplicado para determinação de EP em ampolas de ADREN<sup>®</sup> a partir da diluição de sua concentração nominal em EP (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) para concentração de 5,0 µmol L<sup>-1</sup>. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A TABELA 5 mostra o resultado dessa medida.

**TABELA 5.** Resultado obtido do teste de adição e recuperação em amostra farmacêutica comercial.

| Amostra            | EP (µmol L <sup>-1</sup> ) |                         | Recuperado <sup>a</sup> / % |
|--------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
|                    | Adicionado                 | Encontrado <sup>a</sup> |                             |
| ADREN <sup>®</sup> | 5,00                       | 5,93                    | 119                         |

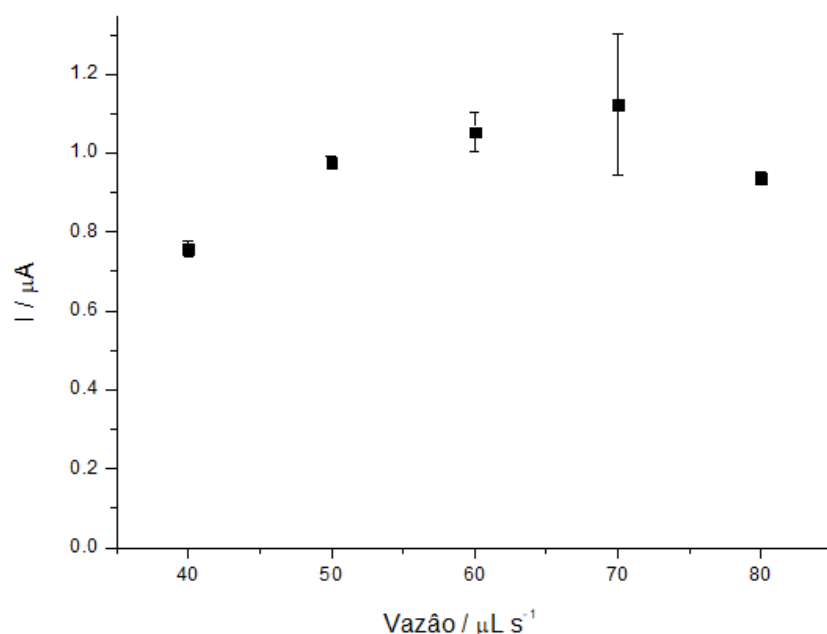
<sup>a</sup> Média de 3 medidas

O resultado obtido foi avaliado a partir da equação de reta obtida da curva analítica obtida (FIGURA 22), obtendo-se uma recuperação de 119%, considerado dentro do aceitável que é 80 - 120% de acordo com BRASIL (2017). A presença do bissulfito de sódio presente nesta formulação tem a função de evitar a oxidação da EP e não interferiu significativamente nas análises. Segundo CUNHA et al. (2013), o potencial de oxidação do bissulfito de sódio ocorre em valores acima de 1,50Vx Ag(s)/AgCl(s)(KCl sat.) e assim, muito distantes do potencial de oxidação da EP.

Portanto, o método desenvolvido apresentou ótima resposta analítica para determinação eletroquímica de EP em medicamento, mesmo na presença do antioxidante (bissulfito de sódio), o que garante a confiabilidade de aplicação do método, permitindo determinar a substância contida no fármaco em concentrações dentro da faixa de linearidade da curva analítica validada na determinação eletroquímica de EP.

### 4.3 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE EP EM SISTEMA FIA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA

A avaliação do desempenho do sistema FIA com detecção amperométrica foi realizada a partir da variação dos parâmetros inerentes à técnica: volume da alça de amostragem (ou volume de injeção) e vazão do sistema (ou velocidade de injeção). Assim, a resposta eletroquímica da EP foi avaliada inicialmente fixando-se o volume de injeção (alça de amostragem) em 50  $\mu\text{L}$  e variando-se a velocidade de injeção (vazão do sistema) nos seguintes valores de 40  $\mu\text{L s}^{-1}$ , 50  $\mu\text{L s}^{-1}$ ; 60  $\mu\text{L s}^{-1}$ , 70  $\mu\text{L s}^{-1}$  e 80  $\mu\text{L s}^{-1}$  utilizando solução padrão de EP (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) com injeções feitas em triplicata. A FIGURA 24 mostra o resultado dessas medidas.



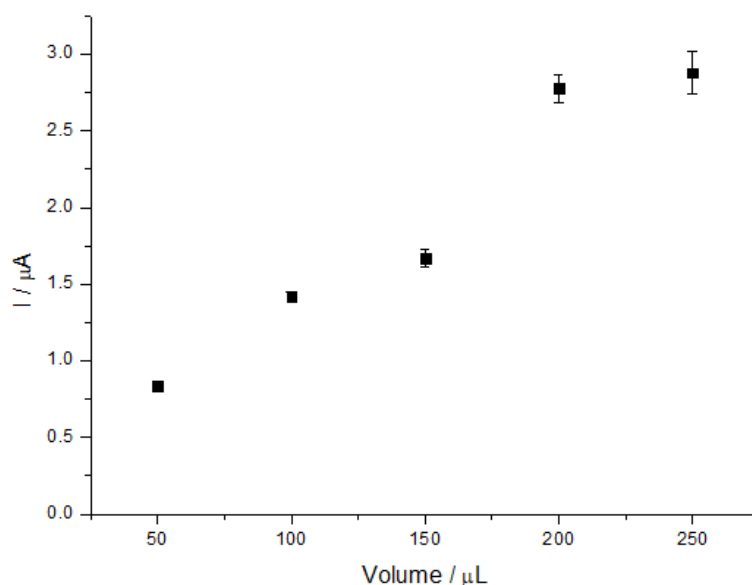
**FIGURA 24.** Influência da vazão (velocidade de injeção) de 50  $\mu\text{L}$  de EP (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na resposta de corrente obtida com o sistema FIA com detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Potencial aplicado de 0,50 V x Ag/AgCl (sat). Tampão Fosfato 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 7). Velocidades de injeção: 40  $\mu\text{L s}^{-1}$ , 50  $\mu\text{L s}^{-1}$ ; 60  $\mu\text{L s}^{-1}$ , 70  $\mu\text{L s}^{-1}$  e 80  $\mu\text{L s}^{-1}$ .

É importante ressaltar que a escolha dos valores tanto de vazão como de volume de injeção investigados no sistema FIA foram feitos com base nas possibilidades técnicas da bomba peristáltica empregada (vazão) bem como no tamanho adequado da alça de amostragem (volume de injeção) visando-se buscar uma faixa de análise onde os parâmetros investigados no método FIA pudessem ser comparados com os mesmos parâmetros investigados e validados no sistema BIA.

Conforme evidenciado na FIGURA 24, verifica-se que o sinal analítico de corrente registrada tem um aumento de aproximadamente 30% quando a vazão do sistema passa de  $40 \mu\text{L s}^{-1}$  para  $70 \mu\text{L s}^{-1}$ , o que pode ser justificado em função da melhoria do transporte de massa do analito em direção à superfície do eletrodo (diminuição da camada de difusão de Nernst) quando a vazão é aumentada. Entretanto, verificou-se que neste sistema FIA que os resultados obtidos para vazões acima de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$  apresentavam certa dificuldade de reprodutibilidade de análise. Em altas vazões era observada a formação de bolhas no percurso de circulação da solução, as quais eram responsáveis por uma variação significativa no sinal de corrente obtido. O resultado mostrado na FIGURA 25 para a vazão de  $70 \mu\text{L s}^{-1}$  evidencia claramente esta observação em função da barra de erro da medida realizada em triplicata. Apesar da medida realizada em  $80 \mu\text{L s}^{-1}$  ter apresentado boa reprodutibilidade na medida, é importante ressaltar que este comportamento raramente se repetia.

Neste sentido, a vazão de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$  foi considerada como a condição mais adequada para emprego neste sistema visto que não foi observada elevação significativa das respostas de corrente em vazões superiores. Além de ter proporcionado alta frequência analítica, picos bem definidos e nenhuma observação de formação de bolhas no sistema.

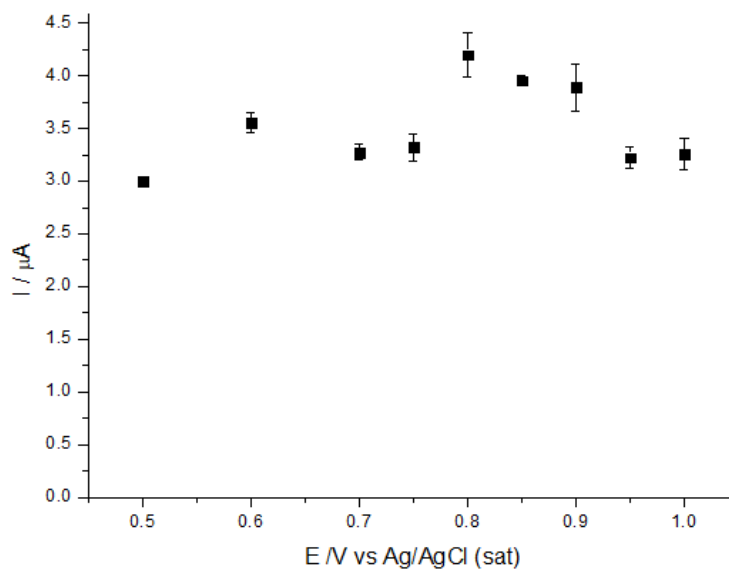
Assim, uma vez determinada a melhor condição de velocidade de injeção para a determinação eletroquímica de EP pelo sistema FIA, fixou-se seu valor em  $50 \mu\text{L s}^{-1}$  e variou-se o volume de injeção das amostras de solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) para  $50 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{L}$ ,  $150 \mu\text{L}$ ,  $200 \mu\text{L}$  e  $250 \mu\text{L}$ . Todas as medidas foram realizadas em triplicata e o resultado está apresentado na FIGURA 25.



**FIGURA 25.** Influência do volume de solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) injetado na resposta de corrente obtida com o sistema FIA com detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Potencial aplicado de  $0,50 \text{ V} \times \text{Ag(s)/AgCl(s)}$  (sat). Volumes de injeção:  $50 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{L}$ ,  $150 \mu\text{L}$ ,  $200 \mu\text{L}$  e  $250 \mu\text{L}$ . Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ .

Por meio da análise do gráfico da FIGURA 25 observa-se que quanto maior o volume de solução de EP injetado maior é o sinal de corrente registrado. A partir de  $200 \mu\text{L}$  de volume injetado verifica-se uma estabilidade no valor de corrente obtido, o qual é fruto da saturação de amostra no detector eletroquímico utilizado. Portanto, o volume de injeção de  $200 \mu\text{L}$  foi considerado como a condição mais adequada para emprego neste sistema visto que não foi observada elevação significativa das respostas de corrente em volume superior.

Uma vez definidas as melhores condições de velocidade de injeção e volume de injeção, o parâmetro eletroquímico de potencial aplicado também foi investigado para o sistema FIA com detecção amperométrica. Para isso, a partir da injeção de solução padrão de EP na concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  no sistema FIA, sob as melhores condições descritas (velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$  e volume de injeção de  $200 \mu\text{L}$ ), variou-se o potencial aplicado nos valores de  $0,50 \text{ V}$  a  $1,00 \text{ V} \times \text{Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.). Todas as injeções foram realizadas em triplicata e os resultados do voltamograma hidrodinâmico obtido encontra-se apresentado na FIGURA 26.



**FIGURA 26.** Voltamograma hidrodinâmico obtido para o sistema FIA a partir da injeção de 200  $\mu\text{L}$  de solução padrão de EP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) sobre eletrodo de DDB pré-tratado catódicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ .

A partir dos dados mostrados na FIGURA 26 verifica-se que, a exemplo do que já havia sido observado para o método BIA, o sinal de corrente obtido apresenta pouca variação com o aumento do potencial aplicado, o que de certa forma já era esperado dado que o potencial mínimo aplicado nesta medição já encontra-se dentro da região próxima potencial de pico da EP neste pH (FIGURA 12). A diferença do valor mínimo de corrente registrado no potencial de  $0,50 \text{ V x Ag/AgCl (KCl sat.)}$  e o máximo no potencial de  $0,80 \text{ V x Ag/AgCl (KCl sat.)}$  foi de aproximadamente 30%. Portanto, o valor do potencial selecionado como a condição mais adequada para a determinação eletroquímica da EP pelo método FIA foi de  $0,85 \text{ V x Ag/AgCl (KCl sat.)}$  em função de seu valor corrente ser praticamente o mesmo do obtido em  $0,80 \text{ V x Ag/AgCl (KCl sat.)}$  considerando sua barra de erro de medição (menor valor) e também para fins de comparação com o método BIA. Dessa forma, os dois métodos podem ser colocados em uma mesma condição eletroquímica de análise e melhor comparados. A TABELA 6 sumariza os parâmetros avaliados e os valores selecionados como as melhores condições para determinação eletroquímica de EP pelo método FIA.

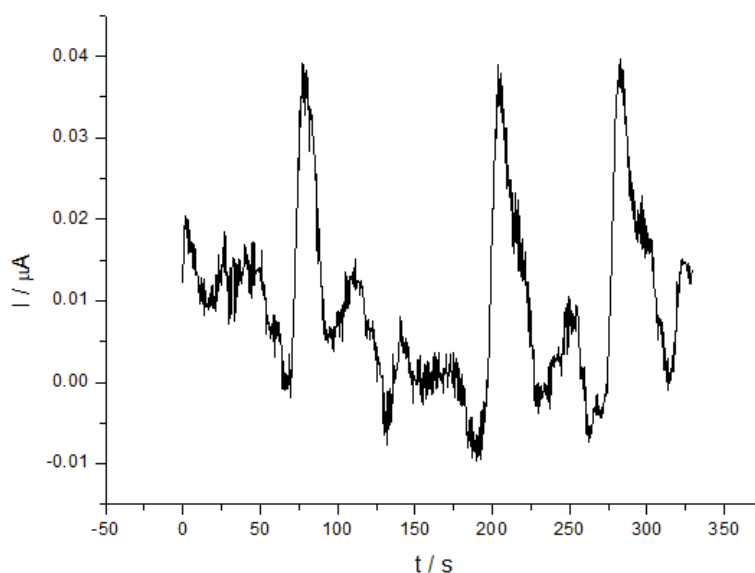
**TABELA 6.** Parâmetros avaliados com o sistema FIA com detecção amperométrica de EP.

| Parâmetro  | Faixa estudada                                  | Melhor valor           |
|--|---|------------------------|
| pH   | 2-8   | 7                      |
| Velocidade da injeção  | 40 $\mu\text{Ls}^{-1}$ - 80 $\mu\text{Ls}^{-1}$ | 50 $\mu\text{Ls}^{-1}$ |
| Volume da injeção  | 50 $\mu\text{L}$ - 250 $\mu\text{L}$            | 200 $\mu\text{L}$      |
| Potencial aplicado<br>( $\times\text{Ag(s)/AgCl(s)(KCl sat.)}$ ) | 0,50 - 1,0 V                                    | 0,85 V                 |

### 4.3.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

#### 4.3.1.1 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os LD e LQ para o método FIA foram determinados pela relação sinal-ruído, onde a razão sinal-ruído deve ser maior ou igual a 2:1 para LD e no mínimo de 10:1 para o LQ, o mesmo adotado para o método BIA. A FIGURA 27 mostra o cronoamperograma obtido para o LD obtido.

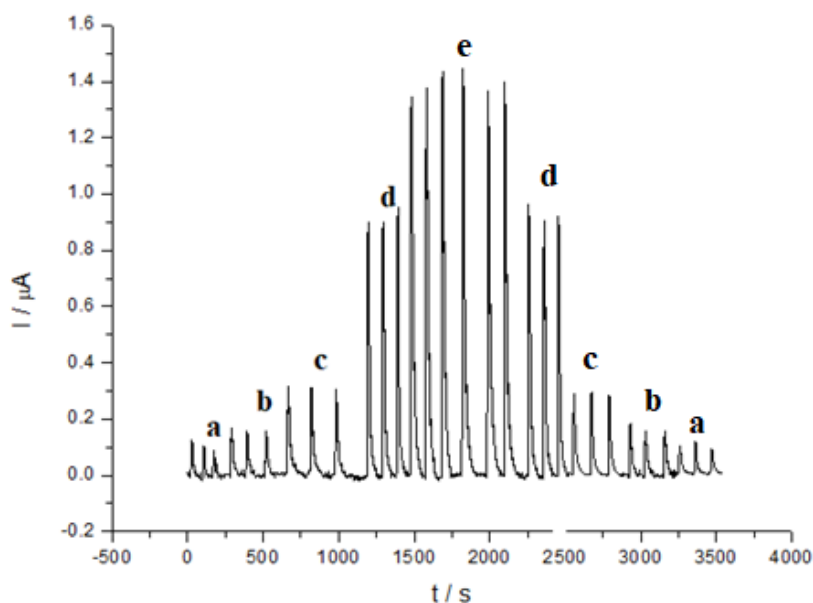


**FIGURA 27.** Cronoamperograma obtido na detecção eletroquímica de EP referente à obtenção do LD ( $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) no sistema FIA por detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catódicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ .  $E = +0,85 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl (KCl sat.)}$ . Volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ .

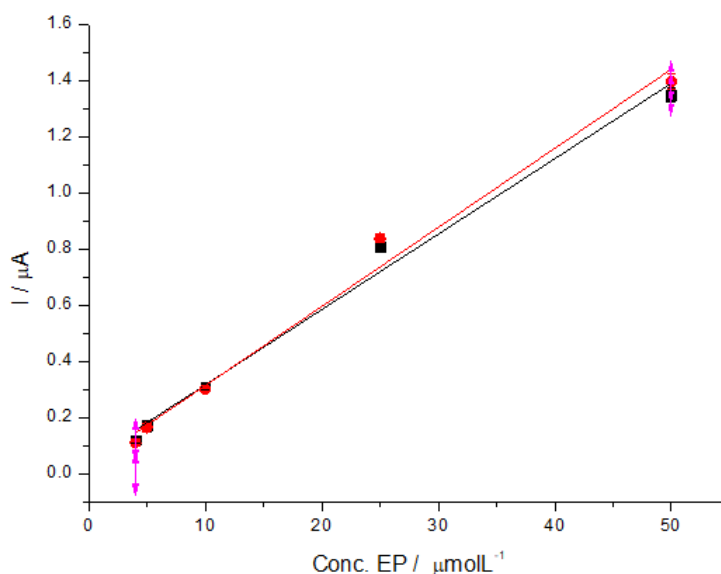
De acordo com a FIGURA 27, verifica-se que sinal obtido para o LD, de fato, obedece ao critério estabelecido em BRASIL (2017). Os valores de LD e LQ obtidos na determinação eletroquímica da EP no sistema FIA por detecção amperométrica sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente foram, portanto de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

#### 4.3.1.2 LINEARIDADE

A linearidade do método foi avaliada a partir da construção de uma curva analítica obtida em um intervalo de concentração de EP de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Cada ponto da curva foi obtido a partir das médias dos resultados provenientes das injeções em triplicata e sob as melhores condições pré-determinadas (TABELA 6). As FIGURAS 28 e 29 mostram os resultados dessa medida (cronoamperograma e curva analítica, respectivamente).



**FIGURA 28.** Respostas amperométricas obtidas sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente após injeções em triplicata no sistema FIA de soluções de EP de concentrações de a)  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , b)  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , c)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , d)  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  e)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ , Volume de injeção de  $200 \mu\text{L}$  e Potencial aplicado de  $0,85 \text{ V x Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.).



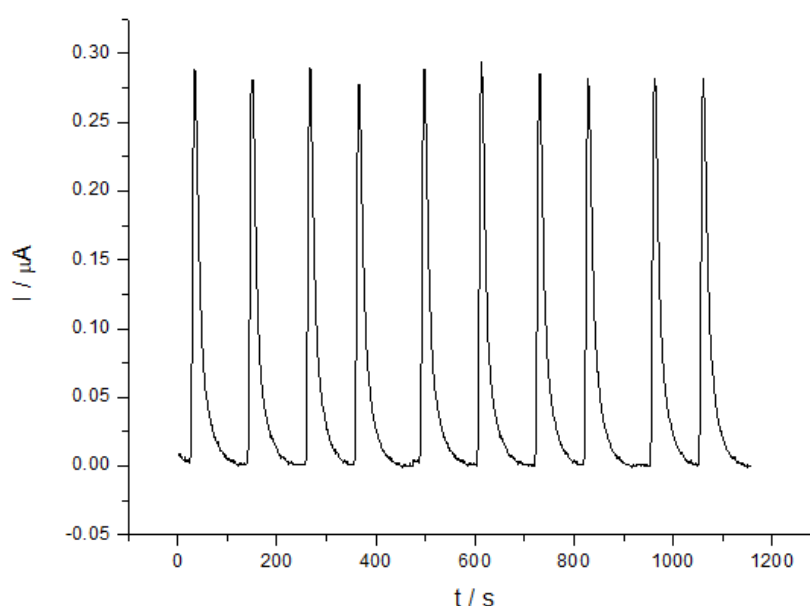
**FIGURA 29.** Curvas analíticas obtidas após injeções em triplicata no sistema FIA com detecção amperométrica de soluções de EP nas concentrações de a)  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , b)  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , c)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , d)  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  e)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ , Volume da injeção de  $200 \mu\text{L}$  e Potencial aplicado de  $0,85 \text{ V} \times \text{Ag(s)/AgCl(s)}$  (sat). Curvas em preto e vermelho referem-se às seqüências crescente e decrescente de injeções, respectivamente.

As soluções padrões de EP foram injetadas em ordem de concentração crescente e decrescente no sistema FIA com detecção amperométrica (FIGURA 28) e apresentou forte correlação linear na faixa de concentração investigada nas duas ordens descritas (FIGURA 29). Os coeficientes de correlação obtidos para as curvas realizadas nas ordens crescente e decrescente foram de 0,986 e 0,987, respectivamente. Além disso, os valores dos coeficientes angulares obtidos em ambas as curvas apresentaram concordância entre si ( $0,0267 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,0282 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ ), demonstrando que não há indícios de contaminação do eletrodo, o que poderia gerar sinais eletroquímicos discrepantes em função de possíveis produtos de oxidação adsorvidos.

#### 4.3.1.3 REPETIBILIDADE

O fato do método FIA encontrar-se constantemente em fluxo com o eletrólito suporte também contribui para a renovação da superfície do eletrodo de modo a tornar as medidas bastante reprodutíveis, tal como evidenciado pelo

estudo de repetibilidade realizado por meio de uma série de 10 injeções consecutivas de solução padrão de EP na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  (FIGURA 30). De acordo com estes resultados, as correntes registradas apresentaram um valor médio de  $0,28 \mu\text{A} \pm 0,01 \mu\text{A}$ , com um desvio padrão relativo (DPR) de apenas 4,45%, evidenciando que o sistema FIA empregado nesta análise apresentou excelente estabilidade no sinal obtido pela injeção sucessiva de 10 amostras de EP na mesma concentração. Além disso, a frequência de análise do método FIA desenvolvido foi estimada ser, a partir da FIGURA 30, de 30 análises por hora, o que demonstra elevada rapidez para obtenção de repostas.



**FIGURA 30.** Avaliação de repetibilidade ( $n = 10$ ) na resposta obtida com o sistema FIA com detecção amperométrica de EP ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) sobre eletrodo de DDB pré-tratado catódicamente. Tampão Fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7). Velocidade de injeção de  $50 \mu\text{L s}^{-1}$ .  $E = +0,85 \text{ V x Ag(s)/AgCl(s)}$  (KCl sat.), Volume de injeção de  $200 \mu\text{L}$ .

#### 4.3.1.4 EXATIDÃO E PRECISÃO

A exatidão do método FIA investigado e desenvolvido foi avaliada a partir de ensaios de recuperação intradia e interdia em triplicata para as concentrações intermediárias de EP da curva analítica ( $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão expressa como porcentagem de desvio entre as quantidades adicionadas e as

recuperadas (%), nas concentrações analisadas. Os resultados dessas medidas estão mostrados na TABELA 7.

**TABELA 7.** Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia obtidos na determinação eletroquímica de EP em três níveis de concentração para o sistema FIA com detecção amperométrica. Eletrólito suporte tampão fosfato (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7), volume de injeção de 200 µL, velocidade de injeção de 50 µLs<sup>-1</sup>. E = 0,85 V x Ag/AgCl (KCl sat.).

| EP<br>(µmolL <sup>-1</sup> ) | 1° dia       | 2° dia       | 3° dia       | Média (n=9)  |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                              | Exatidão (%) | Exatidão (%) | Exatidão (%) | Exatidão (%) |
| 4                            | 83,1 ± 4,5   | 89,6 ± 5,8   | 85,0 ± 17    | 85,9 ± 3,9   |
| 10                           | 104 ± 5,5    | 97,0 ± 11,8  | 95,6 ± 10,4  | 98,7 ± 5,2   |
| 50                           | 99,8 ± 2,6   | 99,8 ± 3,7   | 98,3 ± 2,3   | 99,3 ± 0,9   |

O critério de aceitação para validação dos parâmetros de exatidão e precisão foi adotado com base nos valores de referência estabelecidos em BRASIL (2017), a qual considera-se aceitável o intervalo de recuperação entre 80% e 120%, com precisão ± 20%. Portanto, os valores obtidos mostraram que o método FIA com detecção amperométrica utilizando o eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente como detector eletroquímico para a determinação de EP apresentou um desempenho eficiente, sensível e reprodutível.

#### 4.3.1.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Uma vez validado, o método FIA foi aplicado na determinação de EP em ampolas de ADREN<sup>®</sup> a partir da diluição de sua concentração nominal em EP (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) para concentração de 5,0 µmolL<sup>-1</sup>. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A TABELA 8 mostra o resultado dessa medida.

**TABELA 8.** Resultado obtido do teste de adição e recuperação em amostra farmacêutica comercial.

| Amostra            | EP (µmol L <sup>-1</sup> ) |                         | Recuperado <sup>a</sup> / % |
|--------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
|                    | Adicionado                 | Encontrado <sup>a</sup> |                             |
| ADREN <sup>®</sup> | 5,00                       | 5,65                    | 113                         |

<sup>a</sup> Média de 3 medidas

O resultado obtido foi avaliado a partir da equação de reta obtida da curva analítica obtida (FIGURA 30), obtendo-se uma recuperação de 113 %. Da mesma forma do que foi observado na aplicação do método BIA, a presença do bissulfito de sódio presente nesta formulação também demonstrou não interferir significativamente nas análises, tal como esperado. Portanto, o método FIA desenvolvido apresentou ótima resposta analítica para determinação de EP em medicamento, permitindo determinar a substância contida no fármaco em concentrações dentro da faixa de linearidade da curva analítica validada na determinação eletroquímica de EP.

#### 4.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS BIA E FIA

Uma vez validados e aplicados, nesta seção será feita uma discussão sobre os dois métodos empregados para determinação eletroquímica de EP (BIA e FIA) bem como uma comparação dos resultados obtidos com a literatura atualizada. A TABELA 9 sumariza as principais informações extraídas de cada uma das técnicas empregadas.

**TABELA 9.** Comparação das respostas analíticas dos métodos BIA e FIA com detecção amperométrica para EP.

| <b>Parâmetros</b>  | <b>BIA</b> | <b>FIA</b> |
|--|------------|------------|
| <b>Faixa linear (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>              | 0,1 - 5,0  | 4,0 - 50   |
| <b>Sensibilidade (<math>\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b> | 0,2614     | 0,0268     |
| <b>R<sup>2</sup></b>   | 0,992      | 0,986      |
| <b>LD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>                        | 0,05       | 1,0        |
| <b>LQ (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>                        | 0,1        | 4,0        |
| <b>DPR % (n = 10)</b>  | 1,37       | 4,45       |
| <b>Frequência analítica<br/>(injeções/h)</b>                         | 40         | 30         |

De acordo com os resultados mostrados na TABELA 9 fica claro que o método BIA empregado para determinação eletroquímica de EP sobre eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente possui desempenho muito superior à técnica FIA. O método BIA mostrou ser cerca de 10 vezes mais sensível que o método

FIA e os LD e LQ alcançados pela análise por BIA foram, respectivamente 20 e 40 vezes mais baixos do que aqueles alcançados pelo método FIA, como já relatado em outros trabalhos (QUITINO ANGNES, 2004 e BACKES et al., 2017).

É importante ressaltar que, apesar da velocidade de injeção empregada no método FIA ( $50 \mu\text{L s}^{-1}$ ) ter sido um pouco menor do que a que foi utilizada no método BIA ( $70 \mu\text{L s}^{-1}$ ), o volume de injeção duas vezes maior empregado no método FIA não foi suficiente para compensar a menor vazão utilizada. De qualquer forma, todas as características apresentadas pelas duas técnicas tornam os métodos apresentados neste trabalho mais atraentes para aplicações em análises de rotina quando comparados a metodologias tradicionais como cromatografia e espectroscopia que, apesar de robustos e altamente sensíveis, possuem maiores complexidade de análises e de custo operacional, além de apresentarem frequências analíticas significativamente menores.

Além disso, os dados da TABELA 10 mostram que o LD obtidos na determinação eletroquímica de EP no sistema BIA desenvolvido são bem menores do que os relatados por outros autores utilizando outras técnicas eletroquímicas, o que demonstra a importância da contribuição do fluxo da amostra em direção à superfície do eletrodo em termos de transporte de massa proporcionadas pelas técnicas desenvolvidas neste trabalho.

**TABELA 10.** Dados relatados na literatura referentes à determinação de EP em amostras farmacêuticas usando técnicas eletroquímicas.

| Eletrodo de trabalho | Modificado   | Técnica  | LD ( $\mu\text{molL}^{-1}$ ) | Faixa de trabalho ( $\mu\text{molL}^{-1}$ ) | Referência                   |
|----------------------|--------------|----------|------------------------------|---|------------------------------|
| GCE*                 | PMP*         | VOQ*     | 0,17                         | 0,75 - 200                                  | ASLANOGLU, M, et al (2008)   |
| CPE*                 | PtNP/IL/LAC* | VOQ*     | 0,29                         | 0,99 - 210                                  | BRONDANI, D. et al (2009)    |
| GCE*                 | Pt-AuNP*     | VPD*     | 57                           | 63 - 400                                    | THIAGARAJA N, J et al (2009) |
| AuE*                 | AuNP/DTT*    | VC*      | 0,06                         | 0,1 - 10                                    | WANG, L. et al (2006)        |
| CPE*                 | IL/CNT*      | VPD*     | 0,09                         | 0,3 - 450                                   | TAVANA, T. et al (2012)      |
| DDB*                 |              | FIA/AMP* | 1,0                          | 4,0 - 50                                    | Este trabalho                |
| DDB*                 |              | BIA/AMP* | 0,05                         | 0,1 - 5,0                                   | Este trabalho                |

**Abreviaturas:** AMP: Amperometria; AuNP: nanopartículas de ouro, DDB: diamante dopado com boro, CPE: eletrodo de pasta de carbono, VC: voltametria cíclica, DPV: voltametria de pulso diferencial, DTT: ditioneína, GCE: eletrodo de carbono vítreo, IL: líquido iônico, PBS: Solução tampão fosfato, PT: polytaurine, PtNP: Nanopartícula de platina, VOQ- voltametria de onda quadrada

## 5 CONCLUSÃO

Os estudos de caracterização eletroquímica da EP sobre eletrodo de DDB demonstraram que o pH do meio tem um papel importante em sua quantificação em medicamentos. O uso do eletrodo DDB pré-tratado catodicamente se mostrou eficaz na determinação/quantificação de EP mesmo na presença de interferentes como bissulfito de sódio, frequentemente presente nas ampolas de epinefrina.

Ótimos resultados foram alcançados, tais como alta frequência analítica, baixos limites de detecção e quantificação, bons coeficientes de correlação, baixo desvio padrão e exatidão satisfatória para ambos sistemas BIA e FIA. Além disso, a aplicação dos métodos desenvolvidos na determinação/quantificação de EP em amostra comercial demonstrou que os métodos atendem com eficiência os critérios de validação. Dessa forma, todas essas características tornam os métodos ainda mais atraentes para aplicações em análises de rotina, além de apresentar baixa geração de resíduos, baixo custo de análise e simplicidade de execução.

Diante dos resultados alcançados com o uso dos sistemas BIA e FIA, considera-se que este trabalho de pesquisa alcançou seu objetivo em desenvolver e validar um procedimento para determinação eletroanalíticas da EP em medicamentos utilizando detecção amperométrica com eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente.

## 6 REFERÊNCIAS

ADELOJU, S. B. AMPEROMETRY, **Encyclopedia of Analytical Science (2nd Edition)**, p.70-79, 2005.

ANDRADE, L. S.; MORAES, M. C; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO FILHO, O; CASS. Q. B. A multidimensional high performance liquid chromatography method coupled with amperometric detection using a boron-doped Diamond electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovin and milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 654, n. 2, p.127-132, 2009.

ASLANOGLU, M.; KUTLUAY, A.; KARABULUT, S.; ABBASOGLU, S. Voltammetric determination of adrenaline using a poly (1-methylpyrrole) modified glassy carbon electrode, **J. Chin. Chem. Soc.** v.55 p.794–800, 2008.

BABAEI, A.; BABAZADEH, M.; AFRASIABI, M. A sensitive simultaneous determination of adrenalin and paracetamol on a glassy carbon electrode coated with a film of chitosan/room temperature ionic liquid/single-walled carbon nanotubes nanocomposite, **Chin. J. Chem.** v 29 p.2157–2164, 2011.

BACKES, R. S.; GUEDES, T. J.; SANTOS, W. T. P.; SILVA, R. A. B. Determinação rápida e simples de Citrato de Sildenafil (Viagra® e genéricos) empregando eletrodo impresso de carbono em sistemas fia e bia com detecção amperométrica. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 752-759, 2017.

BARROS, R. C. M.; RIBEIRO, M. C.; AN-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. S.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, N. G. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, p. 317-325, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 166**, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: <[http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COM\\_P.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COM_P.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)>. Acesso em 28 de julho de 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 298**, de 12 de agosto de 2019. Dispõe sobre a aprovação da Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7984json-file-1.>>. Acesso em 22 de setembro de 2021.

BRONDANI, D. **Desenvolvimento de biossensores para determinação de adrenalina**. Florianópolis, Programa de Pós – Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010. Dissertação de mestrado, 97p.

CALIXTO, C. M. F.; SANTOS, S. X. D.; CAVALHEIRO, É. T. G. “Eletrodo compósito à base de grafite-araldite®: aplicações didáticas – parte II”. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p.367-372, 2014.

COSTA OLIVEIRA, T., FREITAS, J. M., MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Talanta**, Amsterdam, v. 152, p.308-313, 2016.

CUNHA, R; TORMIN, T. F.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A.A. Determinação rápida de hidroquinona usando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica. **Química Nova**. v.36; p.663-668. 2013.

DE AMORIM, K. P. **Desenvolvimento de um método por ponto nuvem dos hormônios naturais e1 e e2 em amostras de urina e determinação por CLAE/EC utilizando eletrodo de diamante dopado com boro**. Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química - UFG, 2015. Dissertação de mestrado, 37 p.

FELIX, F. S.; YAMASHITA, M.; ANGNES, L. Epinephrine quantification in pharmaceutical formulations utilizing plant tissue biosensors. **Biosens. Bioelectron**. v. 21,p. 2283–2289, 2006.

GIMENES, D. T; CUNHA, R. R.; DE CARVALHO RIBEIRO, M. M. A.; PEREIRA, P. F.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac. **Talanta**, Amsterdam v. 116, p.1026-1032, 2013.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11ed., Rio de Janeiro: McGraw- Hill Interamericana do Brasil, 2006.

HARPER, H. P. **Manual de química fisiológica**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1982.

HARRIS, D. C. **Química analítica qualitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro, 2012.

HAWLEY, M.D., TATAWAWADI, S.V., PIEKARSKI, S.; ADAMS, R.N. Electrochemical studies of oxidation pathways of catecholamines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, p. 447- 450,1966.

HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, J.; STOPPER, J.; CVAKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y. & SWAIN, G. M. “Conductive diamond thin-films in electrochemistry”. *Diam. Relat. Mater.* v.12, p. 1940-1949, 2003.

KONDO, T.; HORITANI, M.; YUASA, M. “Sensitive Electrochemical Detection of Glucose at Glucose Oxidase-Cobalt Phthalocyanine-Modified Boron-Doped Diamond Electrode. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

KUZMANOVIC, D.; STANKOVIC, D. M.; MANOJLOVIC, D.; KALCHER, K.; ROGLIC, G. Baicalein – main active flavonoid from *Scutellaria baicalensis* O voltammetric sensing in human samples using boron doped Diamond electrode. **Diamond & Related Materials**, v. 58, p. 35-39, 2015.

LEITE, O. D.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C.; BARBOSA, A. M. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. **Talanta**, 59, p.889–896, 2003.

LOPES-JÚNIOR, A. C. V. **Determinação de sildenafil (Viagra®) e carbamazepina em formulações farmacêuticas por amperometria de múltiplos pulsos em sistema FIA**. Diamantina, Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, 2012. Dissertação de mestrado. 79p.

MICHAEL, D.J; WIGHTAMN, R. M. “Electrochemical monitoring of biogenic amine neurotransmission in real time”. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.19, p.33, 1999.

PARANHOS, M. M. **Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para determinação de neurotransmissores utilizando eletrodos de zircônia nanoestruturada e diamante dopado com boro**. Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química – UFG, 2014. Dissertação de Mestrado, 87p.

PEREIRA, P. F.; MARRA, M. C.; CUNHA, R. R.; DA SILVA, W. P.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 713, p. 32-38, 2014.

PEREIRA, P. F.; MARRA, M. C.; LIMA, A. B.; DOS SANTOS, W. T. P.; MUNOZ, R. A.A.; RICHTER, E. M. Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron doped Diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, Switzerland, v. 39, p.41-46, 2013.

PEREIRA, P. F.; SILVA, W. P. D.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Fast and simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim using batch injection analysis with amperometric detection and boron-doped Diamond electrode. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 663-668, 2015.

PLESKOV, Y. V. “Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis”. **J. Anal. Chem.** v.55, p.1045, 2000.

QUINTINO, M. D. S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas**. São Paulo, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2003. Tese de doutorado, 117p.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, New York, v. 16, n.7, p. 513-523, 2004.

SACILOTO, T. R. Desenvolvimento e aplicação de eletrodos compósitos impressos à base de grafite e poliuretana. São Carlos, Instituto de Química de São Carlos – UFSC, 2010. Tese doutorado, 180p.

SALAZAR-BANDA, G. R.; **Estudos da eletroquímica do diamante dopado com boro e da sua superfície modificada com catalisadores para oxidação de metanol e etanol.** São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2006. Tese de doutorado, 191p.

SILVA, A. A.; SILVA, L. A.; MUNOZ, R. A.; OLIVEIRA, A. C.; RICHTER, E. M. Determination of Amlodipine and Atenolol by Batch Injection Analysis with Amperometric Detection on Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, New York, v. 28, n.7, p. 1455-1461, 2016.

SILVA, D. A.F.; MENESES, M. L; KEMPINAS, W.G. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de catecolaminas em órgãos reprodutores de ratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica. **Ecl. Quím**, São Paulo, v.32, p.35-42, 2007.

SILVA, L. A. J. et al. Evaluation of graphite sheets for production of high-quality disposable sensors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 833, p. 560-567, 2019.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SILVA-JUNIOR, R C. da. **Desenvolvimento de um método de análise por injeção em fluxo (FIA) para determinação de dissulfeto de tatrmetiltiuram (Tiram) utilizando reagente imobilizado em reator de fase sólida (RFS).** São José do Rio Preto, UNESP, 2011. Dissertação de Mestrado, 47p.

SKOOG, D. A; WEST, D, M; HOLLER, F. J; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: 8 ed. Editora Thomson, 2006.

SOCHR, J.SVORC, L.; RIEVAJ, M.; BUSTIN, D. "Electrochemical determination of adrenaline in human urine using a boron-doped diamond film electrode". **Diamond & Related Materials**, v. 43, p. 5-11, 2014.

SOUZA, P. H. M. **Estudos eletroquímicos de complexos de Cu (II) de antibióticos da classe das fluorquinolonas.** Belo Horizonte, Departamento de Química - Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. Dissertação de mestrado, 119p.

STEFANO, J. S.; CORDEIRO, D. S.; MARRA, M. C.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. Batch-injection versus Flow-injection Analysis Using Screen-printed Electrodes: Determination of Ciprofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Electroanalysis**, New York, v. 28, n.2, p. 350-357, 2016.

SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V.A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, SAS, ROCHA RC, AVACA LA. Enhanced electrochemical response of boron-doped

diamond electrode brought on by a cathodic surface pre-treatment. 2. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 4021-4026, 2004.

TAVANA, T. KHALILZADEH, M.A. KARIMI-MALEH, H. ENSAFI, A.A. BEITOLLAHI, H. ZAREYEE, D. Sensitive Voltammetric determination of epinephrine in the presence of acetaminophen at a novel ionic liquid modified carbon nanotubes paste electrode, **J. Mol. Liq.** v.68 p.69–74, 2012.

THIAGARAJAN, S.; YANG, R.-F.; CHEN, S.-M. "Palladium nanoparticles modified electrode for the selective detection of catecholamine neurotransmitters in presence of ascorbic acid". **Bioelectrochemistry**, v. 75, n. 2, p. 163-169, 2009.

United States Pharmacopeia - USP 29. Disponível em: <[http://ftp.uspbpep.com/v29240/usp29nf24s0\\_m29530.html](http://ftp.uspbpep.com/v29240/usp29nf24s0_m29530.html)>. Acesso em 28 de julho de 2021.

WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053-1056, 1991.

WANG, L. B., J. HUANG, P. W., H. Z, L. ZHAO, Y. Self-assembly of gold nanoparticles for the voltammetric sensing of epinephrine, **Electrochem. Commun.** v.8 p.1035–1040, 2006.

YOSHIDA, S.; STELLA, V.J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. Ed. Kluwer Academic, New York, 2001.

ZARE, H. R.; NASIRIZADEH, N. Simultaneous determination of ascorbic acid, adrenaline and uric acid at a hematoxylin-multi-wall carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **Sensors Actuators B** 143 p.666–672, 2010.

ZHANG, L; YANG, J; YING, L.; SHANG, J.; JIANG, X.". Simultaneous determination of eleven compounds related to metabolism of bioamines in rat cortex and hippocampus by HPLC-ECD with boron-doped diamond working electrode". **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 118, p.41-51, 2016.