

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

DÉBORA APARECIDA ROCHA MOREIRA

**DETERMINAÇÃO DE COLCHICINA EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS E URINA POR AMPEROMETRIA DE MÚLTIPLOS
PULSOS EM SISTEMA FIA USANDO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO
COM BORO**

**DIAMANTINA – MG
2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

**DETERMINAÇÃO DE COLCHICINA EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS E URINA POR AMPEROMETRIA DE MÚLTIPLOS
PULSOS EM SISTEMA FIA USANDO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO
COM BORO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Química.

Mestranda: Débora Aparecida Rocha Moreira

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

**DIAMANTINA
Julho/2015**

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 - 2618.

M838d Moreira, Débora Aparecida Rocha
 Determinação de Colchicina em Formulações Farmacêuticas e Urina
 por Amperometria de Múltiplos Pulsos em Sistema FIA usando
 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro / Débora Aparecida Rocha
 Moreira. – Diamantina: UFVJM, 2015.
 63 p. : il.

 Orientador: Wallans Torres Pio dos Santos

 Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química) -
 Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal
 dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

 1. Colchicina. 2. Amperometria de Múltiplos Pulsos. 3. Análise por
 Injeção em Fluxo (FIA). 4. Diamante Dopado com Boro. 5. Análises
 farmacêuticas. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do
 Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 543

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**DETERMINAÇÃO DE COLCHICINA EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS E URINA POR AMPEROMETRIA DE MÚLTIPLOS
PULSOS EM SISTEMA FIA USANDO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO
COM BORO**

DÉBORA APARECIDA ROCHA MOREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADO EM 23/ 07/ 2015

Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira - UFVJM

Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva - UFU

Prof. Wallans Torres Pio dos Santos - UFVJM

Presidente

**DIAMANTINA
2015**

*“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de
qualquer jeito”.*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por me manter determinado e perseverante na busca deste sonho.
- Agradeço aos meus familiares, especialmente meus pais Elizabeth, Roberto e minha irmã Thaís por todo amor e incentivo.
- A Annelise e Andressa por todo bom astral de que compartilhamos.
- Aos colegas de laboratório: Tiago, Glauber, Danielle, Fernando, Amanda, Morgana e Priscila pelas experiências e experimentos de que compartilhamos.
- Agradeço ao Prof^o Flavio pela oportunidade de trabalhar em Eletroanalítica.
- Agradeço ao Prof^o Wallans pela orientação, por acreditar em nosso trabalho e ainda por contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal.
- Ao Departamento de Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.
- À banca examinadora, composta pelos professores Dr. Rodrigo Amorin Bezerra da Silva e Dr. Lucas Franco Ferreira por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.
- A banca examinadora, pelas inúmeras contribuições que, sem dúvida, engrandeceram o trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE SIGLAS.....	iii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO.....	vii
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Técnicas Eletroquímicas	2
1.3 Voltametria cíclica.....	3
1.4 Amperometria.....	4
1.4.1 Variação do tempo de aplicação dos pulsos de potencial na MPA	6
1.5 Detecção MPA acoplado ao sistema FIA (FIA-MPA).....	7
1.5.1 A vazão no sistema FIA.....	7
1.5.2 Volume de amostragem.....	8
1.6 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (BDD).....	8
1.6.1 Tratamento na superfície do eletrodo de BDD	9
1.7 Propriedades e métodos para determinação da Colchicina	10
1.7.1 Colchicina.....	10
1.8 Ácido Ascórbico	14
1.9 Ácido Úrico.....	14

1.10 Determinação de AA e AU	15
2.0 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3.0 PARTE EXPERIMENTAL	19
3.1 Reagentes, soluções e amostras.....	19
3.1.1 Preparo da solução amostra de medicamentos	19
3.1.2 Preparo da solução amostra de urina	19
3.2 Instrumentação	20
3.2.2 Célula eletroquímica usada no sistema estacionário e FIA	20
3.3 Eletrodo de trabalho.....	21
3.4 Sistema FIA	22
3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD).	23
3.6 Comportamento eletroquímico do fármaco Colchicina CO	23
3.7 Otimização dos parâmetros de detecção FIA-MPA	24
3.7.1 Estudos da determinação de pulsos de potencial e tempo de aplicação para a detecção de fármacos em sistema FIA	24
3.7.2 Avaliação da resposta eletroquímica em função da vazão e alça de amostragem no sistema FIA	25
3.7.3 Estudos para a determinação do pulso de potencial de aplicação deste para limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho.....	25
3.7.4 Ensaios de repetibilidade e faixa linear de trabalho para o analito.....	25
3.8 Estudos dos limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) e ensaios de adição e recuperação em amostras farmacêuticas	25

3.9 Avaliação da ação de interferentes como ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) na metodologia estudada para a determinação de CO em urina e adição e recuperação em amostras biológicas.....	26
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1- Parte 1: Comportamento eletroquímico da CO	28
4.2- Parte 2: Determinação de CO por FIA-MPA.....	34
4.2.1 Escolha do potencial de oxidação da CO.....	34
4.2.2 Escolha do potencial de redução da CO	36
4.2.3 Escolha do tempo do potencial de oxidação da CO.....	37
4.2.4 Escolha do tempo de aplicação potencial de redução da CO	38
4.2.5 Determinação do pulso de potencial e tempo de aplicação para a limpeza do eletrodo de BDD	39
4.2.6 Otimização da vazão e alça de amostragem do sistema FIA	40
4.3 Estudos de repetibilidade.....	43
4.4 Estudo da faixa linear e limite de detecção (LD)	45
4.5 Validação e determinação da CO em formulações farmacêuticas.....	46
4.6 Avaliação de interferência de ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) para a determinação em urina	48
4.7 Comparação entre parâmetros analítico dos métodos eletroquímicos da literatura e o FIA-MPA.....	51
5.0 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	53
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7.0 ANEXO.....	60

RESUMO

MOREIRA, D. A. R; **Determinação de Colchicina em Formulações Farmacêuticas e Urina por Amperometria de Múltiplos Pulsos em Sistema FIA usando Eletrodo de Diamante Dopado com Boro.** 2015, 63p. Dissertação em Química (Mestrado em Química). Programa de Pós Graduação em Química – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2015.

A colchicina (CO) é um medicamento utilizado no tratamento da artrite gotosa com ação anti-inflamatória. Este medicamento pertence a uma classe de compostos chamados de baixo índice terapêutico, cuja dose tóxica é muito próxima da dose terapêutica. Assim, a determinação de CO em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos é de maior importância para o controle de qualidade nos estudos farmacêuticos e farmacológicos na condução da eliminação da droga. Neste contexto, o presente trabalho apresenta métodos simples, rápidos e de baixos custos para determinação de CO em formulações farmacêuticas e urina por amperometria de múltiplos pulsos (MPA) com análise de injeção em fluxo, sistema (FIA), usando eletrodo de diamante dopado com boro (BDD). O estudo foi realizado em diferentes eletrólitos, Britton-Robinson de pH que variou de 2 a 12, solução de hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, ambos na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As melhores condições para o eletrólito de suporte foi em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em que a CO apresentou processos de oxidação em 1,20 e 1,41 V e uma redução de detecção em -0,9 V. MPA foi baseado na aplicação potencial dos dois impulsos de: (1) para a oxidação de CO e (2) para a redução do produto gerado, o qual foi utilizado para a determinação das amostras de fármacos. Assim, no sistema FIA-MPA foram aplicados pulsos potenciais de 1,7 V / 500 ms e -1,1V / 30 ms. Os demais parâmetros foram otimizados como: taxa de fluxo e volume da amostra em $4,5 \text{ mL min}^{-1}$ e $330 \text{ }\mu\text{L}$, respectivamente. Sob estas condições, foi obtida duas faixas lineares de $0,1$ à $2,0 \text{ }\mu\text{ mol L}^{-1}$ e 20×10^{-5} a $500 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com coeficiente de correlação linear de 0,992 e 0,998, respectivamente. O limite de detecção obtido foi de $2,14 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para o CO. O desvio padrão relativo de injeções consecutivas de 10 respostas sobre a concentração de CO de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi de 1,28% em -1.1 V. O sistema foi validado em comparação com o método oficial (HPLC / UV). Os resultados das recuperações obtidas por meio do método proposto para ambas as amostras foram próximo a 100%. Portanto, o método proposto por FIA-MPA utilizando eletrodo BDD pode ser aplicado com sucesso para a determinação de CO em amostras de urina e farmacêuticas, com vantagens em relação ao método oficial e outros métodos descritos na literatura.

Palavras-chave: Colchicina, Amperometria de Múltiplos Pulsos, Análise por Injeção em Fluxo (FIA), Diamante Dopado com Boro, Análises farmacêuticas.

ABSTRACT

MOREIRA, D. A. R; **Determination of Colchicine in Pharmaceutical Formulations and Urine by Multiple-Pulse Amperometric in FIA system using Boron-Doped Diamond Electrode.** 2015, 63p. Dissertação em Química (Mestrado em Química). Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2015.

The Colchicine (CO) is a drug used in treatment of gouty arthritis with anti-inflammatory action. This medication belongs to a class of compounds called low therapeutic index, whose toxic dose is much close to the therapeutic dose. Thus, the determination of CO in pharmaceutical formulations and in biological fluids is of the utmost importance for the quality control in pharmaceutical and pharmacological studies in conducting the elimination of the drug. In this context, the present work presents simple, fast and low-cost methods for determination of CO in pharmaceutical formulations and urine by multiple-pulse amperometric (MPA) with flow-injection analysis (FIA) system using boron-doped diamond (BDD) electrode. Study was carried out in different electrolytes, Britton-Robinson buffer pH ranging from 2 to 12, sodium hydroxide solution and sulfuric acid, both at a concentration of 0.1 mol L^{-1} . The best conditions for the support electrolyte was sulfuric acid 0.1 mol L^{-1} , where the CO showed oxidation processes at 1.20 and 1.41 V and one of reduction at -0.9 V. MPA detection was based on the potential application of two pulses: (1) for oxidation of CO and (2) for reduction in the generated product, which was used for the determination of the drug in the samples. Thus, in the FIA-MPA system were applied potential pulses of $1.7 \text{ V} / 500\text{ms}$ and $-1.1\text{V} / 30\text{ms}$. The other parameters were optimized as: flow rate and sample volume in 4.5 mL min^{-1} and $330 \text{ }\mu\text{L}$, respectively. Under these conditions, it was achieved two linear ranges of 0.1 to $2.0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ and of 20 to $500 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ with great linear correlation coefficient for both ranges 0.992 and 0.998 respectively. The limit of detection obtained was of $2.14 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ for CO. Relative standard deviation of injections of 10 consecutive responses on CO concentration of $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ was 1.28% at -1.1 V . The system was validated in comparison with the official method (HPLC / UV). The results of the recoveries obtained through the proposed method for both samples are around 100% . Therefore, the method proposed by FIA-MPA using BDD electrode can be successfully applied for the determination of CO in pharmaceutical and urine samples, with advantages in relationship official method and others methods described in the literature.

Keywords: Colchicine, Multiple-Pulse Amperometry, Flow Injection Analysis (FIA), Boron-Doped Diamond Electrode, Pharmaceutical analysis.

LISTA DE SIGLAS

AA	Ácido Ascórbico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AU	Ácido Úrico
CO	Colchicina
BDD	Diamante Dopado com Boro
DPR	Desvio Padrão Relativo
E	Potencial
ET	Eletrodo de Trabalho
FIA	Análise por Injeção em Fluxo
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
I_c	Corrente Capacitiva
I_F	Corrente faradaica
I_p	Corrente de pico
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MPA	Amperometria de Múltiplos Pulsos
UV	Ultravioleta
VC	Voltametria Cíclica

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Representação esquemática de um experimento de Voltametria Cíclica.	4
FIGURA 2: Imagem do funcionamento do software GPES, na detecção MPA em FIA de três injeções consecutivas de soluções de CO.	6
FIGURA 3: Estrutura Química do fármaco Colchicina.	10
FIGURA 4: Fórmula Estrutural do Ácido Ascórbico.	14
FIGURA 5: Estrutura Química do Ácido Úrico.	15
FIGURA 6: Mecanismo do processo de oxidação do Ácido Ascórbico.	16
FIGURA 7: Mecanismo do processo de oxidação do Ácido Úrico.	17
FIGURA 8: Potencistato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT 128N.	20
FIGURA 9: Célula do tipo “ <i>wall jet</i> ” usada no sistema FIA.	21
FIGURA 10: Esquema ilustrativo do sistema FIA de linha única utilizada no trabalho.	22
FIGURA 11 – Foto do cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) usado nas análises cromatográficas para comparação da metodologia.	23
FIGURA 12: Voltamogramas cíclicos do eletrólito H_2SO_4 $0,1\text{mol L}^{-1}$ (-), com adição da CO $1,0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ sem tratamento do eletrodo de BDD (-), após o tratamento anódico (-) e após tratamento catódico (-).	29
FIGURA 13: Estudo da dependência do processo eletroquímico; (A) Varredura de potencial de -1,0 a 2,2 V, H_2SO_4 $0,1 \text{mol L}^{-1}$ (-), adição da CO $1,0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ (-), (B) Varredura de potencial de -1,0 a 1,0 V H_2SO_4 $0,1 \text{mol L}^{-1}$ (-) e adição da CO $1,0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ (-).	30
FIGURA 14: Mecanismo de oxidação do fármaco Colchicina.	31
FIGURA 15: Relação do potencial do pico de redução em função dos valores de pH (A); Voltamogramas cíclicos da CO em soluções com diferentes valores de pHs: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 (B).	31
FIGURA 16: Voltamogramas cíclicos referente às velocidades de varredura 60, 70, 80, 90, 100, 150 e 200 mV s^{-1} para o fármaco CO em H_2SO_4 $0,1 \text{mol L}^{-1}$.	32
FIGURA 17: Relação entre as correntes de picos anódicos (A), (B); e catódico (C) com a velocidade de varredura para o intervalo de 60-100 mV s^{-1} em todos os processos.	33

- FIGURA 18:** Voltamogramas cíclicos do eletrólito H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sob eletrodo de BDD (-) com adição das espécies: CO $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (-), AA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (-) e AU $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (-). **34**
- FIGURA 19:** Sinal da corrente de pico de oxidação da CO em função da variação do potencial de oxidação (gerador). **35**
- FIGURA 20:** Sinal da corrente de redução da CO em função da variação do pulso de potencial de redução, aplicando o pulso de potencial gerador fixo em $+1,7 \text{ V}$. **36**
- FIGURA 21:** Sinal da corrente de redução da CO em $-1,1 \text{ V}/100 \text{ ms}$ em função do tempo da aplicação do potencial gerador em $1,7 \text{ V}$. **37**
- FIGURA 22:** Sinal da corrente de redução da CO em $-1,1 \text{ V}$ em função do tempo de aplicação deste potencial com aplicação do potencial gerador fixo em $1,7 \text{ V}$ por 500 ms . **38**
- FIGURA 23:** Sinal da corrente de redução da CO em $-1,1 \text{ V}/30\text{ms}$ em função do volume de amostra injetado no sistema FIA. Pulso de potencial gerador em $1,7 \text{ V}$ por 500 ms . **41**
- FIGURA 24:** Sinal da corrente de redução da CO em $-1,1 \text{ V}/30 \text{ ms}$ em função da vazão do sistema FIA. Pulso de potencial gerador em $1,7 \text{ V}$ por 500 ms e alça de amostragem de $330 \mu\text{L}$. **42**
- FIGURA 25:** Amperogramas obtido pela detecção de FIA-MPA em (A) de 10 injeções consecutivas de CO $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e em (B) 15 injeções de CO nas concentrações $1,0 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. **44**
- FIGURA 26:** FIAgrama obtido pela detecção MPA em FIA de soluções padrão de CO nas concentrações: $0,1$ (a), $0,2$ (b), $0,5$ (c), $1,0$ (d) e $2,0 \mu \text{ mol L}^{-1}$ (e). A curva de calibração é exibida ao lado. **45**
- FIGURA 27:** FIAgrama obtido pela detecção MPA em FIA de solução padrão de CO nas concentrações: $25,0$ (a), $50,0$ (b), $100,0$ (c), $200,0$ (d) e $500,0 \mu \text{ mol L}^{-1}$ (e). A curva de calibração é exibida ao lado. **46**
- FIGURA 28:** Amperogramas obtidos pela detecção MPA em (-) $1,7 \text{ V}/500\text{ms}$; (-) $-1,1 \text{ V}/30\text{ms}$ de injeções em duplicata das soluções contendo apenas CO, apenas AA, apenas AU e aos três juntos, sendo todos na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. **49**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Propriedades Físico-químicas da Colchicina.	11
TABELA 2: Propriedades Físico-químicas do Ácido Ascórbico.	14
TABELA 3: Propriedades Físico-químicas do Ácido Úrico.	15
TABELA 4: DPR de 10 injeções sequenciais de CO 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em função da corrente gerada em -1,1 V/30ms com aplicação ou não de um pulso de potencial de limpeza do BDD.	40
TABELA 5: Parâmetros otimizados para a detecção de CO em amostras farmacêuticas e urina através da detecção MPA em FIA.	43
TABELA 6: Resultados dos estudos de adição e recuperação na amostra farmacêutica de CO.	47
TABELA 7: Doseamento da CO em formulação farmacêutica por FIA-MPA e HPLC-UV.	47
TABELA 8: Comparação estatística, por meio dos testes <i>F</i> e <i>t</i> dos resultados de teor da Colchicina 0,5 mg obtidos pelos métodos FIA-MPA e HPLC-UV.	48
TABELA 9: Estudo da interferência de AA no sinal de CO a 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pelo método FIA-MPA.	49
TABELA 10: Estudo da interferência de AU no sinal de CO em -1,1V/30ms pelo método FIA-MPA.	50
TABELA 11: Estudos de adição e recuperação em amostra de urina (n=3).	51
TABELA 12: Comparação dos parâmetros analíticos obtidos pelo método proposto e outros métodos eletroanalíticos descrito na literatura para a determinação de CO.	51

TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO

1. Moreira, D. A. R.; Luz, R. C. S.; Damos, F. S. **Investigação da viabilidade da determinação simultânea de L-Dopa e Benserazida em formulações farmacêuticas explorando o grafeno.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas/MG, 2014.
2. Moreira, D. A. R.; Andrade, G. A. R.; Lima, A. B.; Santos, W. T. P.; Guedes, T. J. **Determinação de Colchicina por Amperometria Pulsada em Fluxo usando eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas/MG, 2014.
3. Andrade, G. A. R.; Moreira, D. A. R.; Guedes, T. J.; Lima, A. B.; Santos, W. T. P. **Determinação simples e rápida de Teofilina utilizando Análise por Injeção em Batelada com Detecção Amperométrica Pulsada.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas/MG, 2014.
4. Moreira, D. A. R.; Guedes, T. J.; Andrade, G. A. R.; ALECRIM, M. F.; LIMA, A. B.; Dos Santos, W. T. P. **Determinação de Colchicina em Urina por Amperometria de Múltiplos Pulsos em Sistema FIA usando eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma Oral no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBE, Uberlândia/MG, 2015.
5. Andrade, G. A. R.; Guedes, T. J.; Moreira, D. A. R.; LIMA, A. B.; ALECRIM, M. F.; Dos Santos, W. T. P. **Determinação da Clindamicina em formulações farmacêuticas por Análise em Injeção em Batelada com detecção Amperométrica pulsada usando eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBE, Uberlândia/MG, 2015.

6. Alecrim, M. F.; Guedes, T. J.; Lima, A. B.; Andrade, G. A. R.; Moreira, D. A. R.; Mendonça, V. A.; Neves, C. D. C.; Lacerda, A. C.; Dos Santos, W. T. P. **Determinação simples e rápida de Cotinina por amperometria de Múltiplos Pulsos em FIA utilizando eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBE, Uberlândia/MG, 2015.

7. Guedes, T. J.; Moreira, D. A. R.; Lima, A. B.; Alecrim, M. F.; Guedes.; Andrade, G. A. R.; Dos Santos, W. T. P. **Determinação de Prazosina em amostras farmacêuticas por Amperometria de Múltiplos Pulsos em FIA utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBE, Uberlândia/MG, 2015.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A colchicina é um agente anti-inflamatório e tem uso terapêutico no tratamento de artrite gotosa aguda. Este fármaco faz parte do grupo de medicamentos de baixo índice terapêutico, cuja dose terapêutica é próxima da dose tóxica (LEUNG; HUI; KRAUS, 2015; HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2003; BODOKI; VLASE; SĂNDULESCU, 2015), apresentando alguns efeitos colaterais mesmo em concentrações baixas, como sérios problemas gastrointestinais (DEFTEREOS *et al.*, 2013), onde doses maiores apresentam insuficiência hepatocelular, disfunção do sistema nervoso central, entre outros problemas (WALLACE, 1974).

Este fármaco é rapidamente absorvido após administração oral e, posteriormente, é metabolizado no organismo, sendo a maior parte excretada nas fezes e cerca de 10 a 20% na urina, na sua forma não metabolizada (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2003). Os estudos farmacológicos do CO apresentam importância clínica significativa, uma vez que pode auxiliar no diagnóstico de disfunções no organismo, possibilitando o monitoramento da quantidade do fármaco excretado e controlando indícios de intoxicação.

Nas indústrias farmacêuticas as análises qualitativas e quantitativas de fármacos em medicamentos são de fundamental importância para o controle de qualidade, para que os mesmos possam ser liberados com confiabilidade, garantindo segurança para o consumidor, principalmente, quando se trata de no caso dos medicamentos de baixo índice terapêutico. Além disso, as falsificações e adulterações em formulações farmacêuticas são frequentemente relatadas, aumentando a importância deste processo (JUNIOR, 2012).

As técnicas cromatográficas são as mais empregadas para a quantificação de fármacos, isso pode ser justificado devido à alta robustez destes métodos, garantido um eficiente controle de qualidade dos medicamentos. No entanto, estes métodos possuem algumas desvantagens como: alto custo de aquisição do equipamento e da realização das análises; baixa frequência analítica; grande geração de resíduos orgânicos. Com isso a investigação de novos métodos analíticos mais simples, rápidos e de baixo custo é de grande interesse para as indústrias farmacêuticas e, principalmente no caso dos medicamentos de baixo índice terapêutico, para as farmácias de manipulação. Isso porque a maioria das empresas do setor de manipulação não se interessa atualmente em trabalhar com essa classe de fármacos devido às dificuldades para realizar as análises desses compostos e ao alto custo dos métodos analíticos

adotados pelas Farmacopeias vigentes. Uma vez que, a maior parte dos métodos oficiais empregados para essa classe de medicamentos utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção ultravioleta (UV) para quantificação dos princípios ativos, mesmo tendo somente uma única substância farmacologicamente ativa, na formulação (ANVISA, 2010)

Neste contexto, os métodos eletroanalíticos são promissores para aplicação no controle de qualidade de medicamentos com fármacos eletroativos, os quais apresentam boa sensibilidade e seletividade, baixo custo, rapidez e simplicidade de aplicação quando comparado aos métodos oficiais. Uma das técnicas eletroanalíticas que vem sendo bastante utilizadas são as detecções amperométricas de múltiplos pulsos (MPA, da sigla em inglês, Multiple Pulse Amperometry) acoplada a sistema de análise por injeção em fluxo (FIA, da sigla em inglês, Flow Injection Analysis). Esse modo de detecção em fluxo pode proporcionar análises com menores limites de detecção e maiores reprodutibilidade e frequência analítica, sem grande geração de resíduos quando comparado aos modos estacionários de detecção eletroquímica (ARRIBAS, 2013; DORNELLAS; MUNOZ; AUCELIO, 2015; QUINTINO; ANGNES, 2004; QUINTINO; ANGNES, 2006).

Outra questão importante nos métodos eletroanalíticos é a escolha do eletrodo de trabalho para detecção do analito, uma vez que este eletrodo precisa apresentar alta estabilidade, além de sensibilidade e seletividade suficiente para quantificação do composto na amostra desejada. Nesse sentido, o eletrodo de filme de diamante dopado com boro (BDD, da sigla em inglês Boron-Doped Diamond) atende as características supracitadas para aplicação em amostras farmacêuticas (KUZMANOVIC *et al.*, 2015).

Deste modo, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento de um novo método eletroanalítico para a determinação da CO em formulações farmacêuticas e urina por meio da detecção MPA acoplada ao sistema FIA, usando o eletrodo de BDD. A fundamentação teórica sobre as técnicas eletroquímicas utilizadas, o eletrodo de BDD e os sistemas em fluxo que foram utilizados neste trabalho serão abordados a seguir, bem como a uma revisão bibliográfica sobre as características e métodos para determinação da CO e possíveis interferentes na análise.

1.2 Técnicas Eletroquímicas

As técnicas eletroanalíticas tiveram estudos iniciais no final do século XIII e vem se destacando na área da química analítica. Isso se deve as várias vantagens frente a outros

métodos de análises, como alta sensibilidade, precisão, exatidão, baixos limites de detecção e quantificação e baixos custos de análises (CARREIRA, 2008; DE MIRANDA *et al.*, 2012).

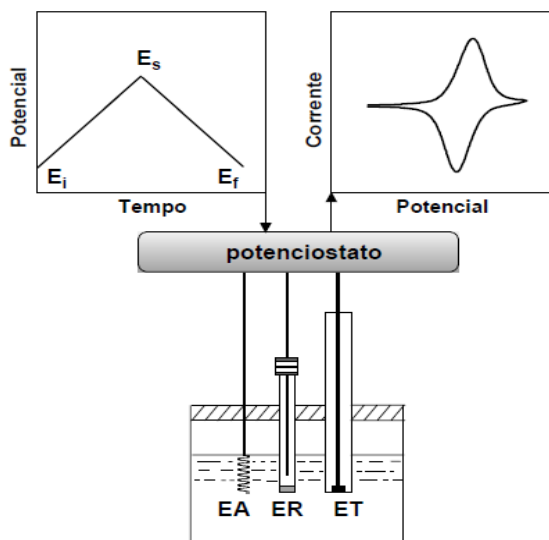
A eletroanalítica consiste em métodos analíticos quantitativos e qualitativos, baseados em reações químicas que ocorrem em uma célula eletroquímica, a qual transforma a reação química em sinal elétrico (WANG, 2006). Com os avanços da eletroanalítica após os anos 80, muitos estudos foram realizados, sendo hoje uma área da química com grande aplicação, podendo ser utilizada em análises ambientais (YU; LIU; HUANG, 2014) e farmacêuticas (ZHANG *et al.*, 2008; TERADAL, *et al.*, 2014), além de outras. Existe uma diversidade de técnicas eletroquímicas, sendo a voltametria e amperometria as mais utilizadas atualmente para análises de fármacos.

1.3 Voltametria cíclica

A Voltametria Cíclica (VC) é uma técnica bastante conhecida e atualmente usada apenas para conhecer o comportamento eletroquímico dos compostos, permitindo também a investigação mais detalhada dos processos que ocorrem na interface do eletrodo de trabalho (QUINTINO, 2003; MASEK; CHRZESCIJANSKA; ZABORSKI, 2014). O sistema convencional utilizado consiste em uma célula eletroquímica composta por um sistema de três eletrodos: um eletrodo de trabalho (ET), um de referência (ER) e um auxiliar (EA), imersos em uma solução mantida em condições estacionárias, como é mostrado na Figura 1. O eletrodo mais importante, onde ocorrem às reações de interesse, é o de trabalho e pode ser composto por diferentes materiais, tais como carbono, ouro, cobre, platina, prata, níquel, paládio, entre outros. (QUINTINO, 2003; FENG, *et al.*, 2015, SKOOG, 2002).

No sistema básico, o potencial é linearmente variado com o tempo, partindo de um valor inicial, até atingir um potencial final. Neste ponto a varredura é invertida até atingir o potencial inicial. O resultado é um registro de corrente em função do potencial aplicado, comumente denominado voltamograma cíclico. No perfil voltamétrico corrente-potencial, os processos de oxidação e redução ocorrendo no eletrodo de trabalho são representados por corrente de pico anódico e catódico, tendo um perfil demonstrado na Figura 1 (QUINTINO, 2003):

FIGURA 1: Representação esquemática de um experimento de Voltametria Cíclica. E_i : potencial inicial; E_s : potencial de inversão; E_f : potencial final; ET: eletrodo de trabalho; ER: eletrodo de referência; EA: eletrodo auxiliar. QUINTINO (2003).



1.4 Amperometria

Nos últimos anos vem se destacando a utilização das técnicas eletroanalíticas, sendo mais sensíveis para quantificação dos analitos, tais como voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial e amperometria, sendo estas complementares a voltametria cíclica. Dentre estas, as amperométricas são as mais utilizadas em sistema em fluxo. Esta técnica permite que a resposta do eletrodo apresente estabilidade por um período de tempo maior, devido à constante limpeza eletroquímica realizada durante a análise, diminuindo assim a contaminação ou passivação da superfície do eletrodo (GIMENES *et al.*, 2012). Nesses sistemas são utilizados também células com três eletrodos, onde normalmente estas células são configuradas no modo “*wall Jet*”, que tem o jato da solução entrando em contato frjujuioop09ontal com a superfície do eletrodo de trabalho.

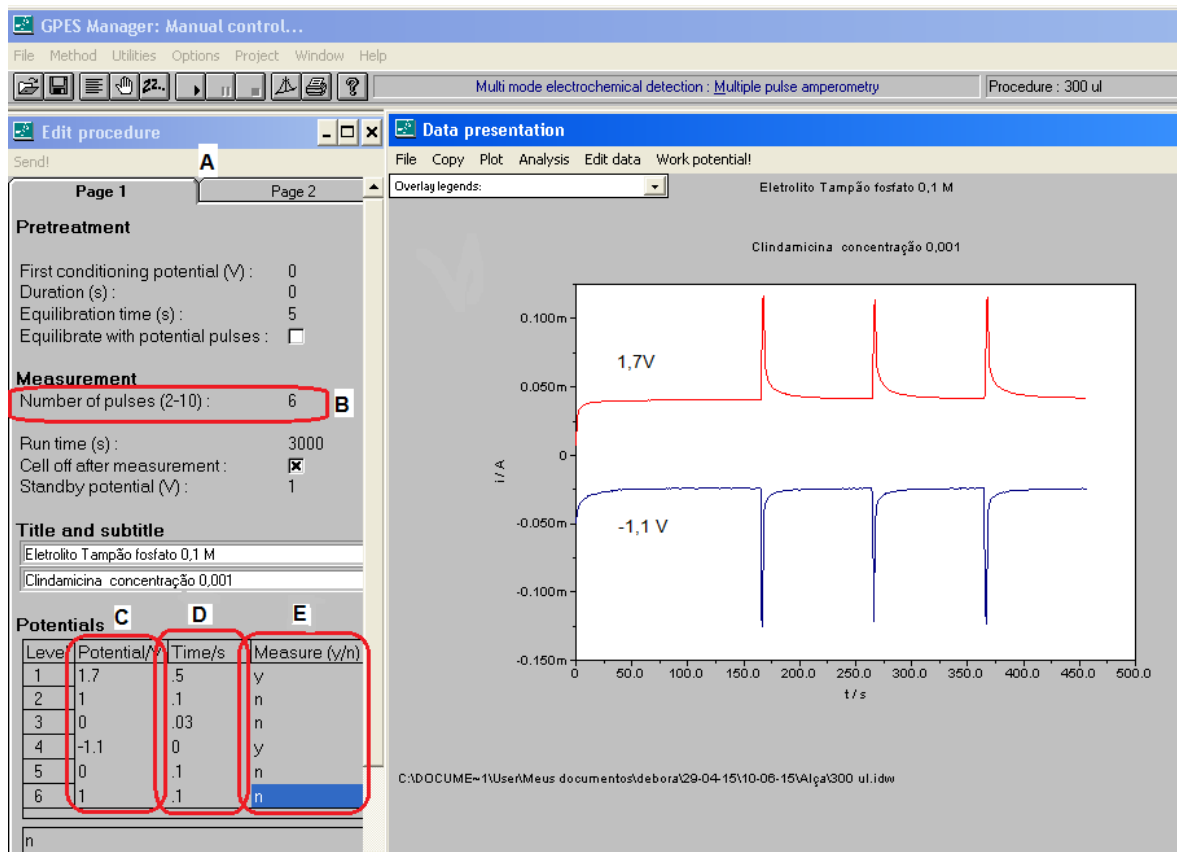
Uma das limitações encontrada na detecção amperométrica convencional é a estabilidade do sinal eletroquímico. Esta estabilidade está relacionada com a taxa de transferência de cargas (elétrons) entre o eletrodo e a espécie eletroativa, porém durante a reação eletroquímica pode ocorrer adsorção de espécies à superfície do eletrodo ou também a passivação gradativa da superfície do eletrodo, o que proporciona a contaminação do mesmo, interferindo na estabilidade do sinal (DOS SANTOS, *et al.*, 2011).

Para contornar este problema, várias alternativas são propostas, dentre elas a escolha do eletrodo de trabalho adequado para ser utilizado com o analito de interesse; realização de

limpeza do eletrodo de trabalho antes das análises ou também a realização de limpeza eletroquímica durante as análises pela aplicação de outro potencial no eletrodo (amperometria pulsada) (CHAILAPAKUL; SIANGPROH; TRYK, 2006). Na amperometria de múltiplos pulsos (MPA) são aplicados vários pulsos sobre um mesmo eletrodo de trabalho, que além de contornar as limitações encontradas na amperometria convencional, pode monitorar mais de um sinal amperométrico referente aos processos eletroquímicos do analito, permitindo uma análise mais seletiva em amostras complexas, como as de fluidos biológicos (GIMENES *et al.*, 2009).

Na Figura 2 é possível visualizar o funcionamento do software GPES na detecção MPA de uma solução do fármaco CO. Ao analisarmos a figura podemos observar do lado esquerdo a existência de uma barra de funções (A), onde é possível selecionar alguns parâmetros. Em (B) é possível selecionar o número de potenciais a serem aplicados, podendo ser de 2 a 10 pulsos, sendo cada um destes aplicados de forma independente (C) e por tempo variáveis (D), sendo o menor tempo de 30 ms, limitação inferior imposta pelo software desta empresa a este parâmetro. Observe-se, ainda, que todos os potenciais podem ser monitorados (E), uma vez que basta selecionar a opção de (y) para ver o sinal amperométrico ou a opção (n) quando não se deseja monitorar a resposta eletroquímica. Os dados referentes aos pulsos de potencial que foram selecionados em (y) são exibidos na forma de um amperograma (gráfico apresentado na Figura de corrente vs tempo). Do lado direito da figura podem ser observados estes amperogramas obtidos quando os 6 (seis) pulsos de potencial diferentes são aplicados, sendo apenas 2,0 (dois) deles selecionados para leitura da corrente. Os demais pulsos de potencial (não monitorados) foram aplicados para diminuir a corrente capacitiva gerada quando se tem grandes variações de potenciais na detecção MPA. Os amperogramas da MPA em FIA mostram a detecção de três injeções consecutivas de soluções de CO na concentração $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, apresentando corrente de processos de oxidação em 1,7 V e de redução em -1,1 V. O detalhamento maior destas respostas será apresentado nos item de resultados e discussão deste trabalho.

FIGURA 2: Imagem do funcionamento do software GPES, na detecção MPA em FIA de três injeções consecutivas de solução de CO de concentração $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. (A) Barra de funções, (B) número de pulsos de potencial aplicados, (C) escolha de cada pulso de potencial, (D) tempo de aplicação de cada pulso e (E) opção de monitoramento dos amperogramas.



1.4.1 Variação do tempo de aplicação dos pulsos de potencial na MPA

A escolha do tempo de duração do pulso de potencial é um parâmetro muito importante na detecção MPA e varia em torno de 30 a 500 ms, sendo a corrente coletada nos últimos 5 ms. Para a detecção, normalmente, é utilizado tempos menores de 30 a 100 ms para aplicação dos pulsos de potencial, uma vez que geram sinais de correntes maiores. Apesar da corrente capacitiva (I_C) decair mais rapidamente do que a corrente faradaica (I_F), em sistemas em fluxo a I_C está sendo monitorada na linha de base do amperograma e é constante antes, durante e após a passagem do analito no eletrodo. Enquanto a I_F é maior quanto menor for o tempo de duração do pulso de potencial. Cabe ressaltar que, essa diferença não seria observada se a vazão fosse suficiente para repor as espécies na superfície do eletrodo em qualquer tempo aplicado. Quando se tem o interesse de aplicar um potencial de limpeza no

eletrodo, tempos maiores são utilizados, em torno de 100 a 500 ms, para eliminar algumas espécies que ainda não foram oxidadas ou reduzidas ou mesmo para reativar a superfície do eletrodo de trabalho

Outra possibilidade de otimização do tempo de aplicação dos pulsos de potencial na MPA é quando o analito possui processos de oxidação e redução reversíveis ou quase-reversíveis. Nesse caso, geralmente aplica-se um tempo maior para o potencial gerador, assim, mais espécies são geradas e o sinal de corrente é aumentado no potencial coletor. Já para o potencial coletor é aplicado um tempo menor como discutido anteriormente.

1.5 Detecção MPA acoplado ao sistema FIA (FIA-MPA)

O sistema FIA é muito utilizado em análises químicas devido às inúmeras vantagens como: uso de instrumentação automatizada e versátil, menor exposição do analista, baixo custo e alta frequência analítica (GIMENES *et al.*, 2010; TROJANOWICZ; SZEWCZYNSKAS; WCISLO, 2003). O primeiro trabalho utilizando o sistema FIA foi publicado no ano de 1975 por RUZICKA & HANSEN, no qual os autores propuseram uma nova metodologia em análises químicas em fluxo (RUZICKA; HANSEN, 1975). Nestes trabalhos o sistema FIA utilizado foi acoplado a um detector UV, e depois novos trabalhos utilizando o FIA com outros detectores foram publicados como: absorção atômica (OLIVEIRA *et al.*, 2014; HESSE; RISTAU; EINAX, 2015), potenciometria (MROCKIEWIEZ, 2012), voltametria (BODOKI *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008; ZHANG, 2006), Fluorescência (ACOSTA *et al.*, 2014; MAGHRABEY *et al.*, 2015), amperometria (GIMENES *et al.*, 2010; DOS SANTOS, *et al.*, 2011; SILVIA, 2011), quimiluminescência (BIPARVA; ABEDIRAD; KAZEMI, 2014; LUI *et al.*, 2013), entre outros. Além das vantagens apresentadas, quando o sistema FIA é acoplado à detecção eletroquímica, o fluxo contínuo da solução pela superfície do eletrodo proporciona uma menor contaminação do sensor, aumentando a reprodutibilidade das análises. Dois parâmetros no sistema FIA são importantes para detecção eletroquímica, a alça de amostragem e a vazão do sistema, os quais serão abordados abaixo.

1.5.1 A vazão no sistema FIA

Um dos parâmetros importantes a ser otimizados no sistema FIA é a vazão. O aumento da vazão no sistema FIA também aumenta o sinal analítico, a corrente faradaica (I_F). Esse efeito se deve ao efeito de dispersão, o qual é diminuído em altas vazões, outro fator também pode ser a diminuição da espessura da camada de difusão de Nernst. Com isso, há um

aumento de transferência de massa das espécies do analito num mesmo intervalo de tempo, gerando maior transferência de carga e aumento da corrente.

Em altas vazões pode haver uma queda da I_F , pois as espécies podem ser carregadas da superfície do eletrodo antes do sinal ser coletado pelo equipamento. Outro fator importante da vazão no sistema FIA é quando o composto eletroativo de interesse possui comportamentos redox reversível ou quase-reversível. Nesse caso, se a detecção do analito for pelo potencial coletor, a vazão deve ser otimizada, pois em vazões lentas mais espécies são geradas e maior será a corrente no potencial coletor, porém em vazões altas o aumento do sinal do potencial gerador pode provocar também um aumento de espécies geradas.

1.5.2 Volume de amostragem

O volume de amostragem é determinado pela otimização da alça no sistema FIA, sendo que estas variações de volumes estão normalmente entre 50 a 500 μL .

No sistema FIA com detecção eletroquímica, em geral, utilizamos a altura do pico como sinal analítico, assim, quanto maior o volume de amostragem maior é o sinal analítico obtido. Este aumento tem um limite quando a dispersão do centro da alça de amostragem não é afetada pelo sistema FIA. Cabe ainda mencionar que, a otimização da vazão e da alça deve manter o sinal transiente do analito, ou seja, o pico apresentado no amperograma deve ter no mínimo 20 pontos de aquisição de corrente, caso contrário pode haver distorções dos sinais e conseqüentemente uma baixa reprodutibilidade dos resultados.

1.6 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (BDD)

O destaque do carbono como sensor eletroquímico está relacionado na sua capacidade de formar uma imensa diversidade de compostos químicos, desde o mais simples até os mais surpreendentes complexos, com diferentes formas de hibridizações, sp^1 , sp^2 e sp^3 , levando a uma grande variedade de alótropos de carbono, materiais que apresentam alto desempenho podendo ser utilizado para inúmeras funcionalidades (MCMURRY, 2005; ENYASHIN; IVANOVSKLL, 2014). O carbono é representado em duas formas principais: grafite e diamante. O grafite é um dos materiais mais conhecidos, possui pouco brilho metálico, excelente condutividade elétrica (DRESSELHAUS, 1997). Já o diamante é constituído por ligações simples, tipo sp^3 , o qual tem atraído atenção para as diversas áreas tecnológicas, devido suas características únicas como: elevada dureza, alta condutividade térmica e inércia química (PLESKOV, 2002).

O uso do diamante em eletroquímica é muito recente, sendo o primeiro artigo publicado em 1983 por IWAKI e colaboradores (1983), depois disso teve a colaboração importante de PLESKOV e colaboradores (1987), onde foram iniciados os estudos do diamante utilizado como sensor eletroquímico. No entanto, para ser usado como sensor eletroquímico um filme de diamante necessita passar por um processo de dopagem e isso o torna um bom condutor, apresentando características favoráveis para serem utilizados como eletrodos. Lembrando que a dopagem pode ser realizada com vários agentes, como o lítio, nitrogênio, fósforo, enxofre e boro, sendo este último o mais utilizado (PLESKOV, 2000).

Assim, o diamante que é altamente estável e excelente isolante, quando acoplado ao boro, torna-se um ótimo semicondutor, dependendo da concentração de boro no processo de dopagem (PREECHAWORAPUN, *et al.*, 2006). Devido estas características, o eletrodo de diamante dopado com boro tem sido muito utilizado em eletroquímica, sendo um material comercial usado em eletroanálises por apresentar disponibilidade comercial favorável e propriedades eletroquímicas vantajosas, (BRYCHT, *et al.*; 2015) tais como: alta estabilidade e dureza, baixa e estável corrente de fundo, ampla janela de potencial (STANKOVIC, KALCER, 2015), dureza elevada, inércia química e alta condutividade térmica (GIMENES, *et al.*, 2015).

1.6.1 Tratamento na superfície do eletrodo de BDD

A superfície do eletrodo de diamante dopado com boro pode passar por processos de tratamentos, sendo relatado por alguns autores algumas melhoras significativas durante as análises. Segundo GIRARD, *et al.*, 2007, o pré-condicionamento da superfície do eletrodo pode ser realizado por tratamento em solução ácida, ocorrendo uma polarização anódica ou catódica da superfície do eletrodo de BDD. Esse tratamento torna a superfície do eletrodo terminada com hidrogênio na polarização catódica e com oxigênio na anódica, na literatura é relatado trabalhos que realizou esses tratamentos e obteve resultados satisfatórios (SUFFREDINI, *et al.*, 2004; SIMON, *et al.*, 2005). As superfícies terminadas em hidrogênio são hidrofóbicas, apresentando afinidade com moléculas mais apolares. Já as superfícies terminadas com oxigênio são hidrofílicas, apresentando afinidade com moléculas mais polares (GRANGER; SWAIN, 1999; YAGI, 1999; IVANDINI, *et al.*, 2006).

Existem várias formas de tratamento do eletrodo de BDD publicadas na literatura. Os primeiros trabalhos aplicavam altos valores de potencial como +3,0 V por 30 min e depois - 3,0 V por 30 min para tratamento catódico, que no caso deixava a superfície com hidrogênio (tratamento catódico) (SUFFREDINI *et al.*, 2004). No entanto, após um tempo este

tratamento pode causar degradação da superfície do eletrodo de BDD. Recentemente, Salazar-Banda e colaboradores 2010, demonstraram que o ideal para ativar eletroquimicamente o eletrodo de BDD, sem promover nenhuma degradação física em sua superfície, seria aplicar -9 C cm^{-2} para terminar a superfície do eletrodo com tratamento catódico e pela aplicação de $+5 \text{ C cm}^{-2}$ para terminar a superfície do eletrodo com tratamento anódico. Para a realização destes tratamentos deve-se utilizar solução aquosa de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (SALAZAR-BANDA, *et al.*, 2010).

1.7 Propriedades e métodos para determinação da Colchicina

1.7.1 Colchicina

A Colchicina (CO) é um alcalóide originada de uma espécie de planta chamada de *Colchicum autumnale*. A estrutura química da CO é representada na Figura 3, embora sua ação tóxica fosse conhecida, a utilização dessa planta para alívio de dor articular só começou no século VI d.C, mas a CO foi isolado do cólquico apenas em 1820 (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2003). As propriedades físico-químicas deste composto são apresentadas na Tabela 1.

FIGURA 3: Estrutura Química do fármaco Colchicina.

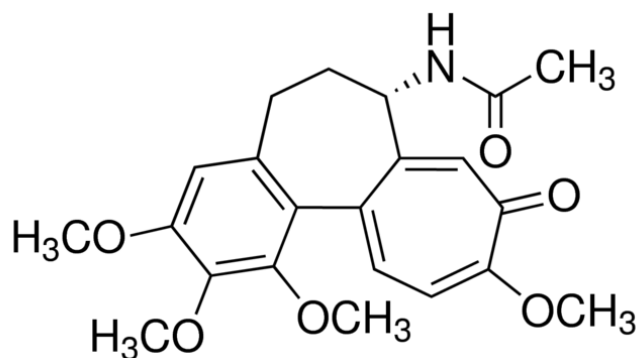


TABELA 1: Propriedades Físico-químicas da Colchicina (sigmaaldrich, 2015).

Fórmula Molecular	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆
Massa Molar	399,44 g/mol
Ponto de Fusão	150,00 a 160,00 °C
Solubilidade	Facilmente dissolvido em água
pKa	12,4
Descrição	Sólido cristalino
Cor	Branco para amarelo
Condições a evitar	Luz

A CO é um agente anti-inflamatório e pode ser usado com eficácia no tratamento de artrite gotosa, proporcionando alívio aos ataques desta doença (BODOKI; VLASE; SANDULESCU, 2015), além disso, é usada com grande eficiência em tratamentos de doenças cardiovasculares (SLOBODNICK *et al.*, 2015). Quando ingerida, é rapidamente absorvida, sendo obtidas concentrações plasmáticas máximas em meia-hora a duas horas após a administração do medicamento. Grandes quantidades do fármaco e seus metabólitos chegam ao trato intestinal, na bile e nas secreções intestinais, fato que, somado a rápida renovação do epitélio intestinal, provavelmente explica as alterações intestinais causando problemas sérios pela dose errada ou consumo constante deste fármaco. (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2003).

Os efeitos colaterais mais comuns causados pela ingestão de CO refletem sobre as células epiteliais, pois estudos mostram que o fármaco deixa o sangue rapidamente, porém permanece por mais tempo nas células, que proliferam rapidamente no trato gastrintestinal. Os efeitos mais comuns da dosagem excessiva de CO são náuseas, vômitos, diarreias e dor abdominal. Para evitar estes inconvenientes é necessário fazer uso do medicamento em um espaço maior de tempo (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2003; SLOBODNICK *et al.*, 2015; PETTERMAN, 1991; LEUNG; HUI; KRAUS, 2015).

Como consequência dos efeitos da CO, medicamentos derivado destes compostos são considerados pela Anvisa na classe dos fármacos de baixo índice terapêutico (ANVISA Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº. 67). O índice terapêutico de um composto é calculado pela razão entre a dose letal da droga para 50% da população (DL₅₀) e dose efetiva mínima para 50% da população (DE₅₀) (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2005.; GOODMAN & GILMAN, 2005). Os compostos cuja dose terapêutica é bastante próxima à dose tóxica são

classificados como de baixo índice terapêutico e um pequeno erro na dosagem desses fármacos pode resultar em sérios danos a saúde ou até mesmo ao óbito de pacientes (YANO; BUGNO; AURICCHIO, 2008).

Devido ao baixo custo dos medicamentos manipulados em relação aos industrializados, as farmácias de manipulação estão se tornando uma alternativa frequente para a aquisição dessas drogas pelo consumidor. Contudo, existem alguns obstáculos que impedem o crescimento ainda maior desse setor, um deles é a falta de credibilidade de pacientes e médicos perante aos produtos manipulados, pois apesar da ANVISA normatizar através da Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº. 67, sobre as boas práticas de manipulação em farmácias magistrais, muitos estabelecimentos não realizam o controle de qualidade e não se interessam em trabalhar com compostos de baixo índice terapêutico devido às dificuldades nas análises desses compostos e ao alto custo dos métodos analíticos adotados pelas Farmacopeias vigentes.

A Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) estabelece a técnica de HPLC com detecção UV para o ensaio de doseamento de CO em formulações farmacêuticas. Esta técnica apresenta como algumas vantagens, alta seletividade e robustez, porém as análises são dispendiosas e demandam muito tempo, além da grande geração de resíduos pelo uso dos solventes orgânicos na fase móvel. Em virtude disso, torne-se fundamental o desenvolvimento de metodologias analíticas que atendam a todas as vertentes farmacêuticas do mercado, garantindo que o controle de qualidade desse fármaco seja realizado com eficiência e de forma mais simples e rápida sem a geração de grande quantidade de resíduos.

Na literatura foram encontrados outros métodos cromatográficos utilizados para a determinação de CO em várias matrizes, tais como, HPLC-UV (KO; LI; KODA, 1990) HPLC acoplado ao espectrômetro de massas (TRACQUI *et al.*, 1996; HAMSCHER *et al.*, 2005). Como já mencionado, a maioria dessas metodologias apresenta desvantagens para ser utilizadas em laboratório com análises de rotina, como o alto preço de operação, alta geração de resíduos, além da alta complexidade de execução e preparação prévia da amostra.

Como alternativa os métodos eletroquímicos podem ser usados para determinar a CO em amostras farmacêuticas, porém apesar das vantagens oferecidas por estas técnicas, conforme mencionado no item 1.2, existem apenas 3 (três) métodos para a determinação de CO descrito na literatura que se baseiam nesta área da analítica. Além disso, a maioria dos trabalhos explorou os eletrodos modificados a base de carbono.

No trabalho realizado por ZHANG (ZHANG, 2006) realizou-se um estudo para a determinação de CO em amostras farmacêuticas e urina, com eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito à base de hidrogenofosfato hexadecil e negro de acetileno. Os limites de detecção encontrados foram de $4,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, apresentando um DPR de 5,3% para 10 medidas, sendo aplicado em amostras de urina.

Já no trabalho de BODOKI e colaboradores (BODOKI, *et al.*, 2008), foi realizado um estudo eletroquímico para determinação de CO em amostras farmacêuticas realizando uma comparação do eletrodo impresso à base de grafite sem e com e modificação com biomoléculas, observando nenhuma mudança significativa entre os sensores analisados. Os autores obtiveram limite de detecção de $1,03 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, sendo analisado em amostras farmacêuticas, onde os autores não mencionam o DPR obtido.

Por último, o mesmo grupo de trabalho do primeiro artigo (ZANG, *et al.*, 2008), realizou-se um estudo eletroquímico para a determinação de CO, utilizando um eletrodo de carbono vítreo preparado com nanotubo de carbono e filme de polímero (polifenilendiamina). Foi realizado o estudo com voltametria cíclica, impedância eletroquímica e voltametria de pulso diferencial, sendo obtido um limite de detecção de $3,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e um desvio padrão relativo de 5,3% para 5 medidas, realizado em amostras farmacêuticas.

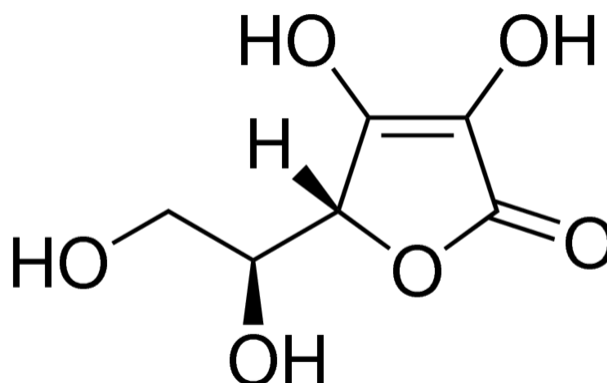
Tendo em vista estes trabalhos, vários parâmetros podem ser melhorados, como por exemplo, visto que processos de modificação do eletrodo podem aumentar a complexidade para aplicação deste método em análises de rotina. Além disso, uma maior frequência analítica e melhor reprodutibilidade pode ser alcançada pela técnica em fluxo com detecção MPA usando o eletrodo de BDD.

Neste contexto, o presente trabalho apresenta um novo método eletroanalítico como uma alternativa viável e promissora para o controle de qualidade da CO em formulações farmacêutica, apresentando requisitos importantes para uma análise mais vantajosa como: maior rapidez, baixo custo, baixos limites de detecção, alta precisão e elevada frequência analítica. Além disso, o método proposto apresenta a possibilidade da análise da CO em urina sem a interferência do ácido ascórbico e ácido úrico, os quais são os principais interferentes para detecção eletroquímica em fluidos biológicos e por isso serão discutidos a seguir.

1.8 Ácido Ascórbico

O Ácido Ascórbico (AA) ou vitamina C, representado pela sua estrutura na Figura 4, é uma cetolactona de seis carbonos, estruturalmente relacionada com a glicose e outras hexoses.

FIGURA 4: Fórmula Estrutural do Ácido Ascórbico



O AA é encontrado em vários alimentos, bebidas, pertencendo à classe de vitaminas essenciais, agindo como antioxidantes no organismo humano. É de fundamental importância para as reações enzimáticas, defesas da célula e contra o estresse oxidativo (GUERREIRO; KAMEL; SALES, 2010; ANVISA, 2010). Esse princípio ativo também pode ser encontrado em formulações farmacêuticas, geralmente agindo contra gripes e resfriados (ANVISA, 2010). Algumas características físico-químicas do AA encontram-se na Tabela 2:

TABELA 2: Propriedades Físico-químicas do Ácido Ascórbico (AA, 2015).

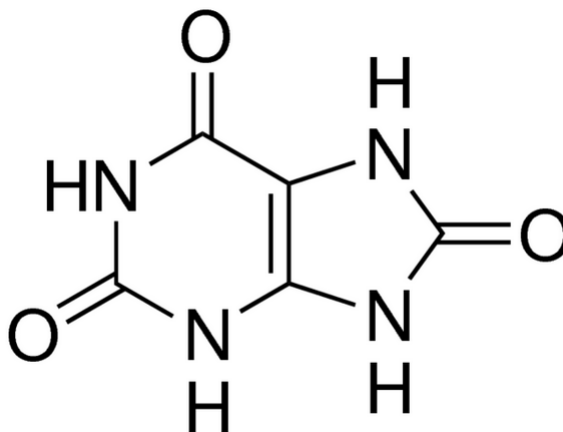
Fórmula Molecular	$C_6H_8O_6$
Massa Molar	176,12 g/mol
Forma	Sólido
Ponto de Fusão	190 – 192 °C
pKa	4,10 e 11,79
Condições a evitar	Luz
Solubilidade	em água: 330g/L em álcool: 20g/L

1.9 Ácido Úrico

O Ácido Úrico (AU) é um ácido fraco, com valor de pKa de 5,75, cuja estrutura está apresentada na Figura 5. Sua forma ionizada dá origem ao urato monossódico, sendo

encontrado no plasma humano e é o principal produto final produzido pelo metabolismo das purinas.

FIGURA 5: Estrutura Química do Ácido Úrico



A quantidade de uratos no organismo humano é de aproximadamente 68 mg L^{-1} , sendo que esta quantidade está no seu limite máximo de dissolução, de acordo com a temperatura do corpo humano. O urato de sódio é solúvel na temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$, porém quando a sua taxa excede 80 mg L^{-1} no sangue, provoca a deposição no tecido articular, levando a inflamações, como gota, artrite ou nefrite (SILVIA, 2007). Algumas propriedades físico-químicas do AU estão presentes na Tabela 3:

TABELA 3: Propriedades Físico-químicas do Ácido Úrico (AU, 2015).

Fórmula Molecular	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$
Massa Molar	168,11 g/mol
Forma	Sólido cristalino
Ponto de Fusão	$288 \text{ }^\circ\text{C}$
Solubilidade	Em água: 200g/L (20°C)
pKa	5,75
Cor	Branco
Odor	Ligeiramente a amoníaco

1.10 Determinação de AA e AU

As espécies AA e AU estão presentes em fluidos biológicos, como por exemplo, na urina onde apresentam as seguintes concentrações: de AA entre 570 a $3400 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e de AU

aproximadamente de $450 \mu\text{mol L}^{-1}$. Em amostras de sangue também são presente concentrações de AA e AU, nas concentrações de 34 à $85 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 120 à $450 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (SILVIA; LIMA; SERRANO, 2008). Tanto AA quanto AU são interferentes para análises em urina, pois ambos apresentam processos de oxidação na maioria dos eletrodos de trabalho usados para detecção eletroquímica. O mecanismo de oxidação do AA e AU está demonstrado nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

FIGURA 6: Mecanismo do processo de oxidação do Ácido Ascórbico (adaptado de MARTINELLO, 2001).

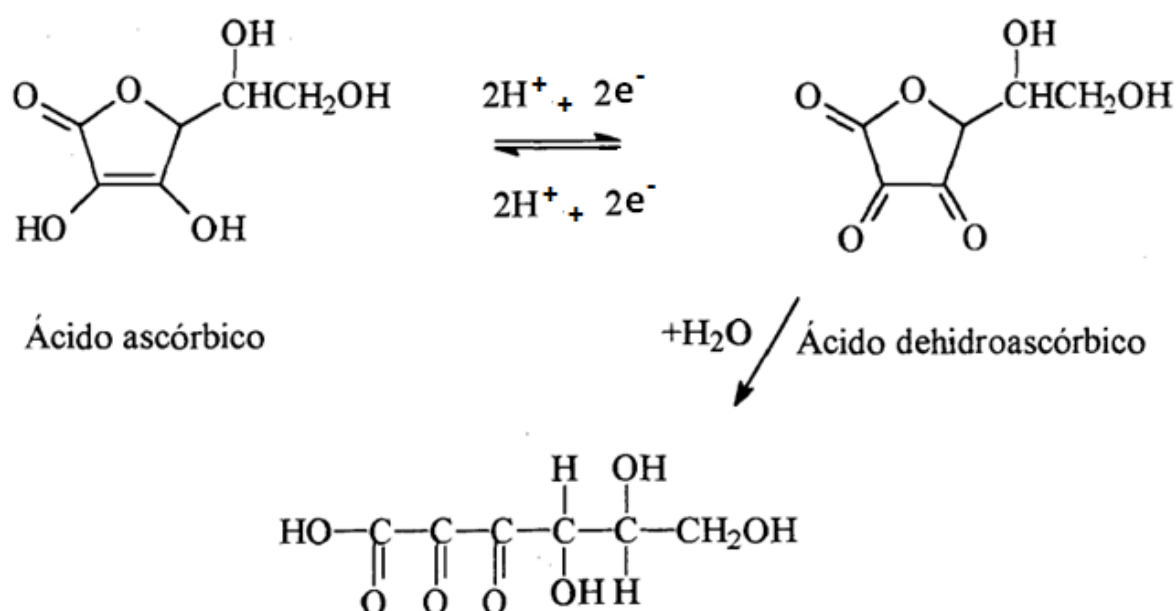
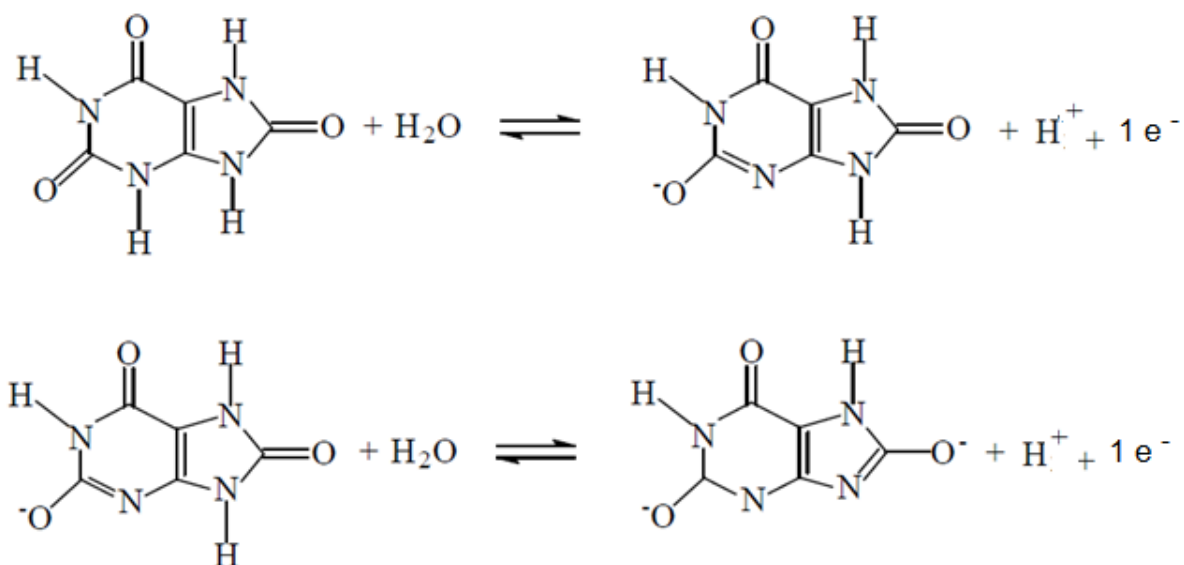


FIGURA 7: Mecanismo do processo de oxidação do Ácido Úrico (adaptado de MARTINELLO, 2001).



Através das Figuras 6 e 7 observamos os mecanismos de oxidação para os AA e AU, sendo estes processos eletroquímicos em grande maioria irreversíveis nos eletrodos de trabalhos, ou seja não apresentam processos de redução e nesse sentido a aplicação da vários pulsos de potencial na detecção MPA para determinação da CO pode ser uma alternativa para análises deste fármaco em urina sem a interferência de AA e AU.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método eletroanalítico simples, baixo custo, baixa geração de resíduos e alta frequência analítica para a determinação de CO em formulações farmacêuticas e urina por meio da detecção MPA acoplada ao sistema em fluxo FIA.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o comportamento eletroquímico da CO por VC em diferentes eletrólitos, usando o eletrodo de BDD em função dos seus respectivos pré-tratamentos.
- ✓ Otimizar os parâmetros de detecção MPA-FIA tais como: vazão, volume de amostragem, potenciais de detecção, limpeza e tempos de aplicação de potenciais.
- ✓ Otimizar os parâmetros analíticos para determinação da CO, como: repetibilidade, faixa linear de trabalho, Limite de detecção e quantificação.
- ✓ Investigar a metodologia proposta para a determinação de CO em amostras de urina na presença dos interferentes como: ácido ascórbico e ácido úrico.
- ✓ Comparar os resultados, realizar o doseamento da CO em formulações farmacêuticas com o método oficial e aplicar os testes estatísticos para validação, bem como realizar os estudos de adição e recuperação nas amostras de formulações farmacêuticas e urina.

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes químicos utilizados nos experimentos foram de pureza analítica (Sigma-Aldrich) e suas soluções preparadas em água deionizada (resistividade superior a 18 MΩ) obtida pelo sistema de purificação de Mili-Q. plus (Millipore). Os eletrólitos utilizados foram: uma solução tampão de Britton Robinson 0,04 mol L⁻¹; solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ e solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹.

A solução estoque de CO foi preparada a 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹, no qual o padrão do fármaco foi obtido da Sigma-Aldrich, juntamente com os padrões dos interferentes AA e AU. As soluções estoque desses interferentes foram preparadas em eletrólito suporte a 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ para AA e 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ para AU.

3.1.1 Preparo da solução amostra de medicamentos

Um lote de amostra do fármaco CO na forma de comprimido foi adquirido em uma drogaria na cidade de Diamantina-MG. No preparo da amostra, 20 comprimidos foram macerados, obtendo uma massa média de 0,12 g do pó, que foi transferido para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ (eletrólito suporte) e na fase móvel para detecção por HPLC-UV.

3.1.2 Preparo da solução amostra de urina

Para a preparação da amostra de urina, coletou-se 50 mL de urina de um paciente saudável, em seguida uma alíquota de 100 µL de amostra foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, sendo o volume completado com eletrólito suporte H₂SO₄ 0,3 mol L⁻¹, obtendo o fluido biológico diluído em 100 vezes. Para a preparação da segunda amostra adicionou-se 1,0 µL do fluido biológico em um balão volumétrico de 10 mL, posteriormente o volume foi completado com eletrólito suporte, obtendo o fluido biológico diluído em 1000 vezes. Posteriormente, outras duas amostras foram preparadas como citado anteriormente, porém elas foram dopadas com CO padrão, obtendo concentração final de 2,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹, sendo preparada rapidamente e analisada, pois, percebeu-se que com tempo maior a exposição ambiente, havia alteração de cor, possivelmente ocorrendo uma degradação da mesma, por isso optou-se por analisar rapidamente após a sua preparação. No final foi realizada análise

nas quatro amostras de urina, sendo duas apenas diluídas e as outras duas diluídas e dopadas com padrão de CO.

3.2 Instrumentação

As medidas por MPA e VC foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato da Auto lab modelo PGSTAT 128N (Eco Chemie Methrom) acoplado a um microcomputador contendo o software GPES 4.9 (Figura 8).

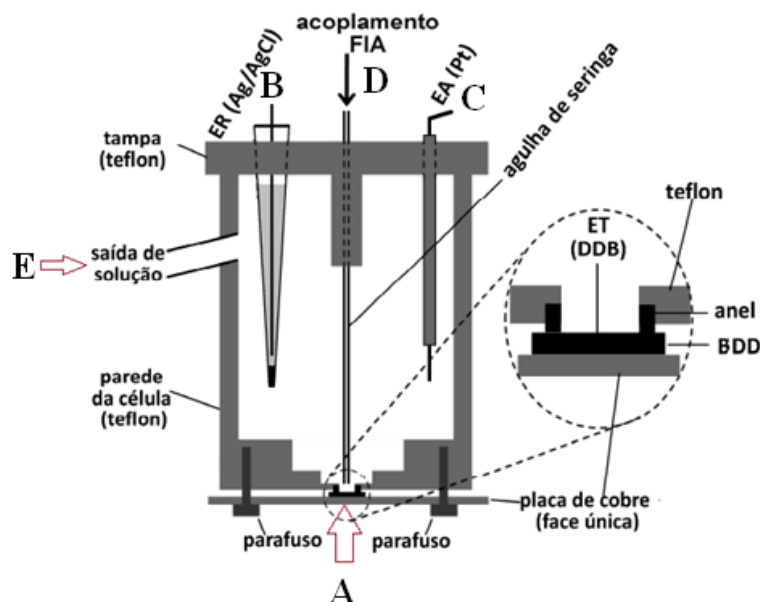
FIGURA 8: Potenciostato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT 128N.



3.2.2 Célula eletroquímica usada no sistema estacionário e FIA

Nas medidas eletroquímicas hidrodinâmicas utilizou-se uma célula eletroquímica do tipo “*wal jett*” como mostra a Figura 9, construído no próprio laboratório, constituída por três eletrodos (referência, auxiliar e trabalho).

FIGURA 9: Célula do tipo “*wall jet*” usada no sistema FIA. Em detalhe a região ampliada da interface do eletrodo de BDD (DE MIRANDA, 2011).



Para acoplamento em sistema FIA, a célula consiste em um tubo de teflon, com capacidade de aproximadamente 10,0 mL, apresentando cinco orifícios. O primeiro situado em A, é referente à posição do eletrodo de trabalho, localizado na parte inferior da célula, em B e C está posicionado os eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente. Na posição D é por onde a solução carregadora entra na célula, de forma centralizada e frontal ao eletrodo de trabalho (modo *wall jet*) de BDD. Por fim, o orifício E permite o descarte do excesso do eletrólito suporte. O Eletrodo de Referência utilizado foi um miniaturizado de Ag/AgCl (KCl saturado) sobre um ponteira de micropipeta (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996) preparado pela eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag, através da eletrólise de uma solução de NaCl 0,10 mol L⁻¹, sob corrente constante de 0,2 mA, durante 2 minutos. Como eletrodo auxiliar utilizou-se como um fio de platina.

3.3 Eletrodo de trabalho

Para as medidas voltamétricas e amperométricas utilizou-se o eletrodo de BDD (dopagem de 8.000 ppm de boro) adquirido pelo Centro Suíço de Eletrônica e Microtecnologia AS (CSEM). A construção desse eletrodo é descrita por GANDINI e colaboradores (GANDINI *et al.*, 1999). A área exposta do eletrodo BDD foi definida pelo

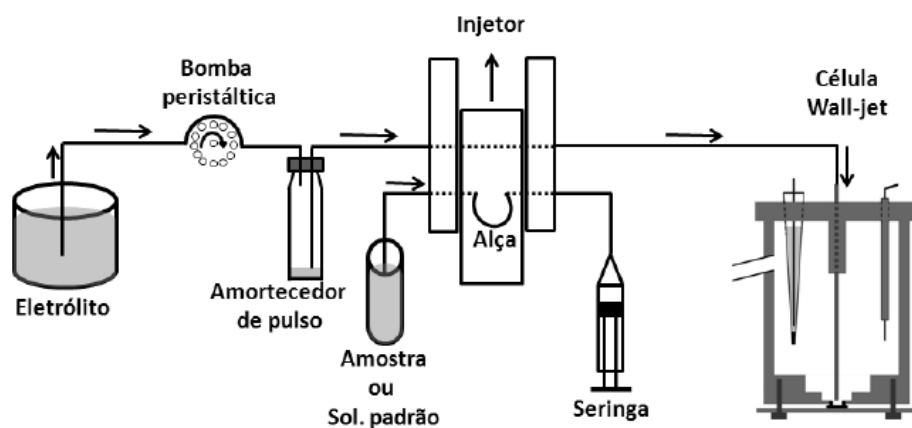
diâmetro do anel *o-ring* usado nas células eletroquímicas em fluxo (ver zoom da Figura 9), que foi de 0,4 cm, sendo a área do eletrodo calculada em 0.13 cm².

Na realização das análises, o eletrodo de trabalho foi tratado eletroquimicamente antes de ser utilizado, a fim de melhorar a sua atividade eletroquímica na detecção do analito de interesse. De acordo com área do eletrodo exposta neste trabalho e da recomendação da aplicação final de 6 C cm⁻² para o tratamento anódico e -9 C cm⁻² para o catódico por Salazar-Banda (SALAZAR-BANDA *et al.*, 2010) o tratamento Catódico foi realizado em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, aplicando primeiramente +30mA durante 60 segundos e depois -30 mA durante 360 segundos. Na avaliação do tratamento anódico o primeiro aplicava-se a corrente negativa e depois a positiva no mesmo intervalo de tempo.

3.4 Sistema FIA

A Figura 10 mostra o esquema do sistema FIA de linha única usada no presente trabalho. O eletrólito suporte passa pela bomba peristáltica de linha única (marca Gilson), logo depois a solução vai em direção ao amortecedor de pulso e chega ao injetor, passando por dois caminhos, o qual o operador escolhe por meio de uma alavanca, se vai passar ou não pela alça de amostragem (que é preenchida com padrão ou amostras do analito de interesse), na sequência a solução segue em direção a célula eletroquímica, no qual o sinal é obtido e posteriormente processado pelo *software* GPES 4.9 da Autolab.

FIGURA 10: Esquema ilustrativo do sistema FIA de linha única utilizada no trabalho (DE MIRANDA, 2011).



3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD).

Foi utilizado para as análises o cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu (Kyoto, Japão) com controladora SCL-10A VP, três bombas LC-6AD VP com degaseificador DGU-20A SR, forno CTO-10A VP, injetor automático SIL-10AD VP e detector com arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A VP; com software Lab Solutions. Coluna cromatográfica HPLC C18 (25 x 4,6 mm, 5 μ m) Shimadzu (Kyoto, Japão), sendo mostrado na Figura 11. As condições cromatográficas foram adaptadas a partir da Farmacopéia Brasileira volume 2 (ANVISA, 2010).

Para realização da análise utilizou-se a fase móvel que foi a mistura de fosfato de potássio monobásico 0,5 mol L⁻¹, água e metanol (4,0: 44: 52), sendo ajustado o pH para 5,0 com solução de ácido fosfórico. O comprimento de onda selecionado foi 254 nm sendo o tempo de retenção esperado entre 5,5 a 9,5 minutos.

FIGURA 11 – Foto do cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) usado nas análises cromatográficas para comparação da metodologia



3.6 Comportamento eletroquímico do fármaco Colchicina CO

A técnica de VC foi empregada para o estudo inicial do comportamento eletroquímico do fármaco CO em diferentes eletrólitos suporte, a fim de verificar qual solução carregadora o analito de interesse apresenta melhor perfil eletroquímico. A janela de varredura foi realizada

na faixa de trabalho de -1,0 à 2,2 V vs Ag/AgCl sobre eletrodo de BDD com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , respeitando a região da descarga do solvente em cada eletrólito. Para a obtenção destes resultados foram realizados tratamentos eletroquímicos prévios sobre a superfície do eletrodo de trabalho, em diferentes condições: sem tratamento, com tratamento anódico e catódico do eletrodo de BDD (detalhes na seção 3.3).

3.7 Otimização dos parâmetros de detecção FIA-MPA

Para melhor desempenho da detecção eletroquímica da CO vários parâmetros foram estudados e otimizados. A MPA foi avaliada em função dos pulsos de potenciais que seriam empregados para a determinação de CO, escolhendo o melhor potencial de oxidação, redução e outro para limpeza (ou não) da superfície do eletrodo de BDD, bem como os tempos de aplicação desses potenciais. Para o sistema FIA foram estudados alguns parâmetros como, por exemplo, volume injetado e a vazão do sistema. Em seguida (seções 3.7.1 e 3.7.2) serão detalhadas como foram realizadas as otimizações desses parâmetros em sistemas FIA.

3.7.1 Estudos da determinação de pulsos de potencial e tempo de aplicação para a detecção de fármacos em sistema FIA

Foi realizado um estudo para a determinação das melhores condições para a detecção do fármaco através da técnica MPA em sistema FIA, sendo avaliado o perfil eletroquímico depois de 3 injeções consecutivas da amostra contendo o analito. Para a detecção anódica de CO foram aplicados os seguintes pulsos de potencial: 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7 e 1,8 V. Para a detecção catódica foi mantido um pulso de potencial de 1,7 V (devido ao processo redução ser dependente da oxidação) e aplicado outros para avaliar a redução nos pulso de potencial: -0,6 V; -0,7; -0,8; -0,9; -1,0; -1,1 e -1,2 V.

Para a realização destes estudos foram escolhidos a alça de amostragem de 100 μL , numa vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de aplicação dos pulsos de 100 ms. Esses valores foram estabelecidos para as análises iniciais, mas posteriormente foram otimizados. Depois de otimizados os pulso de potenciais de oxidação e redução, foi realizado o estudo para a escolha dos tempos dos pulsos. Para a detecção anódica foram testados os tempos de: 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4, 0,5 e 0,6 s e para a detecção catódica: 0,03; 0,05; 0,075; 0,1 e 0,2 s.

3.7.2 Avaliação da resposta eletroquímica em função da vazão e alça de amostragem no sistema FIA

A tamanho da alça de amostragem, vazão do fluxo e a frequência analítica influencia na sensibilidade, com isso foram realizados estudos para a escolha das melhores condições para as análises. Os volumes das alças testados no sistema FIA foram de 50, 100, 150, 200, 250 e 330 μL e as vazões de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mL min^{-1} .

3.7.3 Estudos para a determinação do pulso de potencial de aplicação deste para limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho

Com o intuito de melhorar a eficiência nas análises foi investigado no sistema FIA a limpeza da superfície do eletrodo de trabalho de BDD, sendo avaliados os seguintes pulsos de potencial: Limpeza (0,0); -1,15; -1,20; -1,25 e -1,30, sendo aplicados por tempos que variou de 100 a 500 ms.

3.7.4 Ensaios de repetibilidade e faixa linear de trabalho para o analito

Depois de otimizados todos os parâmetros analíticos para a determinação FIA-MPA, estudos foram feitos para a obtenção da faixa linear de trabalho, apresentando também a repetibilidade da metodologia desenvolvida. Avaliou-se os desvios padrões relativos (DPR) das respostas de 10 injeções consecutivas da amostra de CO numa concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A repetibilidade foi avaliada de outra maneira, em que injetou-se 15 amostras de CO, sendo 5 nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-4}$ e $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, avaliou-se também a reprodutibilidade do eletrodo de trabalho de BDD.

A faixa linear de trabalho foi estabelecida através da curva de regressão linear, que foi obtida através das correntes de pico obtidos dos FIAGramas das injeções em triplicatas de solução padrão de CO nas concentrações de 1×10^{-7} a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.8 Estudos dos limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e ensaios de adição e recuperação em amostras farmacêuticas

A curva de calibração foi obtida através da regressão linear da média dos resultados da análise, que foi realizada em triplicata de solução de CO padrão nas seguintes concentrações: 0,1; 0,25; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100; 250; 500 e 1000 $\mu \text{ mol L}^{-1}$. O LD foi calculado a partir do desvio padrão de ruído, coletados em 10 pontos aleatórios de corrente da linha de base do amperograma utilizado para obtenção da curva de calibração analítica, sendo este valor multiplicado por 3 e dividido pela inclinação da regressão linear obtida da curva

analítica. O mesmo cálculo foi feito para calcular o LQ, diferenciando-se apenas no fato de que o desvio padrão dos ruídos foi multiplicado por 10.

Posteriormente os estudos de adição e recuperação em amostras farmacêuticas e urina foram realizados, avaliando assim a exatidão da metodologia, bem como o efeito de matriz do método proposto. Nesses estudos, os padrões dos respectivos analitos foram adicionados nas amostras farmacêuticas, avaliadas pela detecção MPA em FIA, sendo verificado a % de recuperação do sinal desses padrões pela metodologia proposta para o fármaco CO.

3.9 Avaliação da ação de interferentes como ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) na metodologia estudada para a determinação de CO em urina e adição e recuperação em amostras biológicas

A possibilidade de interferência do AA e AU na metodologia desenvolvida para a determinação de CO foi estudada em triplicata e em condições otimizadas. Fixou-se a concentração do padrão CO em $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e aumentou-se a concentração de AA, sendo realizada em 8 amostras apresentando as seguintes composições:

- I. CO ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$);
- II. CO + AA ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$);
- III. CO + AA ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$);
- IV. CO + AA ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$);
- V. CO + AA ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$);
- VI. CO + AA ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$);
- VII. CO + AA ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$);
- VIII. CO + AA ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$);

Posteriormente, realizou-se o estudo do interferente AU em 8 amostras, apresentando as seguintes composições de CO e AU:

- IX. CO ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$);
- X. CO + AU ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$)

- XI. CO + AU (2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$);
- XII. CO + AU (2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$);
- XIII. CO + AU (2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$);
- XIV. CO + AU (2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$);
- XV. CO + AU (2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

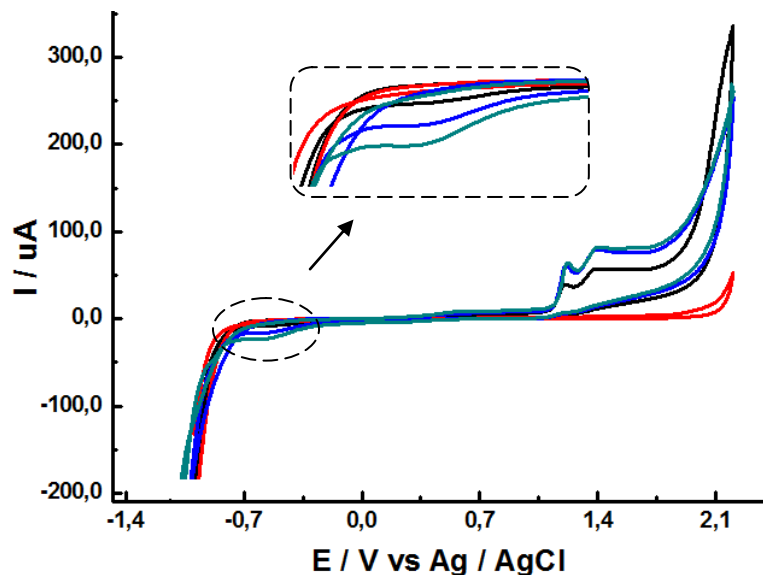
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões desenvolvidos neste trabalho foram divididos em duas partes, sendo a primeira parte destinada à investigação do comportamento eletroquímico da CO por VC. Na segunda parte foram realizadas as investigações dos parâmetros instrumentais e analíticos para determinação da CO por FIA-MPA.

4.1- Parte 1: Comportamento eletroquímico da CO

Como descrito anteriormente, a VC foi utilizada para avaliar o comportamento eletroquímico da CO sobre a superfície do eletrodo de trabalho de BDD em diferentes eletrólitos suporte. Em todos os estudos realizados pela VC a faixa de varredura compreendeu a janela eletroquímica do eletrodo de BDD, sendo o oxigênio removido da solução por borbulhamento de nitrogênio antes das análises. A solução que obteve melhor resposta em função da sensibilidade e seletividade da resposta eletroquímica foi em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, no qual a CO apresentou processos de oxidação e redução, sendo dois picos de oxidação em aproximadamente 1,20 V e 1,41 V e um pico de redução em -0,58V, conforme mostra a Figura 12.

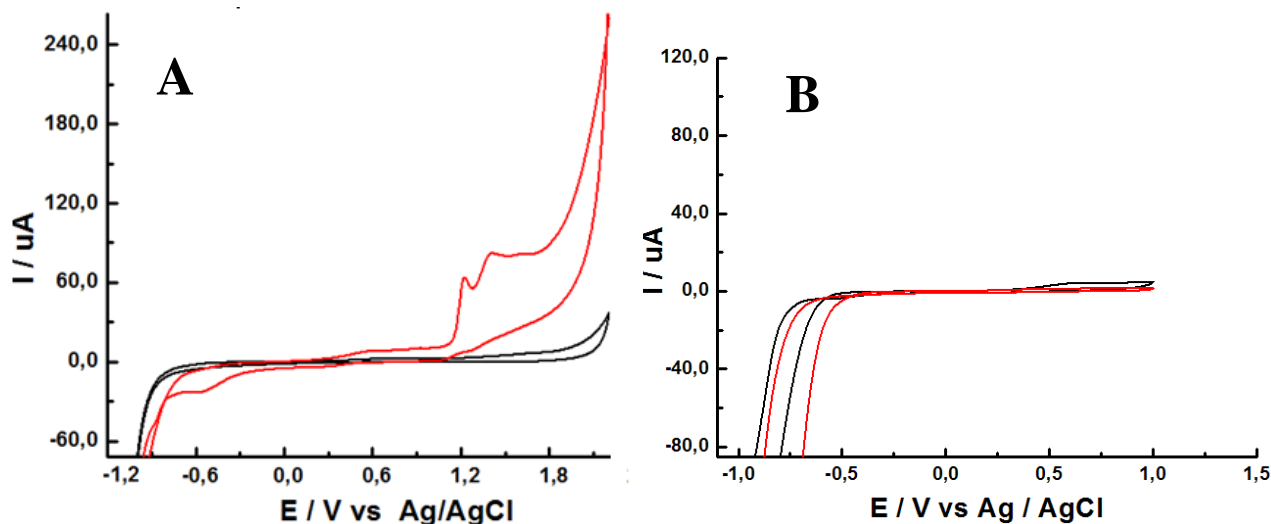
FIGURA 12: Voltamogramas cíclicos somente do eletrólito H_2SO_4 $0,1\text{mol L}^{-1}$ (-), com adição da CO $1 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ sem tratamento do eletrodo de BDD (-), após o tratamento anódico (-) e após tratamento catódico (-). Velocidade de varredura: 50mV s^{-1} .



Outro estudo mostrado na Figura 12 foi o pré-tratamento realizado sobre a superfície do eletrodo de BDD, no qual pode ser observado que o tratamento do eletrodo de BDD, tanto anódico (-) quanto o catódico (-), aumentou com as correntes de oxidação dos processos da CO , bem como proporcionou uma melhor detectabilidade do processo de redução da CO , o qual é de fundamental importância para este trabalho devido ao interesse das análises em fluidos biológicos. Em virtude do resultado obtido com os tratamentos efetuados, escolheu-se realizar o tratamento catódico, pois este apresentou um leve aumento da corrente no processo de redução da CO , sendo este tratamento realizado antes de iniciar todas as análises apresentadas neste trabalho.

A dependência dos processos eletroquímicos foi avaliada conforme demonstrada na Figura 13. Em 13 A, foi realizada uma varredura de potencial de $-1,0$ à $2,2 \text{V}$, sendo observado dois processos anódicos e um catódico. Já em 12 B, foi realizada uma varredura em potenciais menores de $-1,0$ a $1,0 \text{V}$, não sendo observado nenhum processo. Através desse estudo sugere-se que a redução do fármaco CO é um processo dependente do primeiro processo de oxidação, porém é difícil essa avaliação uma vez que em $1,3 \text{V}$ o segundo processo já pode ter sido iniciado.

FIGURA 13: Estudo da dependência do processo eletroquímico; (A) Varredura de potencial de -1,0 a 2,2 V, H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ (-), adição de CO 1x10⁻³ mol L⁻¹(-), (B) Varredura de potencial de -1,0 a 1,0 V H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ (-) e adição da CO 1x10⁻³ mol L⁻¹(-).

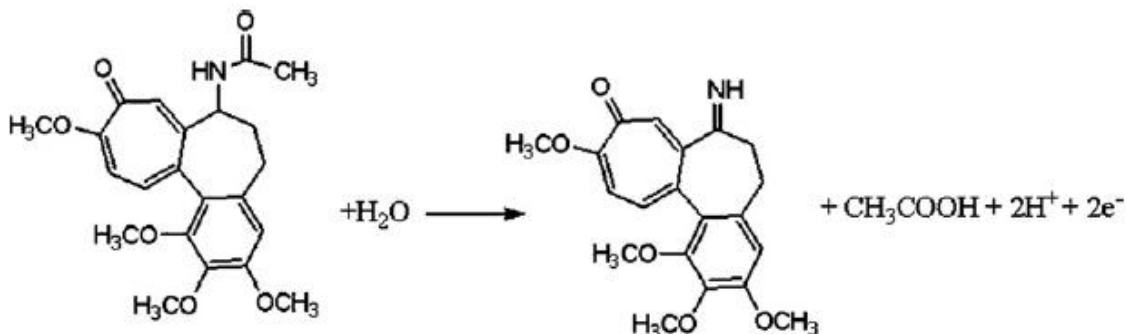


O comportamento eletroquímico do CO já foi relatado em outros eletrodos à base de carbono na literatura, como por exemplo, Zhang (ZHANG, 2006). Esse autor observou por VC apenas um processo de oxidação irreversível da CO em aproximadamente 1,12 V sobre o eletrodo de carbono vítreo em meio de ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹, não sendo proposto nenhum mecanismo de reação. O autor usou a técnica de voltametria de pulso diferencial para a detecção do CO em amostras biológicas. Seus estudos também mostraram que a reação é governada por um processo de adsorção. Já no estudo realizado por Bodoki e colaboradores (BODOKI *et al.*, 2008), foi possível obter um sistema quase-reversível utilizando um eletrodo impresso à base de grafite. Através da VC usando solução de CO 1,0 x 10⁻⁴ em uma mistura de ácidos perclórico e fosfórico (pH 2,05), os autores observaram dois picos de oxidação bem definidos em 1,06 e 1,22 V e um pico de redução em -1,04V, não sendo proposto nenhum mecanismo para a reação. Esses autores usaram a técnica de voltametria de pulso diferencial para a detecção da CO em amostras farmacêuticas.

No estudo posterior realizado por Zhang e colaboradores para a detecção eletroquímica de CO, utilizou-se o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono e uma camada de polímero condutor (ZANG *et al.*, 2008), no qual foi observado um processo anódico controlado por adsorção. Esses mesmos autores sugerem que a oxidação acontece no nitrogênio do grupo amida da CO com perda de dois elétrons e dois prótons no

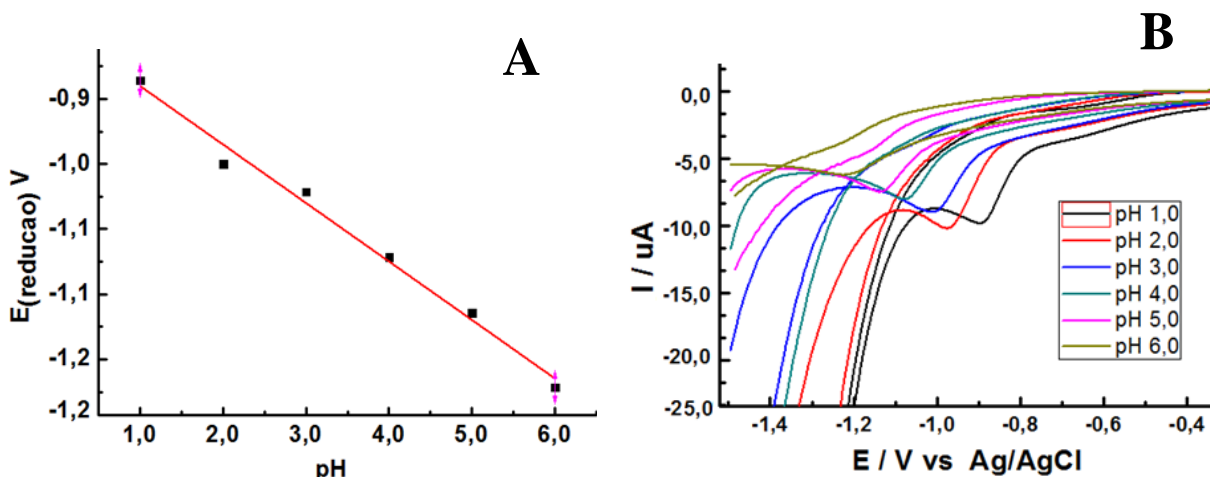
processo, liberando ainda um ácido acético como produto. O mecanismo proposto por esse trabalho é mostrado na Figura 14 (ZANG *et al.*, 2008).

FIGURA 14: Mecanismo de oxidação do fármaco Colchicina (ZANG *et al.*, 2008).



O mecanismo dos processos eletroquímicos da CO ainda precisa ser avaliado e confirmado por espectrometria de massas, mas provavelmente o comportamento da oxidação sobre o eletrodo de BDD deve ser semelhante ao obtido no eletrodo de grafite (ZANG *et al.*, 2008). Nesse sentido, estudos foram feitos para verificar a semelhança entre o processo sugerido anteriormente e sobre o eletrodo de BDD. Primeiramente, como o processo de oxidação mostrado por ZHANG foi envolvido apenas um pico anódico, com a perda de dois elétrons e dois prótons, acredita-se que no eletrodo BDD cada processo de oxidação envolve a presença de um elétron e um próton. Além disso, no eletrodo de BDD tem-se um processo de redução da CO, o qual é dependente do processo de oxidação, como apresentado na Figura 13. O estudo da variação do pH mostrou que o processo de redução é dependente dos íons H^+ (Figura 15A).

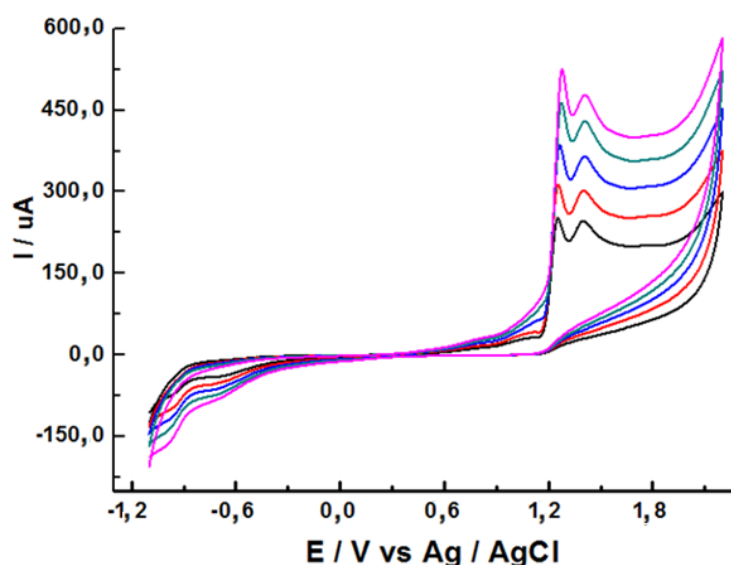
FIGURA 15: Relação do potencial do pico de redução em função dos valores de pH (A); VCs da CO em soluções com diferentes valores de pHs: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 sobre eletrodo de BDD (B).



Através do estudo da relação do potencial de pico catódico da CO em função do pH, mostrado na figura 15 A, comprova-se que o número de elétrons envolvidos é igual ao número de prótons, pois o coeficiente angular obtido foi de 0,063, o qual está próximo de próximo de 0,059 como sugere a equação de Nernst para esta relação (BRETT; BRETT, 1993). Na figura 15 B, é mostrado os VCs dos picos catódicos realizados em pHs de 1 a 6, onde é observado que em valores de pH mais ácidos o potencial é deslocado para região mais negativa e o perfil da corrente catódica mais definida. Em valores de pHs superior a 6 não teve resposta significativa, por isso não foi mostrado.

Estudos da variação da velocidade de varredura foram realizados para o primeiro processo de oxidação e o de redução, sendo que para o segundo processo de oxidação não foi possível esta análise, devido à baixa resolução dos picos no VCs, conforme mostrado na Figura 16.

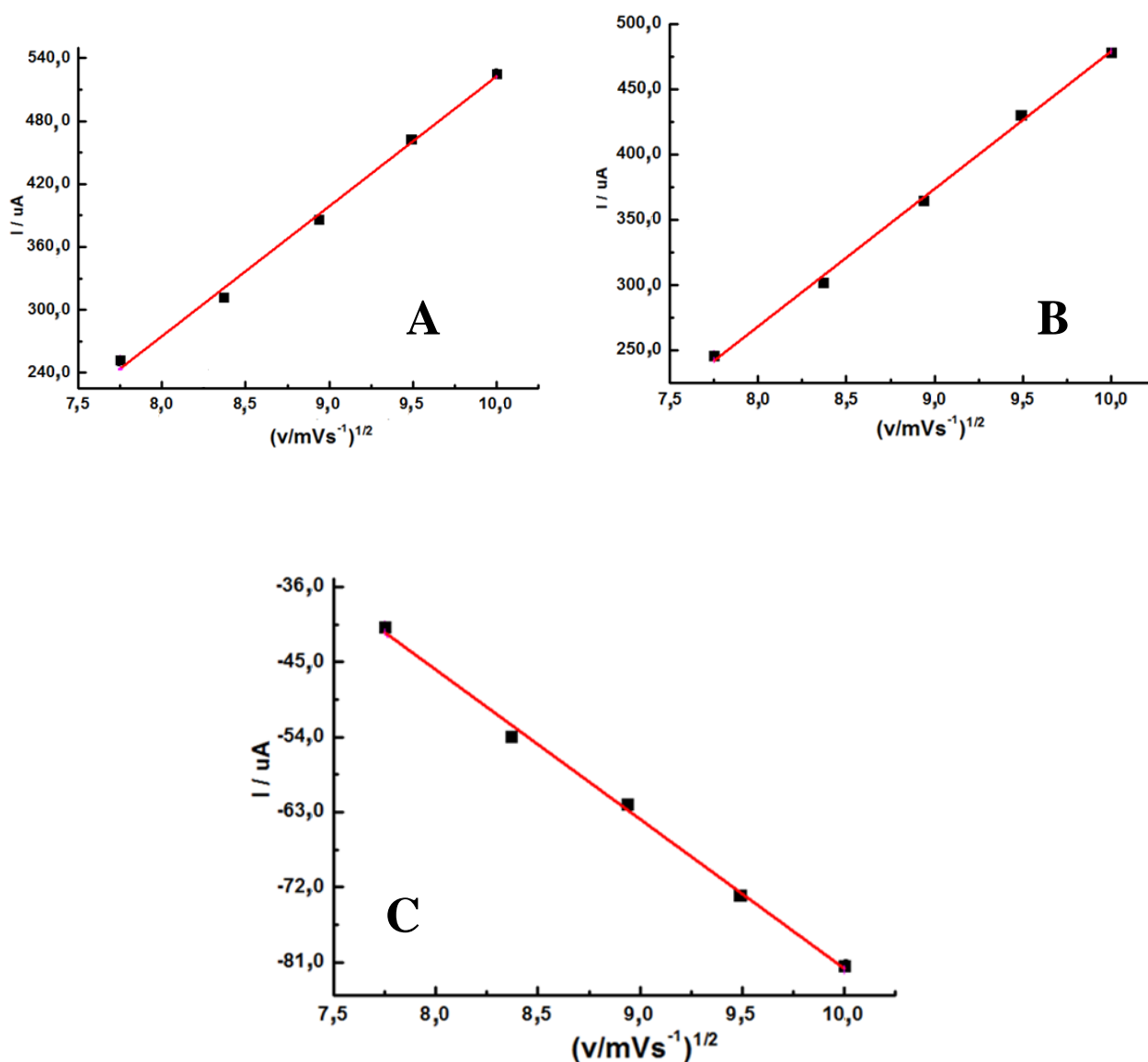
FIGURA 16: VCs referente às velocidades de varredura 60, 70, 80, 90, 100, 150 e 200 mV s^{-1} para o fármaco CO em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo de BDD.



Pelos VCs obtidos da Figura 16, verificou-se uma relação linear entre a corrente e a raiz quadrada de velocidade para a faixa de 60 – 200 mV/s , sendo demonstrado na Figura 17 A, B para os processos anódicos e 17 C para o processo catódico. Observamos um aumento proporcional de corrente de pico em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura para ambos os processos, o que é característico de um processo controlado por difusão (GIMENES, *et al* 2015). Cabe destacar que, a CO apresentou processos eletroquímicos

controlados por adsorção nos eletrodos propostos na literatura e, diferentemente, apresentou um processo difusional no eletrodo de BDD, o que pode melhorar a reprodutibilidade do método desenvolvido neste trabalho.

FIGURA 17: Relação entre as correntes de picos anódicos (A), (B); e catódico (C) com a velocidade de varredura para o intervalo de 60-100 mV s^{-1} em todos os processos.



Cabe ressaltar que, a escolha da detecção e quantificação da CO pelo potencial de redução deve-se aos possíveis interferentes em amostras biológicas, como o AA e AU, os quais apresentam em geral processos de oxidação na mesma faixa da CO. De acordo com o estudo mostrado por VC na Figura 18, o AA e AU não são interferentes para detecção do CO

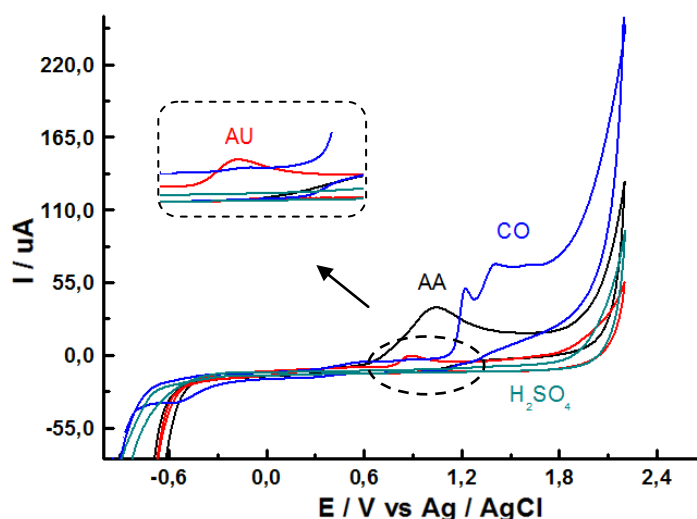
pelo processo de redução. Desta forma, o objetivo da detecção da CO pela MPA foi baseado na aplicação de um potencial para oxidar a CO e outro pulso de potencial para detectar o produto gerado pela redução.

4.2- Parte 2: Determinação de CO por FIA-MPA

4.2.1 Escolha do potencial de oxidação da CO

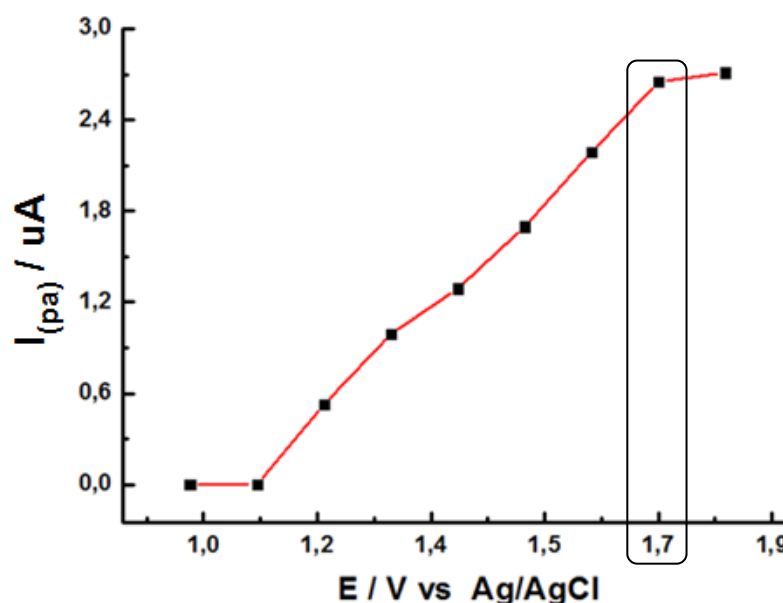
Após o estudo eletroquímico da CO, foi realizado a otimização dos parâmetros da detecção MPA, selecionando os pulsos de potenciais com os seus respectivos tempos de aplicação, com objetivo de obter melhor desempenho nas análises, em termos de sensibilidade, seletividade e frequência analítica. Além disso, a escolha da detecção e quantificação da CO pelo potencial de redução deve-se aos possíveis interferentes em amostras biológicas, como o AA e AU, os quais apresentam em geral processos de oxidação na mesma faixa da CO.

FIGURA 18: Voltamogramas cíclicos do eletrólito suporte H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sob eletrodo de BDD (-) com adição das espécies: CO $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (-), AA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (-) e AU $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (-). Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} . Em detalhe o pico de oxidação do AU.



Conforme apresentado na Figura 18, AA e AU não são interferentes na detecção do CO pelo processo de redução. Desta forma, o objetivo da detecção da CO pela MPA foi baseado na aplicação de um potencial para oxidar a CO e outro pulso de potencial de redução para detectar o produto de oxidação. Então, primeiramente, foi investigado nove potenciais de oxidação: 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7 e 1,8 V para o potencial gerador, sendo também aplicado um pulso fixo de redução em -1,0 V para avaliar quais destes potenciais geradores proporcionava a maior corrente de redução da CO. Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms, na vazão de 3,0 mL min⁻¹ e alça de 100 µL. Os resultados obtidos em função da corrente de redução em -1,1 V estão demonstrados na Figura 19.

FIGURA 19: Sinal da corrente de pico de oxidação da CO em função da variação do potencial de oxidação (gerador). Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms, na vazão de 3,0 mL min⁻¹ e alça de 100 µL.



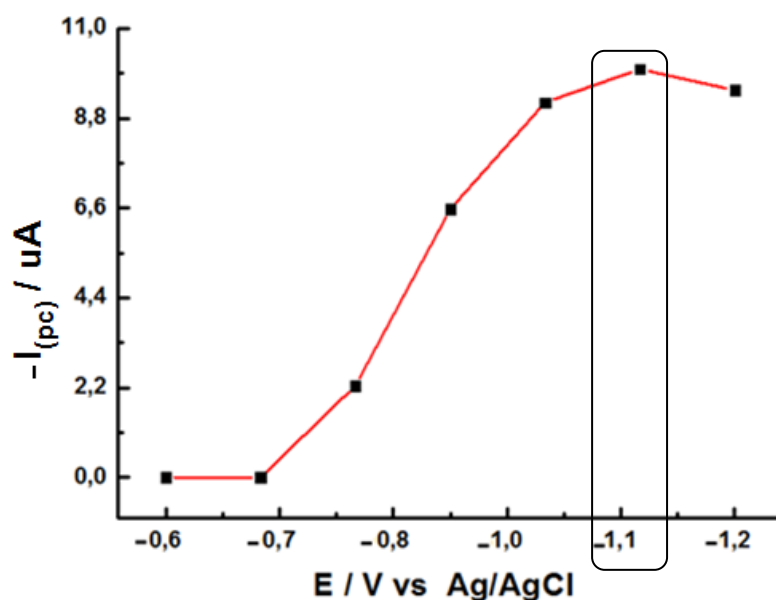
A Figura 19 mostra que o sinal de corrente de oxidação da CO é observado a partir da aplicação do pulso do potencial gerador em -1,1 V, o que é esperado devido aos processos de oxidação da CO apresentados pelo VC sobre o BDD (Figura 12) tem sido observados em aproximadamente 1,20 V e 1,41 V, ou seja, antes de 1,2 V pode não ter sido gerado produto suficiente para oxidação da CO. Além disso, observa-se que quanto maior o pulso de potencial de oxidação, mais espécies são geradas, sendo que em +1,7 V tem-se o limite de

corrente atingido para oxidação da CO e, assim, este foi escolhido devido à maior sensibilidade para geração do produto detectado.

4.2.2 Escolha do potencial de redução da CO

Após a otimização do potencial de oxidação, foi realizado o estudo para a escolha do potencial de redução, nos seguintes valores de potencial: -0,6; -0,7; -0,8; -0,9; -1,0; -1,1; e -1,2 V, tendo o pulso de potencial do gerador fixado em 1,7 V.

FIGURA 20: Sinal da corrente de redução da CO em função da variação do pulso de potencial de redução, aplicando o pulso de potencial gerador fixo em +1,7 V. Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms, na vazão de 3,0 mL min⁻¹ e alça de 100 µL



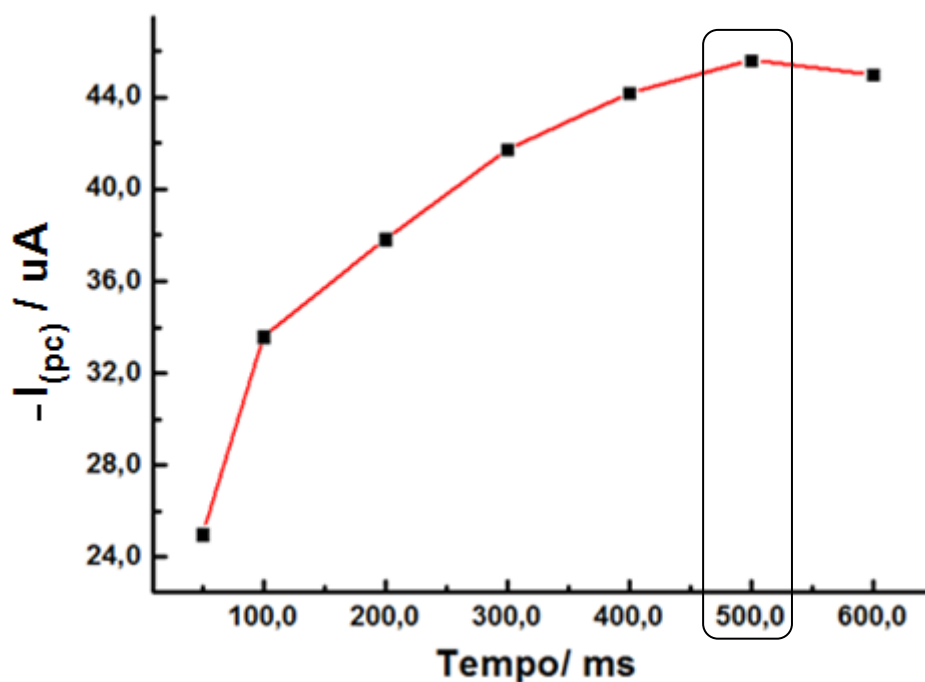
De acordo com a Figura 20, pode-se observar que em potenciais inferiores a -0,7 V a CO começa a reduzir e tem sua resposta amperométrica aumentada até -1,1 V. Dessa forma, é possível verificar que houve um deslocamento dos potenciais catódicos, para valores mais negativos em comparação aos apresentados na VC da CO (Figura 15) que tinha o pico de redução em torno de -0,58 V. Esse deslocamento dos potenciais é comum em sistemas em fluxo, podendo ser explicado devido à configuração das células e a posição do eletrodo de referência. O aumento da corrente catódica em potenciais inferiores a -1,2 V foi outro comportamento observado na Figura 20 para CO, que pode estar ligada a alta corrente capacitiva gerada pela descarga de hidrogênio no eletrodo de BDD nesta região de potencial.

Desta maneira, o potencial que apresentou melhor sensibilidade para ser selecionado nas análises posteriores foi em -1,1 V.

4.2.3 Escolha do tempo do potencial de oxidação da CO

Depois de otimizados os potenciais de oxidação e redução, foi feito o estudo para a escolha do tempo de aplicação desses pulsos de potencial, sendo aplicados os seguintes valores: 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 ms. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 21.

FIGURA 21: Sinal da corrente de redução da CO em -1,1 V/100ms em função do tempo da aplicação do potencial gerador em +1,7 V. Vazão de 3,0 mL min⁻¹ e alça de 100 µL

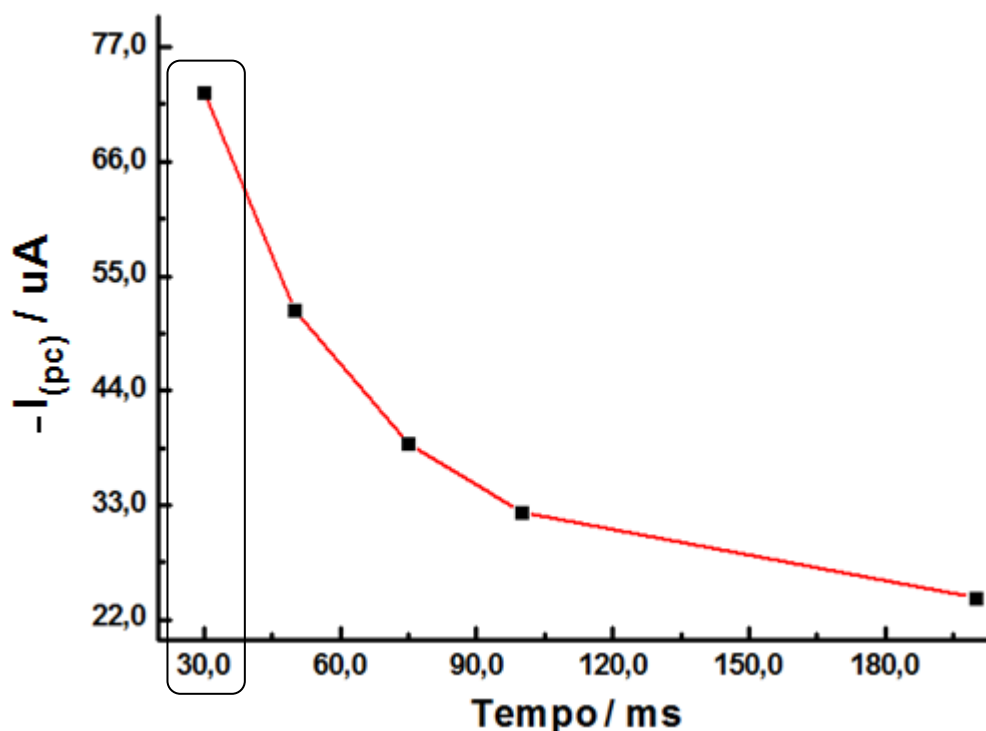


Pode-se observar na Figura 21 que o aumento do tempo de aplicação do pulso de potencial gerador, aumenta o sinal de corrente da redução de CO devido ao maior número de espécies geradas. No entanto, a partir do tempo de 500 ms há uma diminuição do sinal da corrente devido, provavelmente, à perda de espécies geradas, devido o constante fluxo do sistema FIA, que possivelmente retira essas espécies da superfície do eletrodo sem ser quantificadas. Nesse sentido, o tempo de 500 ms para aplicação do potencial gerador foi considerado ideal para se obter uma maior sensibilidade da detecção da CO em 1,7 V.

4.2.4 Escolha do tempo de aplicação potencial de redução da CO

Como apresentado na introdução, à avaliação do tempo de aplicação do pulso de potencial de detecção é importante, pois em tempos menores pode haver um aumento da sensibilidade para determinação da CO em -1,1 V. Sendo assim, foram avaliados desde o menor tempo oferecido pelo software do equipamento, no caso de 30 ms, até tempos de aplicação em 200 ms. Este estudo pode ser observado na Figura 22

FIGURA 22: Valores de corrente de picos catódicos da CO obtido em -1,1 V em função do tempo de aplicação deste potencial com aplicação do potencial gerador fixo em 1,7 V por 500ms. Vazão de 3,0 mL min⁻¹ e alça de 100 µL.



O comportamento obtido pela Figura 22 para o sinal de redução da CO está de acordo com esperado, conforme já descrito por dos Santos e colaboradores (DOS SANTOS et al., 2011). Neste trabalho os autores relatam que, se o fluxo não for suficiente para repor a quantidade de espécies na superfície do eletrodo no momento da detecção (em torno dos 5 ms finais da aplicação do pulso), em tempos menores tem-se um maior o sinal da corrente devido á diminuição da corrente faradaica. Desta forma, o tempo de duração escolhido para detecção da CO no pulso do potencial coletor em -1,1V foi de 30ms. Cabe ainda mencionar que, como

a diferença entre os pulsos de potencial de oxidação (gerador) e redução (coletor) escolhidos foram muito elevados, foi necessário aplicar outros pulsos de potencial entre esses valores para amortecimento e diminuição da corrente capacitiva, porém o amperograma deste potencial não foi monitorado em nenhum das análises deste trabalho. Portanto, a seguinte sequência de potencial foi aplicado pela detecção MPA de forma cíclica:

- (1) 1,7 V/500 ms: pulso de potencial gerador aplicado para oxidação da CO e geração do produto a ser detectado.
- (2) 1,0 V/ 100 ms: pulso de potencial de amortecimento.
- (3) 0,0 V/ 100 ms: pulso de potencial de amortecimento.
- (4) -1,1 V/30 ms: pulso de potencial coletor aplicado para detecção e quantificação da CO em amostras farmacêuticas e biológicas.
- (5) 0,0 V/ 100 ms: pulso de potencial de amortecimento.
- (6) 1,0 V/ 100ms: pulso de potencial de amortecimento.

4.2.5 Determinação do pulso de potencial e tempo de aplicação para a limpeza do eletrodo de BDD

O produto da oxidação detectado no potencial coletor pode contaminar ou passivar o eletrodo de BDD devido aos possíveis processos de adsorção da CO na superfície do eletrodo. Nesse sentido, com intuito de aumentar a sensibilidade e reprodutibilidade do método proposto por FIA-MPA, avaliou-se também se haveria a necessidade da aplicação de um pulso de potencial de limpeza para eliminar qualquer espécie de CO que ainda não tenha sido reduzida em -1,1 V/ 30ms. Esse estudo foi conduzido por meio de dez injeções consecutivas de amostra de CO 1×10^{-4} mol L⁻¹, aplicando-se por 100 ms os seguintes pulsos de potencial: -1,15; -1,20; -1,25 e -1,30 V. Também foi avaliado o DPR quando nenhum pulso de potencial de limpeza foi aplicado. Posteriormente, foi avaliado o desvio padrão relativo (DPR) das respostas obtidas em cada pulso de potencial aplicado, sendo esses resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: DPR de 10 injeções sequenciais de CO $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em função da corrente gerada em $-1,1 \text{ V}/30\text{ms}$ com aplicação ou não de um pulso de potencial de limpeza do BDD. Vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ e alça de amostragem de $100\mu\text{L}$.

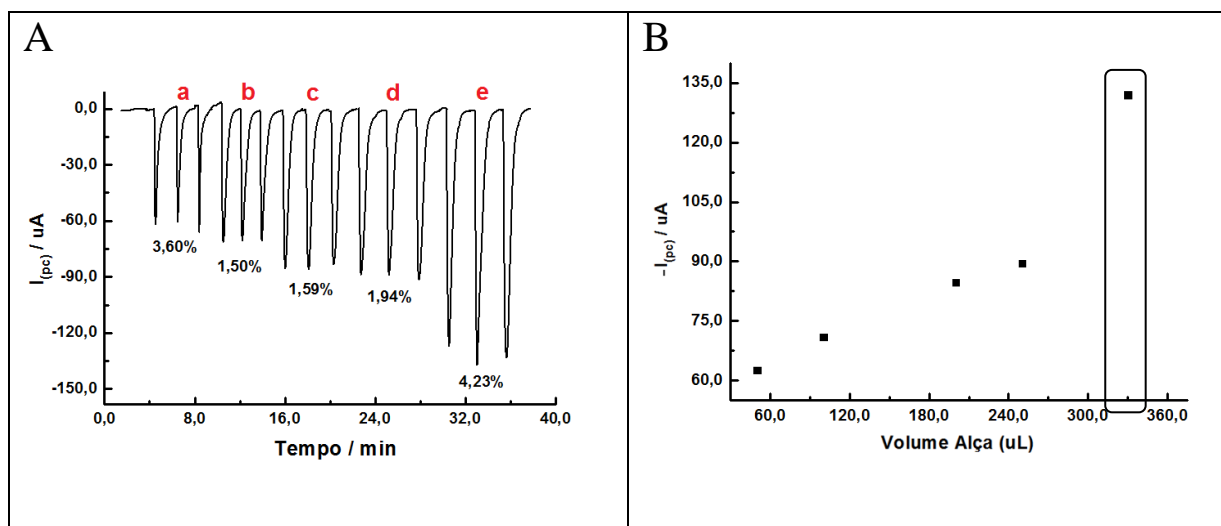
Pulso de E limpeza aplicado	DPR (N=10)
Amortecimento (0,0 V/10ms)	1,28 %
Limpeza (-1,15 V/100ms)	1,29 %
Limpeza (-1,20 V/100ms)	1,34 %
Limpeza (-1,25 V/100ms)	1,85 %
Limpeza (-1,30 V/100ms)	2,35 %

Como pode ser verificado na Tabela 4, não foi necessária uma aplicação de um pulso de potencial de limpeza visto que nesta situação foi obtida uma ótima repetibilidade com DPR de 1,28 % entre as medidas. O aumento do DPR quando se aplicava um pulso de potencial de limpeza em valores inferiores à $-1,20 \text{ V}$ pode está relacionado ao aumento da corrente capacitiva nesta região de potencial.

4.2.6 Otimização da vazão e alça de amostragem do sistema FIA

O volume da alça de amostragem, juntamente com a vazão do eletrólito no sistema, são parâmetros importantes a serem otimizados, vistos que estes influenciam numa análise satisfatória, tanto na sensibilidade quanto na frequência analítica do sistema. Desta forma, estes parâmetros foram avaliados cuidadosamente, garantindo sempre que o sinal obtido tivesse no mínimo 20 pontos por pico, que é o requisito necessário para ter-se um sinal reprodutível. Os volumes das alças estudados foram de: 50, 100, 200, 250, 330 μL , sendo esses resultados apresentados na Figura 22.

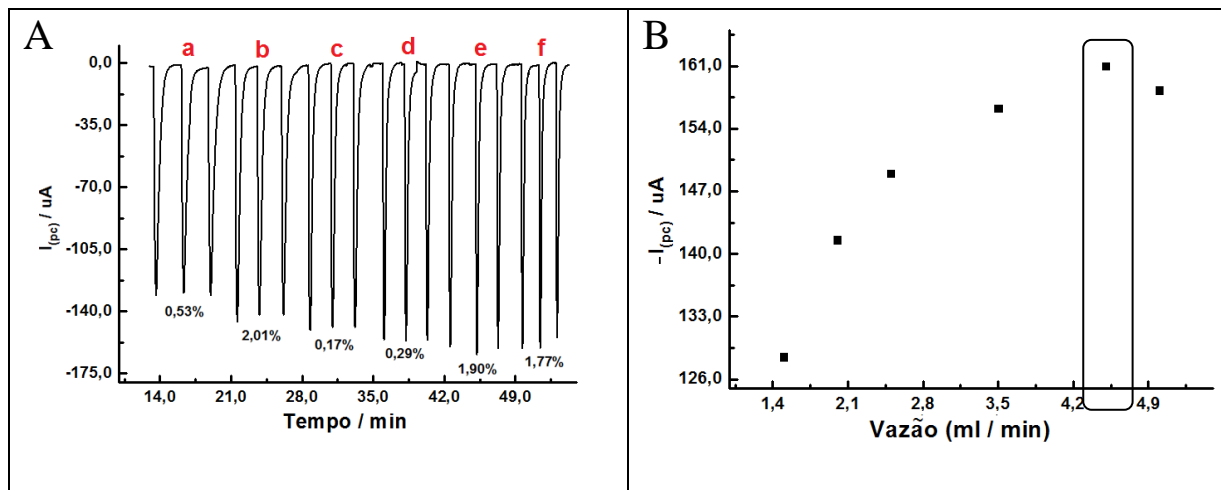
FIGURA 23: (A) Amperograma referente a escolha da alça de amostragem, sendo realizado a injeção em triplicata dos volumes 50,0; 100,0; 200,0; 250,0 e 330,0 μL com os respectivos valores do DPR de cada amostra injetada; (B) Valores da corrente catódica da CO em -1,1 V/30ms em função do volume de amostra injetado nos sistema FIA. Pulso de potencial gerador em +1,7 V por 500 ms e vazão fixa em 3,0 mL min^{-1} .



A Figura 23A é o FIagrama referente as injeções em triplicata realizada para cada alça de amostragem, com os respectivos valores de DPR. Como pode ser observado tanto em 23A quanto em 23B, um aumento dos valores da corrente catódica à medida que o volume de amostra aumenta. Isso é devido ao maior número de espécies geradas no potencial de oxidação quando se tem maiores quantidade de CO injetadas, porém acima de 250 μL observa-se um aumento representativo para 330 μL , mostrando que em volumes maiores, mais espécies são geradas e coletadas. Neste caso escolheu a alça de 330 μL , pois apresentou melhor sensibilidade na detecção da CO.

Em sequência foi avaliado o estudo da vazão do sistema FIA, injetando a CO, $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com as seguintes vazões: 1,5; 2,0; 2,5; 3,5; 4,5 e 5,0 mL min^{-1} . Na Figura 24 pode-se observar os valores obtidos da corrente catódica em -1,1 V em função da vazão investigada.

FIGURA 24: Valores da corrente catódica da CO em -1,1 V/30ms em função da vazão do sistema FIA. Pulso de potencial gerador em 1,7 V por 500 ms e alça de amostragem de 330 μL .



Pode-se observar na Figura 24 A o FIAgrama referente as injeções em triplicata realizada para cada vazão, com os respectivos valores de DPR. É possível observar em 24 B que em vazões maiores obtêm-se maiores sinais da corrente catódica. Apesar de vazões elevadas proporcionarem menor tempo para detecção no pulso de potencial coletor, até a vazão de 4,5 mL min^{-1} esse fenômeno não teve efeito no sistema de detecção e ainda contribui aumentando o sinal catódico do coletor. Isso pode ser explicado pelo aumento da sensibilidade na detecção do potencial gerador pela diminuição da camada de difusão de Nernst em vazões elevadas. Já na vazão de 5,0 mL min^{-1} observa-se um decréscimo da corrente no potencial coletor, que pode estar relacionada à remoção das espécies geradas na superfície do eletrodo de BDD em vazões muito altas.

Assim, a vazão de 4,5 mL min^{-1} e alça de 330 μL , ofereceram as condições ótimas para determinação do CO em função da maior sensibilidade e frequência analítica de aproximadamente 30 injeções por hora.

De acordo com os estudos realizados até o momento os parâmetros analíticos otimizados estão resumidos na Tabela 5, os quais serão aplicados para a determinação da CO, tanto em amostras farmacêutica quanto em urina por meio da detecção MPA em sistema FIA.

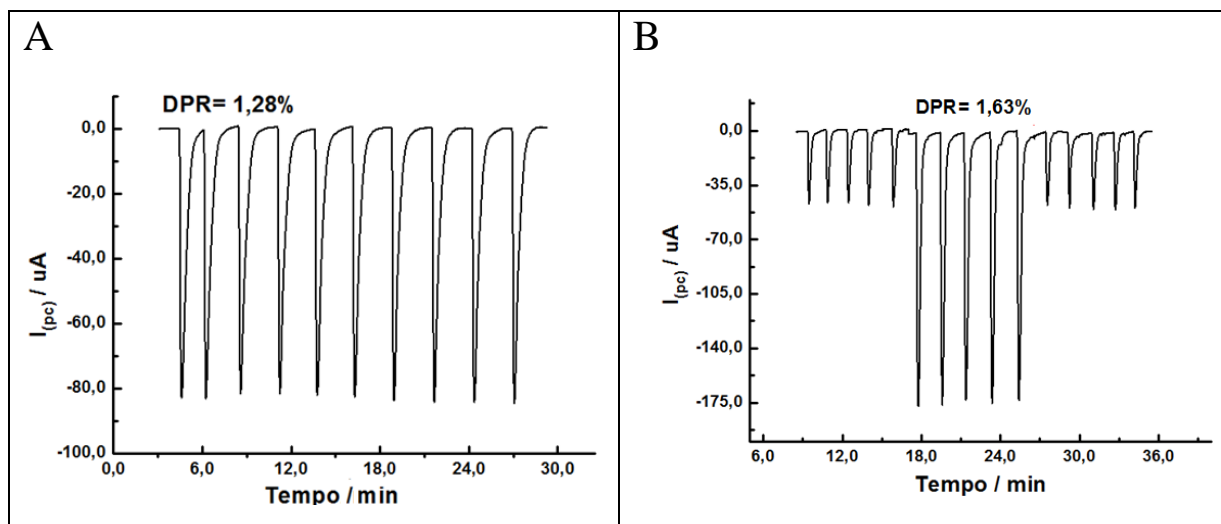
TABELA 5: Parâmetros otimizados para a detecção de CO em amostras farmacêuticas e urina através da detecção MPA em FIA

Parâmetros	Medicamento / Urina
Potenciais de Detecção / Tempo de Aplicação	+1,7 V / 500 ms -1,1 V / 30 ms
Vazão	4,5 mL min ⁻¹
Alça	330 µL

4.3 Estudos de repetibilidade

Um estudo prévio da repetibilidade analítica já foi mostrado na avaliação do pulso de potencial de limpeza, onde o DPR para 10 injeções de CO a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi de apenas 1,28 %, sendo o amperograma deste estudo apresentado na Figura 25 A. No entanto, as condições de vazão e alça foram alteradas em relação às condições anteriores. Com intuito de verificar se o DPR era mantido e se altas concentrações de CO podem influenciar no sinal deste analito em baixas concentrações, foi avaliado a repetibilidade da CO a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ antes e após a injeção de altas concentrações a $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Nesse sentido a Figura 25 B apresenta o sinal obtido por meio da injeção de 5 (cinco) soluções de CO a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, antes e após a injeção de CO $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

FIGURA 25: Amperogramas obtido pela detecção de FIA-MPA em (A) de 10 injeções consecutivas de CO $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e em (B) de 5 injeções de CO a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em seguida mais 5 de CO $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e 5 de CO $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Vazão de 3,0 e 4,5 mL min^{-1} e alça de 100 e 330 μL , respectivamente para (A) e (B), Pulsos de potencial aplicados 1,7V/500ms (não apresentado) e -1,1V/30ms.



Pode-se observar na Figura 25 que o DPR para CO a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em (24 A) e (24 B) são próximos, lembrando que nas novas condições mostrado em B, foram injetadas concentrações diferentes do padrão, mostrando que a estabilidade do sinal da CO manteve-se constante. De qualquer forma, é nítido que o eletrodo de BDD não é submetido a contaminação ou passivação significativa durante as análises da CO, que foi também confirmado pela diferença de apenas 3,8% entre as médias das cinco injeções de CO a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ antes e após 5 injeções de CO 10 vezes mais concentrada. Sendo assim, o método por FIA-MPA usando o eletrodo de BDD apresenta uma elevada precisão analítica para a detecção da CO, a qual é melhor do que os trabalhos relatados na literatura que utilizaram a detecção eletroquímica, onde esses obtiveram em torno de 5,3% para 5 e 10 medidas (ZHANG, 2006; ZHANG *et al.*, 2008).

O baixo DPR obtido pelo método proposto pode ser justificado pela associação de três fatores. Primeiro pelo emprego de um eletrodo altamente estável, como BDD que foi usado neste trabalho, segundo pelo acoplamento da detecção eletroquímica ao sistema FIA-MPA, que permitiu uma limpeza contínua da superfície do eletrodo de trabalho durante as análises e terceiro, vale destacar que, a aplicação de um pulso de limpeza proporcionou uma melhora na estabilidade do sinal eletroquímico.

4.4 Estudo da faixa linear e limite de detecção (LD)

Após a otimização de todos os parâmetros do método proposto, a fim de avaliar a faixa linear de trabalho da CO foram injetadas na menor concentração detectada de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ até valores de concentrações elevadas de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Através da curva obtida pela faixa linear calculamos os limites de detecção e quantificação do método. Os FIAgramas obtidos com injeções de soluções de concentrações crescentes de CO, (em triplicatas) juntamente com a curva analítica, são apresentados na Figura 26 e 27, mostrando que foram obtidas duas faixas lineares de trabalho, uma de 0,1 a $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a segunda de 20 a $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, ambas apresentando excelente coeficiente de regressão linear de 0,992 e 0,999, respectivamente.

FIGURA 26: FIAgrama obtido pela detecção MPA em FIA de soluções padrão de CO nas concentrações: 0,1 (a), 0,2 (b), 0,5 (c), 1,0 (d) e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (e). Pulsos de potencial aplicados: 1,7 V/500ms (não apresentado); -1,1 V/30ms. Vazão de $4,5 \text{ mL min}^{-1}$ e alça de $330 \mu\text{L}$. A curva de calibração é exibida ao lado.

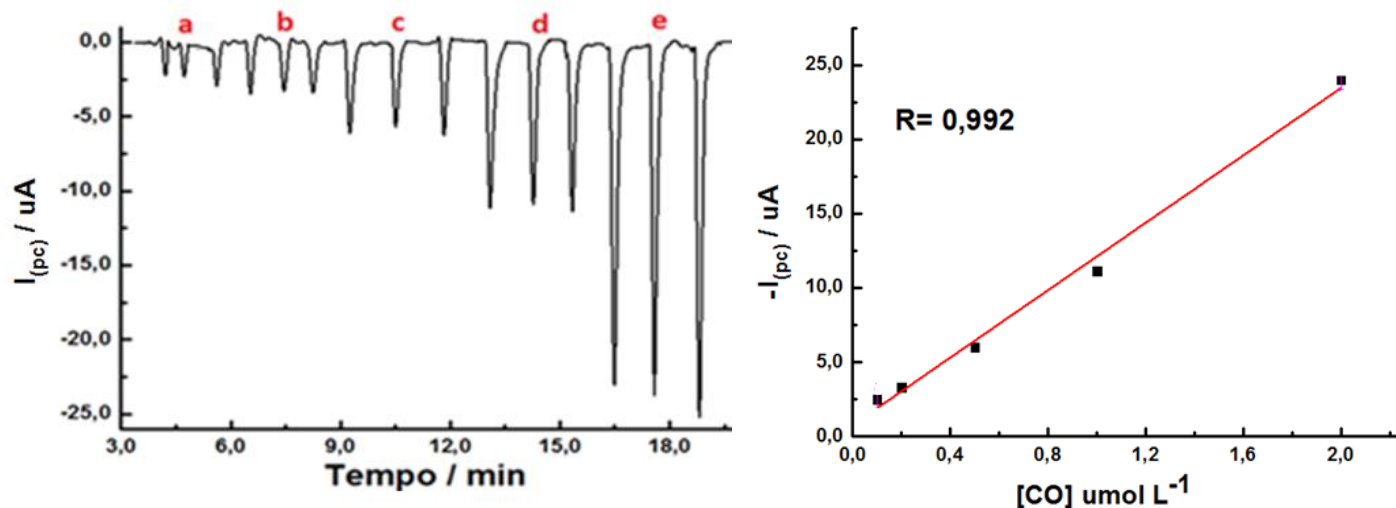
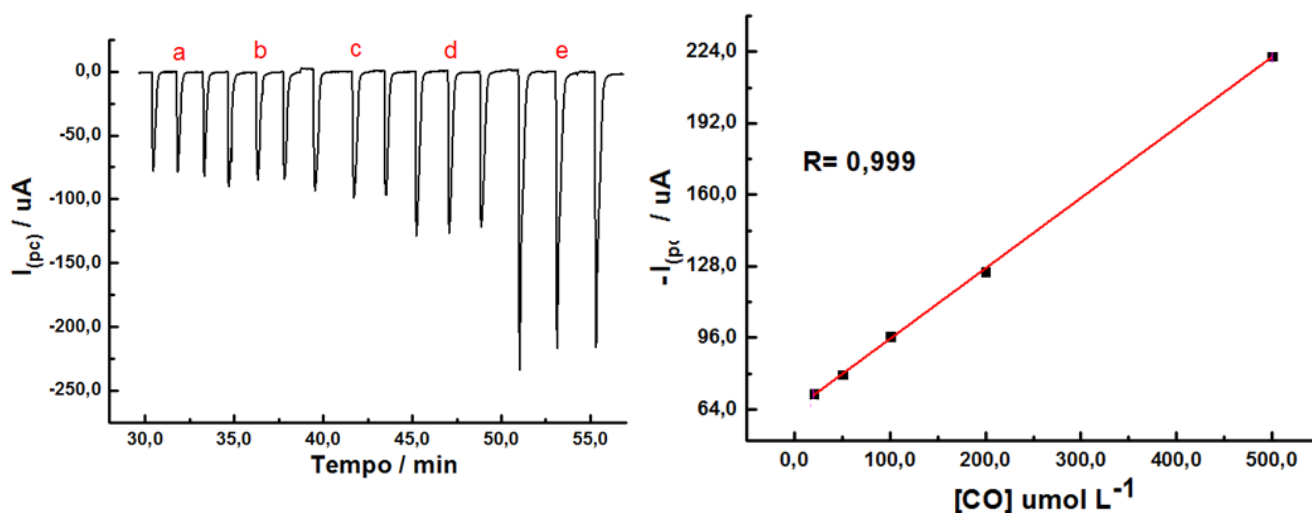


FIGURA 27: FIAgrama obtido pela detecção MPA em FIA de solução padrão de CO nas concentrações: 20,0 (a), 50,0 (b), 100,0 (c), 200,0 (d) e 500,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (e). Pulsos de potenciais: 1,7 V/500ms (não apresentado); -1,1 V/30ms. Vazão de 4,5 mL min^{-1} e alça de amostragem de 330 μL . A curva de calibração é exibida ao lado.



Por meio do FIAgrama da Figura 26 (menor faixa) e sua respectiva regressão linear foram calculados, conforme informado na parte experimental, os limites de detecção de $2,14 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e quantificação de $7,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1} \text{ mol L}^{-1}$.

Esses valores obtidos são menores aos métodos com detecção eletroquímica propostos na literatura. Cabe ressaltar que, o método investigado alcançou baixo limite de detecção, mesmo sem a modificação do eletrodo de trabalho, o que minimiza etapas e simplifica a aplicação da metodologia.

4.5 Validação e determinação da CO em formulações farmacêuticas.

A validação do método FIA-MPA para aplicação em formulações farmacêuticas foi feita através do estudo de adição e recuperação nessas amostras. Além disso, a validação foi também realizada por comparação do doseamento da CO nas formulações farmacêuticas obtido pelo método proposto e pelo método oficial (HPLC-UV). Esses resultados são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

TABELA 6: Resultados dos estudos de adição e recuperação na amostra farmacêutica de CO. Estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão relativo apresentado após sinal \pm .

Marca	CO encontrada	CO	CO	Recuperação
Medicamento	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	adicionada	Recuperada	(%)
		($\mu\text{mol L}^{-1}$)	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
Cixin	$2,2 \pm 0,003$	2,0	$4,2 \pm 0,003$	100,24

TABELA 7: Doseamento da CO em formulação farmacêutica por FIA-MPA e HPLC-UV. Estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão relativo é apresentado após sinal \pm .

Marca	CO	Doseamento	Doseamento
Medicamento	Rotulado (mg)	FIA-MPA	HPLC-UV
		(mg)	(mg)
Cixin	0,500	$0,541 \pm 0,001$	$0,543 \pm 0,004$

Os estudos de adição e recuperação sobre amostras farmacêuticas apresentaram recuperação em torno de 100%, conforme mostrado na Tabela 6. Estes resultados implicam que a metodologia utilizada é eficiente na determinação de CO em amostras farmacêuticas sem ser influenciada pelo efeito de matriz, ou seja, os excipientes presentes não interferem na determinação e quantificação da CO.

Como observado na Tabela 7, o doseamento a CO no medicamento foi em torno de 108 % em ambos os métodos, pela Farmacopéia Brasileira volume 1 (ANVISA, 2010) os limites de variações para fármacos como CO são de 10%, neste caso os valores obtidos estão dentro dos valores permitidos, lembrando que na Farmacopeia não é especificado em caso de medicamentos de baixo índice terapêutico. Os cromatogramas obtidos na análise encontram-se em anexo.

A fim de confirmar a semelhança entre os resultados obtidos da Tabela 7 pelo método proposto e por HPLC-UV foram aplicados os testes estatísticos t e F sobre esses dados. Na Tabela 8 está representada a comparação estatística dos métodos, os quais apresentaram valores calculados menores que os valores críticos tabelados, indicando que os resultados e desvios encontrados nas duas metodologias analisadas são semelhantes com nível de confiança de 95%.

TABELA 8: Testes *F* e *t* dos resultados para doseamento da CO na Tabela 7

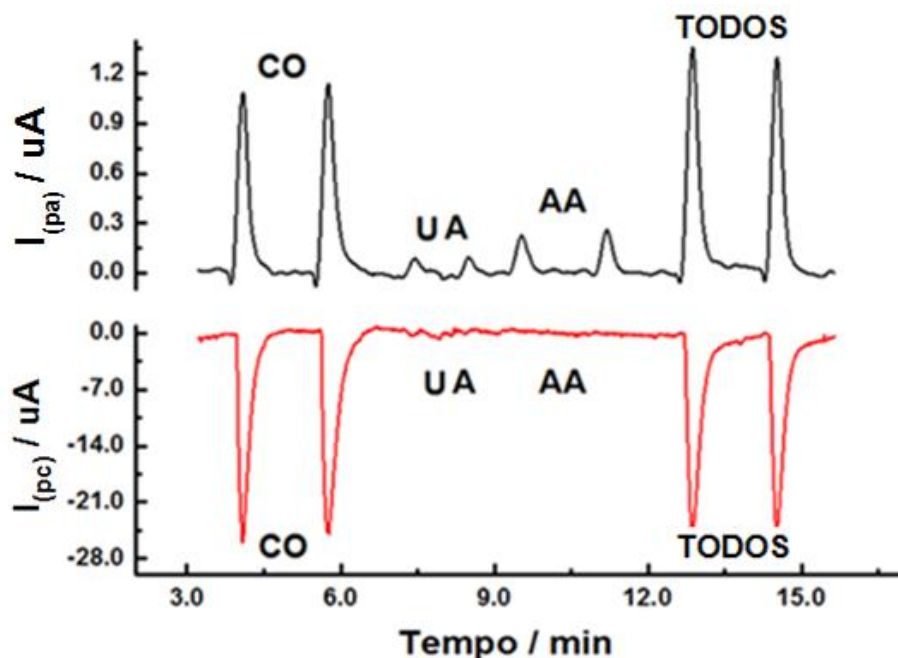
Teste <i>F</i>			Teste <i>t</i>		
F calculado	F crítico	Parecer	t calculado	t crítico	Parecer
12,96	19,00	Semelhantes	2,77	2,78	Semelhantes

4.6 Avaliação de interferência de ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) para a determinação em urina

Como o comportamento eletroquímico do fármaco CO mostrou um processo de redução sobre o eletrodo de BDD, despertou-se um grande interesse para análises desse composto em urina. Porém é necessário avaliar os principais interferentes eletroquímicos presentes neste tipo de amostras, os quais já foram apresentados na introdução deste trabalho, que são o AA e AU.

Como demonstrado no VC da Figura 18 o AA e AU não apresentaram processo de redução sobre o eletrodo de trabalho de DDB. Em virtude disto foi realizado um estudo para saber até qual concentração de AA e AU não afetaria o sinal analítico da CO em -1,1 V durante a análise. No entanto, verificou-se que o AA e AU estavam reagindo com a CO oxidada na superfície do eletrodo, diminuindo o sinal de pico de redução em -1,1 V para CO. Esse comportamento já foi relatado por dos Santos e colaboradores para determinação de Dopamina na presença de AA (GIMENES *et al.*, 2009). Os autores avaliaram que a reação química entre AA e Dopamina era inibida em meios mais ácidos, sendo usado um eletrólito de 0,2 mol L⁻¹ de H₂SO₄ para minimizar a interferência de AA. Da mesma forma, foi realizada uma avaliação da diminuição do sinal do pico de redução da CO em função da concentração ácida do meio na presença de AA e AU. Os melhores resultados foram obtidos em meio de ácido sulfúrico 0,3 mol L⁻¹, como pode ser observado na Figura 28 onde o sinal da CO não é atenuado na presença de AA e AU.

FIGURA 28: Amperogramas obtidos pela detecção MPA em (-) 1,7 V/500ms; (-) -1,1 V/30ms de injeções em duplicata das soluções contendo apenas CO, apenas AA, apenas AU e aos três juntos, sendo todos na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As demais condições são as mesmas da Tabela 5.



Posteriormente, avaliou-se a interferência no sinal da CO em concentrações crescentes dos interferentes, pois estes estarão presentes na amostra em quantidade superiores a CO. Esses estudos estão apresentados nas Tabelas 9 e 10, no qual é mostrada a variação média do sinal da CO em porcentagem após injeções em triplicata contendo concentrações crescentes dos interferentes.

TABELA 9: Estudo da interferência de AA no sinal de CO a $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtido em -1,1V/30ms pelo método FIA-MPA. As condições da análise são as mesmas da Tabela 5.

Proporção molar CO / AU	Sinal da CO (%)
1:0	100,00
1:1	100,49
1:5	100,49
1:10	99,68
1:25	103,70
1:50	101,16
1:100	104,20

De acordo com a Tabela 9, pode-se observar que não houve nenhuma variação acentuada do sinal da CO para a presença de até 100 vezes mais de AA. Isso significa que é possível analisar a CO em urina na presença de até 35,22 mg L⁻¹ de AA, o que seria possível analisar somente pacientes que tivessem até esse nível de AA na urina.

TABELA 10: Estudo da interferência de AU no sinal de CO em -1,1V/30ms pelo método FIA-MPA. As condições da análise são as mesmas da Tabela 5.

Proporção molar CO / AU	Sinal da CO (%)
1:0	100,00
1:1	100,07
1:5	101,33
1:10	101,56
1:25	98,59
1:50	105,00

Como pode ser visualizado na Tabela 10, o fenômeno observado foi semelhante ao acontecido para o AA até a proporção de 1:50, onde não observa-se uma interferência significativa de AU. Nesse caso é possível analisar a CO em urina na presença de até 16,81 mg L⁻¹ de AU, que seria possível analisar somente pacientes que tivessem até esse nível de AU na urina. Cabe ressaltar que, acima de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ o AU não é solúvel no eletrólito utilizado.

Após o estudo realizado sobre a interferência de AA e AU na determinação do fármaco CO, foi realizado a análise de adição e recuperação de padrão da CO em amostra de urina. Os estudos de adição e recuperação obtidos foram de 98,5 %, conforme é mostrada na Tabela 11, indicando uma ausência do efeito de matriz nesta amostra pelo método proposto.

TABELA 11: Estudos de adição e recuperação em amostra de urina. Estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão relativo é apresentado após sinal \pm . As condições instrumentais são as mesmas da Tabela 5.

Amostra	Adição ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Urina	2,0	1,97 \pm 0,05	98,5

4.7 Comparação entre parâmetros analítico dos métodos eletroquímicos da literatura e o FIA-MPA

Na Tabela 12 se encontram alguns parâmetros analíticos de outros trabalhos, como: repetibilidade, LD, faixa linear e tipo de amostra aplicada para determinação de CO em comparação com método proposto.

TABELA 12: Comparação dos parâmetros analíticos obtidos pelo método proposto e outros métodos eletroanalíticos descrito na literatura para a determinação de CO.

Técnica Eletroanalítica	Eletrodo de Trabalho	Faixa linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD $\mu\text{mol L}^{-1}$	DPR (%)	Amostras	Ref.
VPD	GCE/AB-DHP	0,1 a 40	0,04	5,3 (n=10)	Biol.	(Zhang, 2006)
VPD	PoPD/SWNTs/ GCEs	0,1 a 10	0,035	5,3 (n=5)	Farm.	(Zhang et al, 2008)
VPD	SPEs	0,21 a 3,0	0,103	–	Farm.	(Bodoki et al, 2008)
FIA-MPA Esse trabalho	BDD	0,1 a 2,0 e 20 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,021	1,28 (n=10)	Farm. e Biol.	Esse trabalho

A Tabela 12 mostra alguns parâmetros analíticos obtidos pelo método proposto para a determinação de CO e observamos que todos os parâmetros estão melhores pelo método FIA-

MPA utilizando o eletrodo de trabalho de BDD. Pode-se destacar que o método proposto apresenta uma ampla faixa linear, LD inferior aos apresentados e um DPR excelente, além disso o eletrodo utilizado neste trabalho não é modificado como os relatados na literatura, oferecendo uma maior simplicidade na aplicação do método. Além disso, o método proposto realizou análises em amostras farmacêuticas e biológicas apresentando excelente resultado, já os outros trabalhos apresentados realizaram análises em apenas um tipo de amostras. Outra vantagem do método FIA-MPA é a possibilidade de determinar se o fármaco CO está puro nas amostras, através da razão do sinal obtido no potencial gerador e coletor, conforme já relatado para outros fármacos por dos Santos Colaboradores, como no caso da Nimesulida (LIMA *et al.*, 2013).

5.0 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresentou um novo método eletroanalítico para a quantificação do CO em formulações farmacêuticas e em urina.

O método proposto por FIA-MPA usando o eletrodo de BDD demonstrou vantagens em relação ao método oficial para quantificação de CO em formulação farmacêutica e os demais métodos cromatográficos, visto que, de forma simples e rápida, a detecção da CO pela técnica eletroanalítica em fluxo proporcionou uma análise com alta precisão e baixa geração de resíduos, sendo realizada até 30 injeções por hora de CO. Além disso, todo sistema proposto para determinação da CO oferece custo de aquisição e aplicação mais baixos que os sistemas cromatográficos, sendo uma alternativa bastante viável para análises de rotina pelas indústrias farmacêuticas, bem como torna exequível o controle de qualidade deste medicamento pelas farmácias de manipulação.

Outra contribuição importante é a utilização de um eletrodo não modificado para análises farmacêuticas, pois na literatura são descritos métodos eletroquímicos que apresentam eletrodos modificados, o que torna o método complexo para aplicação em análises de rotina. Neste quesito, o uso do eletrodo de BDD proporcionou mais simplicidade e maior reprodutibilidade do método em comparação aos demais eletrodos utilizados até o momento na literatura. Desta forma, o método por FIA-MPA usando eletrodo de BDD foi validado por estudos de adição e recuperação da CO em formulações farmacêuticas e por comparação com a metodologia oficial para o doseamento deste fármaco em medicamentos.

A determinação da CO pelo processo de redução usando a detecção FIA-MPA possibilitou a análise deste fármaco em urina na presença de AU e AA, podendo estes interferentes estarem em concentrações de até 50 e 100 vezes respectivamente maiores que o analito. A recuperação de 98,5 % da CO em urina e o baixo limite de detecção alcançado pelo método proposto mostra que é possível analisar a CO neste tipo de amostra, viabilizando estudos farmacológicos para medicamentos contendo esse princípio ativo.

Finalmente, o desenvolvimento deste trabalho mostrou a potencialidade da detecção MPA em fluxo para análises de fármacos eletroativos, abrindo grandes perspectivas de aplicação deste método no controle de qualidade pelo setor farmacêutico para outros fármacos eletroativos. Além disso, há perspectiva de aplicação da detecção MPA em fluxo para determinação de outros fármacos (com processo redox) em amostras de fluidos biológicos.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, G.; TALIO, M. C.; LUCONI, M. O.; HINZE, W. L.; FERNANDEZ, L. P. Fluorescence method using on-line sodium cholate coacervate surfactant mediated extraction for the flow injections analysis of Rhodamine B. **Talanta**, v. 129, p. 516-522, 2014.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); **Resolução RE nº 899, de 25/05/2003**.

ANVISA, **Farmacopeia Brasileira 5ª edição**, vol. 1, 2010, Brasília-DF: Anvisa 545.

ANVISA, **Farmacopeia Brasileira 5ª edição**, vol. 2, 2010, Brasília-DF: Anvisa 853.

ANVISA Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº. 67, 8 de Outubro de 2007.

ARRIBAS, A. S.; FERNANDEZ, M. M.; MORENO, M.; BERMEJO, E.; ZAPARDIEL, A.; CHICHARRO, M. Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes. **Food Chemistry**, v. 136, p.1183-1192, 2013.

BARROS, R. C. M.; RIBEIRO, M. C.; NA-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. S.; SERRANO, S. H. P. Filmes de diamante VCD dopado com boro, parte I: histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 317-325, 2005.

BIPARVA, P.; ABEDIRAD, S. M.; KAZEMI, S. Y. ZnO nanoparticles as a mimetic-mediated flow-injection chemiluminescence system for sensitive determination of carvedilol. **Talanta**, v. 130, p.116-121, 2014.

BODOKI, E.; LASCHI, S.; PALCHETTI, I.; SÂNDULESCU, R.; MASCINI, M. Electrochemical behavior of colchicines using graphite-based screen-printed electrodes. **Talanta**, v. 76, p. 288-294, 2008.

BODOKI, E.; VLASE, L.; SÂNDULESCU, R. Mechanistic study of colchicine's reduction behavior. **Electrochemistry Communications**, v. 56, p. 51-55, 2015.

BRETT, A. M.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Oxford University Press, p. 180, 463, 1993.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, Keith L.; Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro, 2005.

BRYCHT, M.; SKRZYPEK, S.; KACZMARSKA, K.; BURNAT, B.; LENIART, A.; GUTOWSKA, N. Square-wave voltammetric determination of fungicide fenfuram in real samples on bare boron-doped diamond electrode, and its corrosion properties on stainless steels used to produce agricultural tools. **Electrochimica Acta**. v. 169, p. 117-125, 2015.

CARREIRA, F.C. Determinação de parabenos em antitranspirantes empregando voltametria sob eletrodo de diamante e cromatografia de alta eficiência. Dissertação, Mestrado em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2008.

CHAILAPAKUL. O.; SIANGPROH, W.; TRYK, D. A. Boron-doped diamond-based sensors: A Review. **Sensor Letters**, v. 4 (2), p. 99, 2006.

DEFTEREOS, S.; GINNOPOULOS, G.; PAPOUTSIDAKIS, N.; PANAGOPOULOU, V.; KOSSYVAKIS, C.; RAISAKIS, K.; CLEMAN, M. W.; STEFANADIS, C. Colchicine and the heart. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n.20, 2013.

DE MIRANDA, J. A. T.; Determinação de aspirina e ácido ascórbico em medicamentos usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2011.

DRESSELHAUS, M. S.; Future directions in carbon science. **Annual Review of Materials Science**, v. 27, p. 1-34, 1997.

DORNELLAS, R. M.; MUNOZ, R. A. A.; AUCELIO, R. Q. Electrochemical determination of picoxystrobin on boron-doped diamond electrode: Square-wave voltammetry versus BIA-multiple pulse amperometry. **Microchemical Journal**, v.123, p. 1-8, 2015.

DOS SANTOS, W. T. P.; GIMENES, D. T.; RICHER, E. M.; ANGNES, L. Análise por injeção em fluxo e detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações, **Química Nova**, v. 34, p.1753, 2011.

ENYASHIN, A. N.; IVANOVSKII, A. L.; Structural and electronic properties of new 1D and 2D carbon allotropes with mixed $sp^1 - sp^3$ hybridization types. **Chemical Physics Letters**. v. 609, p. 15 – 20, 2014.

Especificação do Produto AA:
<http://www.fca.unicamp.br/portal/images/Documentos/FISPOs/FISPO-%20Acido%20Ascorbico.pdf>. Acesso em 5 de julho de 2015.

Especificação do Produto AU:
<http://www.inr.gob.mx/Descargas/bioSeguridad/acidoUrico.pdf>

FENG, X.; GAN, N.; ZHANG, H.; YAN, Q.; LI, T.; CAO, Y.; HU, F.; YU, H.; JIANG, Q. A novel strategy for multiplexed immunoassay of tumor markers based on electrochemiluminescence coupled with cyclic voltammetry using grapheme-polymer nanotags. **Electrochimica Acta**, v. 170, p.292-299, 2015.

GANDINI, D.; MICHAUD, P.; DUO, I.; MAHÉ, E.; HAENNI, W.; PERRET, A.; COMNINELLIS, C. Electrochemical Behavior of Synthetic Boron-Doped Diamond Thin Film Anod. **New Diamond and Fronteir Carbon Tecnology**, v.9, p.303-316, 1999.

GIMENES, D. T.; DOS SANTOS, W. T. P.; TOMIN, T. F.; MUNOZ, R. A. A.; RICHER, E. M. Flow-Injection Amperometric method for indirect determination of Dopamine in the presence of a large excesso f Ascorbic acid. **Electroanalysis**, 2009.

GIMENES, D. T.; DOS SANTOS, W. T. PIO.; MUNOZ, R. A. A.; RICHER, E. M. Internal Standard in flow inject analysis with amperometric detection. **Electrochemistry Communications**, v.12, p. 216, 2010.

GIMENES, D. T.; MARRA, M. C.; FREITAS, J. M.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron – doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 212, p. 411-418, 2015.

GOODMAN & GILMAN: As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro, 2005

GIRARD, H.; SIMON, N.; BALLUTAUD, D.; HERLEM, M.; ETCHEBERRY, A. Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes. **Diamond and Related Materials**. V.16, p. 316-325, 2007.

GRANGER, M. C.; SWAIN, M. G.; The influence of surface interactions on the reversibility of ferri/ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes. **J. Electrochem. Soc.**, v.146, p.4551, 1999.

GUERREIRO, J. R. L.; KAMEL, A. H.; SALES, M. G. F. FIA potentiometric system based on periodate polymeric membrane sensor for the assessment of ascorbic acid in commercial drinks. **Food Chemistry**, v. 120, p.934-939, 2010.

HAMSCHER, G.; PRIESS, B.; NAU, H.; PANARITI, E. Determination of colchicines residues in sheep serum and milk using high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. **Anal Chem**, v. 77, p. 2421-2425, 2005.

HESSE, S.; RISTAU, T.; EINAX, J. W. Chemical vapor generation by coupling high-pressure liquid flow injection to high-resolution continuum source hydride generation atomic absorption spectrometry for determination of arsenic. **Microchemical Journal**, v. 123, p.42-50, 2015.

Instituto Nacional de Metrologia, **Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)**; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

IVANDINI, T. A.; RAO, T. N.; FUJISHIMA, A.; EINAGA, Y. Electrochemical oxidation of oxalic acid at highly boron-doped diamond electrodes. **Anal Chemistry**, v. 78, p. 3467, 2006.

JUNIOR, A. C. V. L.; Determinação de sildenafila (Viagra) e carbamazepina em formulações farmacêuticas por amperometria de múltiplos pulsos em sistema FIA. Tese, Mestrado em Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, 2012.

KO, R. J.; LI, W. Y.; KODA, R. T. Determination of the antimitotic agents N-desacetylcolchicine, demecolcine and colchicines in serum and urine. **Journal of Chromatography**, v. 525, p.411-418, 1990.

KUZMANOVIC, D.; STANKOVIC, D. M.; MANOJLOVIC, D.; KALCHER, K.; ROGLIC, G. Baicalein – main active flavonoid from *Scutellaria baicalensis* 0 voltammetric sensing in human samples using boron doped diamond electrode. **Diamond & Related Materials**, v. 58, p. 35-39, 2015.

LIMA, A. B.; CHAVES, S. C.; DA SILVA, L. M.; RICHTER, E. M. SANTOS, W. T. P. Determinação de nimesulida por análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos. **Química Nova**, v. 36, p. 1296-1302, 2013.

LUI, L.; MA, Q.; LI, Y.; LUI, Z.; SU, X. Detection of biothiols in human serum by QDs based flow injection “turn off-on” chemiluminescence analysis system. **Talanta**, v.114, p.243-247, 2013.

MAGHRABEY, M. E.; KISHIKAWA, N.; OHYAMA, K.; IMAZATO, T.; UEKI, Y.; KURODA, N. Determination of human serum semicarbazide-sensitive amine oxidase activity via flow injection analysis with fluorescence detection after online derivatization of the enzymatically produced benzaldehyde with 1,2-diaminoanthraquinone. **Analytical Chimica Acta**, v.881, p. 139-147, 2015.

MARTINELLO, F. Interferência do ácido ascórbico em determinações bioquímicas. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde, Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

MASEK, A.; CHRZESCIJANSKA, E.; ZABORSKI, M. Electrooxidation of morin hydrate at a Pt electrode studied by cyclic voltammtry. **Food Chemistry**, v. 148, p. 18-23, 2014.

MCMURRY, J. Química Orgânica Volume 1 e 2, São Paulo: Pioneira Thonson, 2005.

MHAMMEDI, M. A.; ACHAK, M.; BAKASSE, M.; CHTAINI, A.; Electrochemical determination of para-nitrophenol at apatite-modified carbon paste electrode: Application in river water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 323-328, 2009.

MIRANDA, J. A. T.; CUNHA, R. R.; GIMENES, T. D.; MUNOZ, R. A. A.; RICHER, E. M. Determinação simultânea de ácido ascórbico e acetilsalicílico usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica pulsada. **Química Nova**, v. 37, p. 1459-1463, 2012.

MROCZKIEWIEZ, M.; BRONOWSKA, A.; PIETRZAK, M.; MALINOWSKA, E. Different methods of acid phosphatase immobilization for its application in FIA systems with potentiometric detection. **Procedia Engineering**, v. 47, p. 265-268, 2012.

OLIVEIRA, F. M.; MARCHIONI, C.; BARROS, J. A. V. A.; LAGO, A, C.; WISNIEWSKI, C.; LUCCAS, P. O. Assessment of cadmium and iron adsorption in sediment, employing a flow injection analysis system with on line filtration and detection by flame atomic absorption spectrometry and thermosplay flame furnace atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.809, p.82-87, 2014.

PETTERMAN, C.; BEM-CHETRIT, E.; CARACO, Y, LEVY, M. Colchicine Intoxication: Clinical pharmacology, risc factors features, and management. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 21, p. 143-155, 1991.

PLESKOV, Y. V.; Electrochemistry of Diamond: A review. **Russian Journal of Electrochemistry**, vol. 38, n.12, p.1275-1291, 2002.

PREECHAWORAPUN, A.; CHUANUWATANAKUL, S.; EINAGA, Y.; GRUDPAN, K.; MOTOMIKU, S.; CHAILAPAKUL, O. Electroanalysis of sulfonamides by flow injection system/high-performance liquid chromatography coupled with amperometric detection using boron-doped diamond electrode. **Talanta**, V. 68, p. 1726 – 1731, 2006.

QUINTINO, M.S. Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a BATCH Injection Analysis (BIA) para aplicações analíticas – Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, 6-8, 2003.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Bia-amperometric quantification of salbutamol in pharmaceutical products. **Talanta**, v. 62, p. 231-236, 2004.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Fast BIA-amperometric determination of isoniazid in tablets. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 400-404, 2006.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses. Part I. New concept of fast continuous flow analysis. **Anal. Chim. Acta**, v.78, n.1, p.145-157, 1975.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Analytical Chimica Acta**, v.78, p. 145, 1975.

IWAKI, M.; SATO, S.; TAKAHASHI, K.; SAKAIRI, H. Electrical Conductivity of nitrogen and argon implanted diamond. **Nuclear Instruments and Methods**, v. 201-210, p. 1129-1133, 1983.

SARTORI, E. J. R.; Determinação voltamétrica de analitos de farmacêutico utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro. Tese, Doutorado em ciências (Química Analítica), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2009.

SALAZAR-BANDA, G. R.; DE DARVALHO, A. E.; ANDRADE, L. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments. **Food Chem.** v. 20, p.1817-1827, 2010.

Especificação do Produto CO: SIGMAALDRICH, <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>, Acesso em 06 de julho de 2015.

SILVIA, R. P. Aplicações Analíticas de Eletrodos Quimicamente Modificados por Espécies de Interesse Biológico. Dissertação de Mestrado; Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2007**

SILVIA, R. P. D.; LIMA, A. W. O.; SERRANO, S. H. P. Simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a pyrolytic graphite electrode modified into dopamine solution. **Analytica Chimica Acta**, v. 612, p.89-98, 2008.

SILVIA, W. C.; Determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2011.

SIMON, N.; GIRARD, H.;BALLUTAUD, D.; GHODBANE, S.; DENEUVILLE, A.; HERLEM, M.; ETCHEBERRY,A. Effect of H and O termination on the charge transfer of moderately boron doped diamond electrodes. **Diamond and Related Materials.** v.14, p. 1179-1182, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios da Análise Instrumental. Editora Bookman, ed. 2002.

SLOBODNICK, A.; SHAH, B.; PILLINGER, M. H.; KRASNOKUTSKY, S. Colchicine: Old and new. **The American Journal of Medicine**, v. 128, p.461-470, 2015.

STANKOVIC, D. M.; KALCHER, K. The immunosuppressive drug – Rapamycin – Electroanalytical Sensing using Boron – Doped Diamond electrode. **Electrochimica Acta**. v. 168, p. 76-81, 2015.

SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; FILHO, R. C. R.; AVACA, L. A. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pré-tratment. **Electrochimica Acta**. v. 49, p. 4021-4026, 2004.

TERADAL, N. L.; NARAYAN, P. S.; SATPATI, S. K.; SEETHARAMAPPA, J. Fabrication of electrochemical sensor based on green reduction of grapheme oxide for an antimigraine drug, rizatriptan benzoate. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 196, p. 596-603, 2014.

TRACQUI, A.; KINTZ, P.; LUDES, B.; ROUGE, C.; DOUIBI, H.; MANGIN, P. High-performance liquid chromatography coupled to ion spray mass spectrometry for the determination of colchicines at ppb levels in human biofluids. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 675, p. 235-242, 1996.

TROJANOWICZ, M.; SZEWCZYNSKAS, M.; WCISLO, M. Review: Electroanalytical flow measurements-recent advances. **Electroanalysis**, 2003.

WALLACE, S. L. Colchicine. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.3, p.369-381, 1974.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 3 ed. New jersey: John Wiley e Sons, 2006.

YAGI, I.; NOTSU, H.; KONDO, T.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes. **J. Electroanal. Chem**, v. 473, p.173, 1999.

YANO, H. M.; BUGNO, A.; AURICCHIO, M. T. Intoxication by Colchicine in a compounded pharmaceutical formulation, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, vol. 67, p. 1181, 2008.

YU, X. Y.; LIU, Z. G.; HUANG, X. J. Nanostructured metal oxides/hydroxides-based electrochemical sensor for monitoring environmental micropollutants. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**. V3-4, p. 28-35, 2014.

ZHANG, H. Electrochemistry and voltammetric determination of colchicines using an acetylene black-dihexadecyl hydrogen phosphate composite film modified glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 68, p. 197-201, 2006.

ZHANG, X. H.; WANG, S. M.; JIA, L.; XU, Z. X.; ZENG, Y. Electrochemical properties of colchicines on the PoPD/SWNTs composite-modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.134, p.477-482, 2008.

7.0 ANEXO



SHIMADZU
LabSolutions

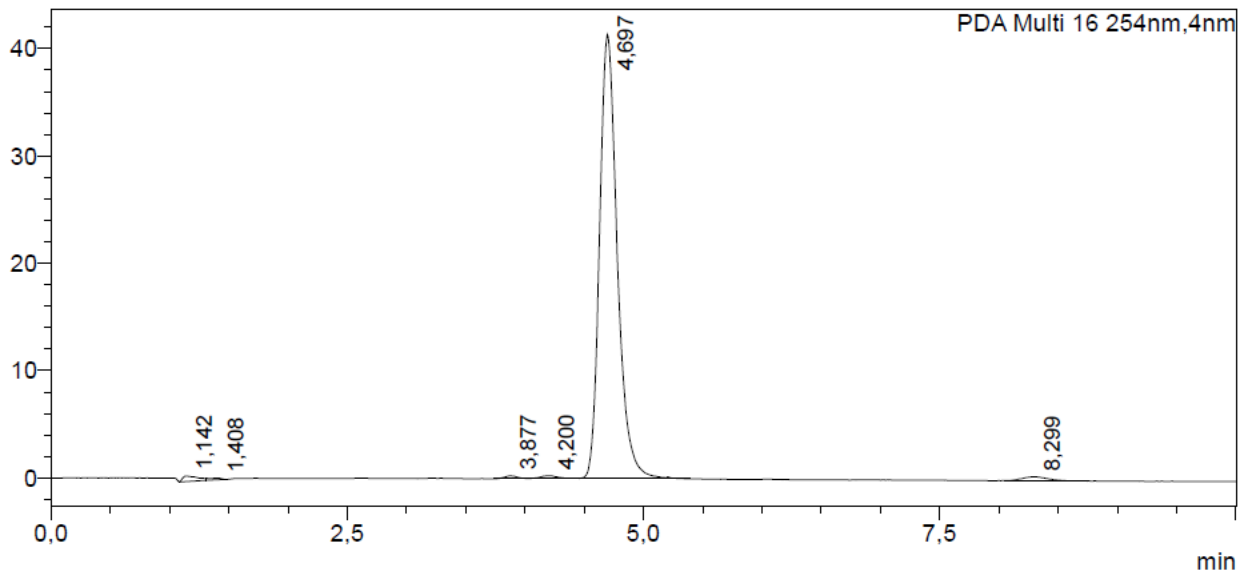
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: COLCHICINA PADRAO	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: COLCHICINA PADRAO	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: Colchicina padrão 1505 R2.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: METODO COLCHICINA.lcm		
Batch Filename	:		
Vial #	: 10		
Injection Volume	: 20 uL		
Date Acquired	: 15/05/2015 11:00:42		
Date Processed	: 15/05/2015 11:10:45		

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA Ch16 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1,142	4486	517	0,000			
2	1,408	1385	162	0,000		V	
3	3,877	2120	267	0,000			
4	4,200	3022	287	0,000		V	
5	4,697	431166	41366	0,000		V	
6	8,299	5224	366	0,000			
Total		447402	42965				

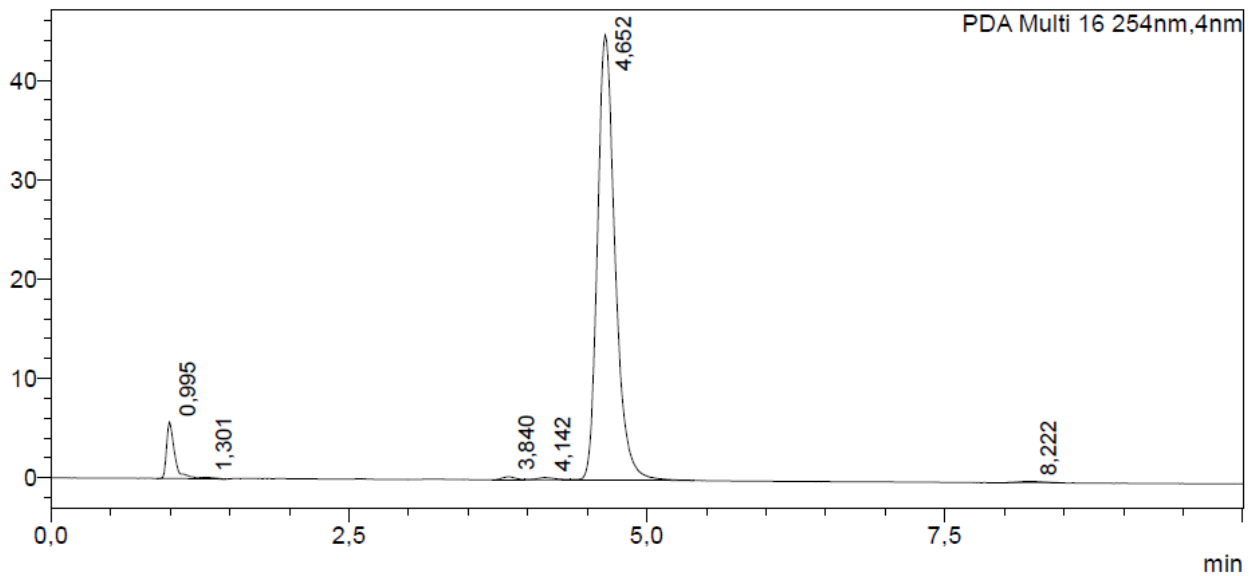


<Sample Information>

Sample Name	: Farmaco CO	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: Farmaco CO		
Data Filename	: Medicamento Colchicina R1.lcd		
Method Filename	: METODO COLCHICINA.lcm		
Batch Filename	:		
Vial #	: 11		
Injection Volume	: 20 uL		
Date Acquired	: 15/05/2015 11:48:19	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 15/05/2015 11:58:22	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>

mAU



min

<Peak Table>

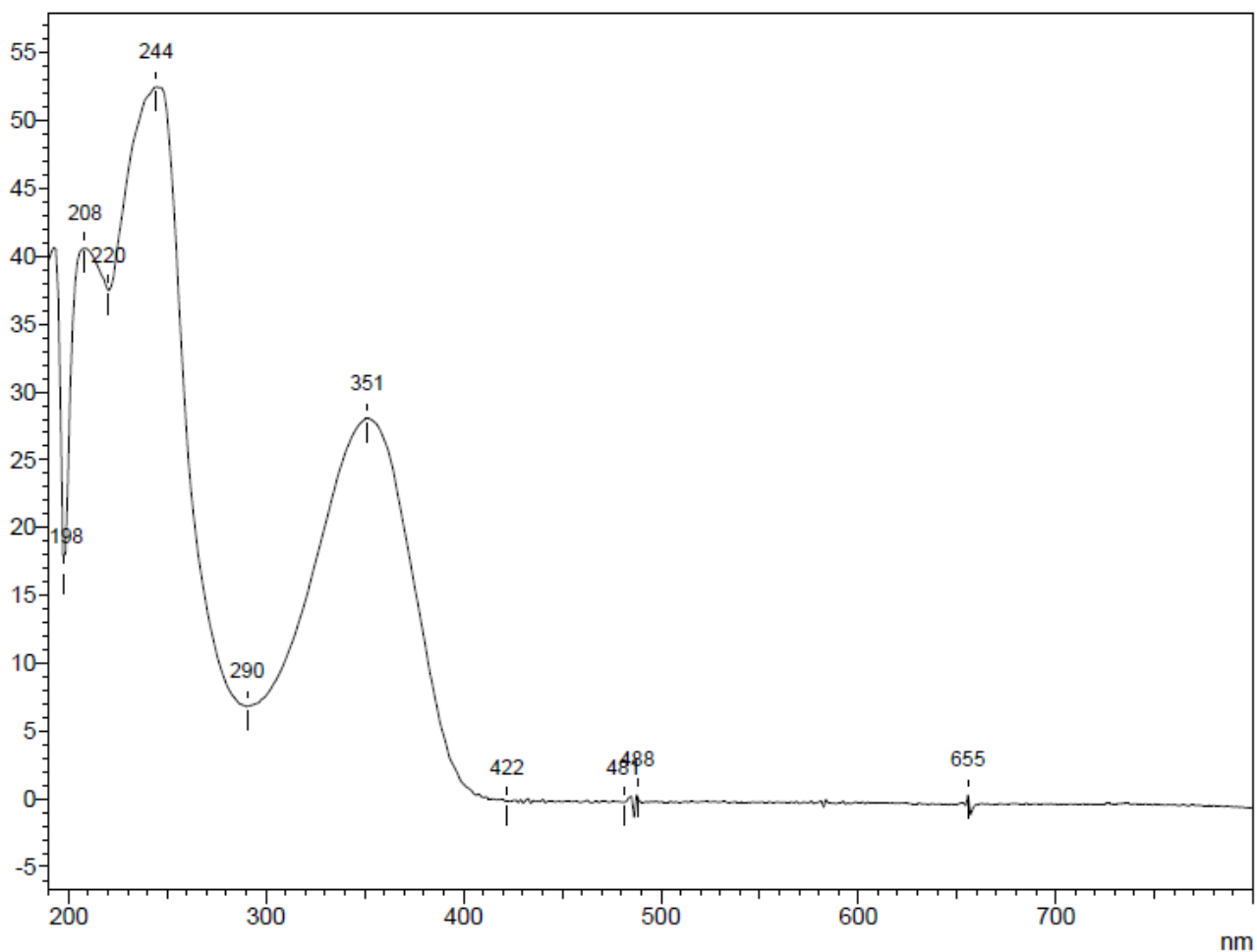
PDA Ch16 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	0,995	26767	5676	0,000			
2	1,301	1334	169	0,000		V	
3	3,840	2238	298	0,000			
4	4,142	2670	239	0,000		V	
5	4,652	461051	44777	0,000		V	
6	8,222	1761	141	0,000			
Total		495822	51301				

==== Shimadzu LabSolutions UV Spectrum ====

Colchicina padrão 1505 R1.lcd

mAU



==== Shimadzu LabSolutions UV Spectrum ====

Medicamento Colchicina R2.lcd

mAU

