



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EDUARDO HENRIQUE DUARTE

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO VOLTAMÉTRICO
PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
PARACETAMOL E ÁCIDO ASCÓRBICO NA PRESENÇA DE
SURFACTANTE CATIÔNICO EMPREGANDO ELETRODO
DE PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO**

EDUARDO HENRIQUE DUARTE

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO VOLTAMÉTRICO
PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
PARACETAMOL E ÁCIDO ASCÓRBICO NA PRESENÇA DE
SURFACTANTE CATIÔNICO EMPREGANDO ELETRODO
DE PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção ao título de Mestre em Química, com ênfase em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D812d__Duarte, Eduardo Henrique.

Desenvolvimento de um método voltamétrico para a determinação simultânea de paracetamol e ácido ascórbico na presença de surfactante catiônico empregando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono / Eduardo Henrique Duarte. – Londrina, 2013. 72 f. : il.

Orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Acetaminofen – Teses. 3. Voltametria – Teses. 4. Vitamina C – Teses. 5. Medicamentos – Soluções farmacêuticas – Teses. I. Tarley, César Ricardo Teixeira. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 543

EDUARDO HENRIQUE DUARTE

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA A
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE PARACETAMOL E ÁCIDO
ASCÓRBICO NA PRESENÇA DE SURFACTANTE CATIÔNICO
EMPREGANDO ELETRODO DE PASTA DE NANOTUBO DE
CARBONO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção ao título de Mestre em Química, com ênfase em Química Analítica.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira
Tarley
UEL – Londrina - PR

Banca: Profa. Dra. Josiane Caetano Dragunski
UNIOESTE –

Banca: Profa. Dra. Elen J. Romão Sartori Braz
UEL – Londrina - PR

Londrina, 21 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador César Ricardo Teixeira Tarley pela orientação científica, por todos os ensinamentos durante esses dois anos, pelos conselhos construtivos, pela paciência, amizade e por ter me apresentado o mundo científico.

Aos meus queridos colegas de laboratório (Naiara, Fernanda, Bruna, Raquel e Giovana), pelo auxílio em todos os momentos necessários, pela amizade e pelo carinho. Principalmente a Débora pela ajuda nos experimentos, na paciência ao ler meus textos, pelas caronas (inclusive para Assis), pelos conselhos e pelo ombro amigo em todos os momentos que precisei. Ao meu amigo, irmão e parceiro Felipe Hudari pela ajuda no início dos meus experimentos, a Marcela pela sincera amizade e carinho e por fim e não menos importante a Kris pela companhia diária, da amizade e carinho que foi crescendo a cada dia desse mestrado, nas dificuldades e alegrias. Obrigado a todos por me fazer sentir em família durante esses dois anos.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos Rodolfo e Talita, por estarem comigo em todos os momentos que vivi em Londrina, inclusive na minha graduação, por hoje fazerem parte da minha família, da minha vida, e por estarem presentes em todos meus sentimentos mais verdadeiros. E também aos meus grandes amigos Jaque, Fabiano, Matheus, Juliana, Paula, Sérgio, Gustavo, Karina, Thiago, Ana entre outros, pelo apoio e pelos momentos boêmios nos fins de semana.

Aos meus amigos Fabio e Raquel por terem dividido a casa comigo durante anos, e principalmente ao Christian que viveu comigo durante os seis anos de Londrina, por ser meu amigo, meu irmão de coração e por aguentar todos meus momentos de dificuldade.

Agradeço também aos meus amigos de Assis/SP, Roberta, Danilo, Thais, Fabio Morelli e Érika, por sempre acreditarem na minha capacidade, por estarem comigo em vários momentos que passei na minha vida, por sempre me esperarem na rodoviária com um abraço, pelas visitas em Londrina (inclusive na minha formatura), pelos churrascos e por fazer parte da minha vida em todos os momentos.

Aos Professores Dionísio Borsato e Ieda Scarminio pelo exemplo de profissionalismo, juventude e pelos conselhos, ao Professor Carlos Câmara por ter

me convidado a auxiliar a ministrar aula durante dois meses na graduação, a Ivanira por além de ser uma excelente técnica de laboratório, mas por também ter medido minha pressão diariamente e por ser uma grande amiga. Ao Professor Galão pela amizade e confiança, e principalmente a minha orientadora de iniciação científica Sonia Barreto pelo apoio para que eu ingresasse no mestrado, pelo carinho, pelo amor e pela paciência de convívio de três anos de estagio de iniciação científica.

Aos meus pais Maria A.L Duarte e João Ferreira Duarte pelo apoio incondicional, pelo carinho e pelo exemplo de dignidade, honestidade, respeito e força para lutar, nunca desistir e seguir em frente. Aos meus dois irmãos (Fernando e Paulo) e principalmente a minha irmã por todo o apoio, pelos desabafos, por sempre acreditar no meu potencial e por toda ajuda financeira nos momentos em que mais precisei.

E por fim e mais importante agradeço a Deus, por me acompanhar e me ajudar em cada momento da minha vida.

OBRIGADO.

DUARTE, Eduardo Henrique. **Desenvolvimento de um método voltamétrico para a determinação simultânea de paracetamol e ácido ascórbico na presença de surfactante catiônico empregando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono.** 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Neste trabalho um eletrodo de pasta de nanotubo de carbono (NTC) foi utilizado para a determinação simultânea de paracetamol (PAR) e ácido ascórbico (AA) utilizando voltametria de pulso diferencial e na presença do surfactante catiônico (brometo de cetilpiridínio, CPB). Medidas realizadas por voltametria cíclica em pH 7,0 (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹) utilizando eletrodo de carbono vítreo, bem como o eletrodo de pasta de nanotubo de carbono revelaram sobreposição dos picos de oxidação de AA e PAR. Por outro lado, as medidas realizadas na presença de CPB 0,3 mmol L⁻¹ promoveram um aumento acentuado nas correntes de pico anódico (I_{pa}) para PAR e AA além da satisfatória separação dos picos de oxidação (E_{pa}) de 350 mV, especialmente para o eletrodo de pasta de nanotubo de carbono. A influência do pH nos valores de E_{pa} PAR mostrou que o número de elétrons e H⁺ que participam do processo de oxidação é o mesmo. Por outro lado, para o AA a relação obtida e⁻/H⁺ foi de 2:1. A relação linear I_{pa} vs $v^{1/2}$, mostrou que o processo de oxidação de ambos, AA e PAR, é controlado por um processo difusional. Os parâmetros analíticos da voltametria de pulso diferencial (tempo de modulação de 4,5 ms, amplitude de pulso de 104,7 mV e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹) foram otimizadas por meio de planejamento fatorial empregando multi-respostas. O método desenvolvido apresentou faixa linear de 100,0 µmol L⁻¹ a 700,0 µmol L⁻¹ e 39,4 µmol L⁻¹ a 146,3 µmol L⁻¹ respectivamente para AA e PAR. Foram obtidos limites de detecção de 7,11 µmol L⁻¹ para AA e 2,1 µmol L⁻¹ para PAR. A presença de ácido úrico, cafeína, glicose, uréia e 2-nitrofenol em concentrações até 10 vezes de PAR e AA não interferiu na determinação individual e simultânea dos fármacos. A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade, rendendo desvio padrão relativo (DPR) para n=10 de 1,4% e 1,0% para AA nas concentrações de 30,0 e 300,0 µmol L⁻¹, respectivamente, e 1,9% e 1,3% para PAR nas concentrações de 10,0 e 120,0 µmol L⁻¹. O método desenvolvido foi aplicado em formulações comerciais, cuja exatidão foi atestada pela análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) como técnica de referência (teste t-pareado com 95% de confiança).

Palavras-chave: Sensor voltamétrico. Formulação farmacêutica. Surfactante catiônico. Ácido ascórbico. Paracetamol. Otimização multi-resposta

DUARTE, Eduardo Henrique. **Development of a voltammetric method for the simultaneous determination of paracetamol and ascorbic acid in the presence of cationic surfactant employing carbon nanotube paste electrode**. 2013. 72 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

In this work a carbon nanotube paste electrode (CNT) was used for the simultaneous determination of paracetamol (PAR) and ascorbic acid (AA) using differential pulse voltammetry in the presence of cationic surfactant (cetylpyridinium bromide, CPB). Measurements carried out by cyclic voltammetry at pH 7.0 (0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer) using glassy carbon electrode, as well as the carbon nanotube electrode paste revealed overlapping of the oxidation peaks of AA and PAR. On the other hand, the measurements carried out in the presence of 0.3 mmol L⁻¹ CPB promoted a marked increase in the anodic peak currents (I_{pa}) for PAR and AA, as well as a satisfactory separation of oxidation peaks (E_{pa}) of 350 mV, mainly for the carbon nanotube electrode paste. The influence of pH on the E_{pa} values for AA and PAR shows that the number of electrons and H⁺ that participate of the oxidation process is the same. On the other hand, for the AA the relationship e⁻/H⁺ achieved was 2:1. The linear relationship I_{pa} vs $v^{1/2}$ showed that oxidation process for both, AA and PAR, is controlled by a difusional process. The analytical parameters of differential pulse voltammetry (modulation time of 4.5 ms, pulse amplitude of 104.7 mV and scan rate of 100 mV s⁻¹) were optimized by means of factorial design employing multi-responses. The developed method showed linear range from 100.0 μmol L⁻¹ to 700.0 μmol L⁻¹ and 39.4 μmol L⁻¹ to 146.3 μmol L⁻¹, respectively, for AA and PAR. It was obtained limits of detection of 7.11 μmol L⁻¹ for AA and 2,1 μmol L⁻¹ for PAR. The presence of uric acid, caffeine, glucose, urea and 2-nitrophenol in 10-fold more concentrated did not interfere in the individual and simultaneous of drugs. The precision of method was assessed in terms of repeatability, yielding relative standard deviation (RSD) for n=10 of 1.4% and 1.0% for AA at 30.0 e 3000 μmol L⁻¹ concentrations, respectively, and 1.9% and 1.3% for PAR at 10.0 e 120.0 μmol L⁻¹. The developed method was applied in commercial formulations, whose accuracy was attested by high performance liquid chromatography (HPLC) as reference technique (paired t-test with 95% of confidence).

Keywords: Voltammetric sensor. Pharmaceutical formulation. Cationic surfactant. Ascorbic Acid. Paracetamol. Multi-response optimization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura molecular do paracetamol	17
Figura 2 – Estrutura molecular do ácido ascórbico.....	19
Figura 3 – Esquema de representação estrutural, (A) SWCNTs, (B,C-D) diversas formas de estruturas do grafeno dobrado e (E) MWCNTs	22
Figura 4 – Representação esquemática de um eletrodo de pasta de NTC com surfactante catiônico adsorvido na superfície.....	23
Figura 5 – Potencial vs Tempo, sinal de excitação da voltametria cíclica.	25
Figura 6 – Representação voltamétrica de um processo reversível.....	26
Figura 7 – Representação de sinais de excitação em voltametria de pulso diferencial.	27
Figura 8 – Representação de um voltamograma de pulso diferencial.....	28
Figura 9 – Representação de uma célula eletroquímica utilizada nos experimentos, sendo (azul) o eletrodo de referência, (vermelho) o eletrodo de trabalho e (preto) o contra eletrodo.	32
Figura 10 – Esquema representativo do eletrodo de trabalho baseado em pasta de NTC.	34
Figura 11 – Voltamogramas cíclicos de AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) na ausência e na presença de surfactante CPB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. 3º ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s^{-1} em eletrodos de CV e NTC. Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.	36
Figura 12 – Voltamogramas cíclicos de PAR ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na ausência e na presença de surfactante CPB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. 3º ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s^{-1} em eletrodos de CV e NTC. Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.	37
Figura 13 – Voltamogramas cíclicos de AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e PAR ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na ausência de CPB. 3º ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s^{-1} em eletrodos de CV e NTC. Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.	38
Figura 14 – Voltamogramas cíclicos de AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e PAR ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de surfactante CPB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. 3º ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s^{-1} com eletrodos de CV e NTC. Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.	39

Figura 15 – Voltamogramas cíclicos de AA (0,5 mmol L ⁻¹) e PAR (0,1 mmol L ⁻¹) com surfactantes catiônicos CPB e CTAB 0,3 mmol L ⁻¹ . 3 ^o ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s ⁻¹ . Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0.	40
Figura 16 – Voltamogramas cíclicos de AA (0,5 mmol L ⁻¹) e PAR (0,1 mmol L ⁻¹) na presença de surfactante CPB em concentrações de 0,1 mmol L ⁻¹ a 0,6 mmol L ⁻¹ . 3 ^o ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s ⁻¹ . Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0	40
Figura 17 – Dependência do pH com Epa (V). AA (0,5 mmol L ⁻¹), PAR (0,1 mmol L ⁻¹) na presença de CPB 0,3 mmol L ⁻¹ , 80 mV s ⁻¹ , 3 ^o ciclo. Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹	42
Figura 18 – Dependência do pH com Ipa (μA), AA (0,5 mmol L ⁻¹) e PAR (0,1 mmol L ⁻¹) na presença de CPB 0,3 mmol L ⁻¹ , 80 mV s ⁻¹ , 3 ^o ciclo. Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹	43
Figura 19 – Voltamogramas cíclicos para (AA 0,5 mmol L ⁻¹) e PAR (0,1 mmol L ⁻¹) na presença de CPB 0,3 mmol L ⁻¹ . Tampão fosfato 0,1mol L ⁻¹ . (A) pH 6,0 (B) pH 7,0.	44
Figura 20 – (A) Voltamogramas cíclicos de AA (0,5 mmol L ⁻¹) na presença de CPB 0,3 mmol L ⁻¹ ; (B) Relação de Ipa (μA) vs v (mV s ⁻¹); (C) relação de Ipa vs v ^{1/2} (mV s ⁻¹) ^{1/2} . Tampão fosfato 0,1mol L ⁻¹	45
Figura 21 – (A) Voltamogramas cíclicos de PAR (0,1mmol L ⁻¹) na presença de CPB 0,3 mmol L ⁻¹ . (B) Relação de Ipa (μA) vs v (mV s ⁻¹). (C) relação de Ipa vs v ^{1/2} (mV s ⁻¹) ^{1/2} . Tampão fosfato 0,1mol L ⁻¹	46
Figura 22 – Cronoamperograma de Ipa (μA) vs tempo (s). AA 0,05 mmol L ⁻¹ a 0,20 mmol L ⁻¹ na presença de CPB 0,3 mmol L ⁻¹ . Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) t = 60 s e Ea = 0 V.	47
Figura 23 – Cronoamperograma de Ipa (μA) vs tempo (s). PAR 0,05 mmol L ⁻¹ a 0,20 mmol L ⁻¹ na presença de CPB 0,3 mmol L ⁻¹ . Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) t = 60 s e Ea = 400 mV.....	47
Figura 24 – Gráficos de Ipa (μA) vs t ^{-1/2} obtidos dos cronoamperogramas variando concentrações de 0,05 a 0,20 mmol L ⁻¹ de AA.	48
Figura 25 – Gráficos de Ipa (μA) vs t ^{-1/2} obtidos dos cronoamperogramas variando concentrações de 0,05 a 0,20 mmol L ⁻¹ de PAR.....	48

Figura 26 – Voltamogramas de pulso diferencial variando eletrólitos na presença de CPB 0,3 mmol L ⁻¹ , AA (0,5 mmol L ⁻¹) e PAR (0,1 mmol L ⁻¹), velocidade de varredura 30 mV s ⁻¹ e amplitude de 100 mV.....	50
Figura 27 – Influência da concentração do tampão fosfato no perfil voltamétrico da mistura de AA (0,5 mmol L ⁻¹) e PAR (0,1 mmol L ⁻¹) na presença de surfactante CPB 0,3 mmol L ⁻¹	51
Figura 28 – Diagrama de Pareto obtido a partir dos experimentos reunidos na Tabela 2.....	53
Figura 29 – Superfície de resposta da desejabilidade global entre amplitude de pulso e tempo de modulação.....	56
Figura 30 – Voltamogramas de pulso diferencial de AA e PAR em tampão fosfato 0,1mol L ⁻¹ (pH 7,0). Concentrações de 100 µmol L ⁻¹ a 700 µmol L ⁻¹ de AA e 39,4 µmol L ⁻¹ a 146,3 µmol L ⁻¹ de PAR. Tempo de modulação de 4,5 ms, amplitude de pulso de 104,7 mV e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	57
Figura 31 – Curva analítica para o PAR. Tempo de modulação de 4,5 ms, amplitude de pulso de 104,7 mV e velocidade de varredura de 100 m V s ⁻¹ . Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0).	58
Figura 32 – Curva analítica para AA. Tempo de modulação de 4,5 ms, amplitude de pulso de 104,7 mV e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ . Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0).	58
Figura 33 – Voltamogramas de pulso diferencial de AA e PAR. Concentrações de 100 µmol L ⁻¹ a 700 µmol L ⁻¹ de AA e 50,0 µmol L ⁻¹ PAR. Tempo de modulação de 4,5 ms, amplitude de pulso de 104,7 mV e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ . Tampão fosfato 0,1mol L ⁻¹ pH 7,0.	59
Figura 34 – Voltamogramas de pulso diferencial de AA e PAR. Concentrações de 39,4 µmol L ⁻¹ a 146,3 µmol L ⁻¹ de PAR e 200 µmol L ⁻¹ . Tempo de modulação de 4,5 ms, amplitude de pulso de 104,7 mV e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ . Tampão fosfato 0,1mol L ⁻¹ pH 7,0.	60
Figura 35 – Voltamogramas de pulso diferencial de AA, PAR e CPB (0,3 mmol L ⁻¹) na presença e ausência de ácido úrico.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores e níveis empregados no planejamento fatorial 2^3	52
Tabela 2 – Matriz do planejamento fatorial e respostas analíticas	53
Tabela 3 – Matriz de Doehlert utilizada para otimização do tempo de modulação e amplitude de pulso.	54
Tabela 4 – ANOVA obtida pelo modelo quadrático gerado pela matriz de Doehlert.	55
Tabela 5 – Determinação de AA e PAR por sensor e método de referência (HPLC).....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PAR	Paracetamol
AA	Ácido Ascórbico
CPB	Brometo de Cetilpiridínio
NTC	Nanotubo de Carbono
CV	Carbono Vítreo
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
TM	Tempo de modulação
AP	Amplitude de Pulso
VV	Velocidade de Varredura
I_{pa}	Corrente de pico anódico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
d_i	Desejabilidade individual
D	Desejabilidade global
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
VDP	Voltametria de pulso diferencial
W/2	Largura do pico de oxidação
DPR	Desvio padrão relativo
AU	Ácido Úrico

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 PARACETAMOL	17
2.2 ÁCIDO ASCÓRBICO	18
2.3 PARACETAMOL E ÁCIDO ASCÓRBICO	20
2.4 NANOTUBOS DE CARBONO	21
2.5 PROPRIEDADES E APLICAÇÃO DE SURFACTANTES EM MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	23
2.6 VOLTAMETRIA CÍCLICA	25
2.7 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL	26
2.8 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA E FUNÇÃO DE DESEJABILIDADE	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	32
4.1 INSTRUMENTAL	32
4.2 REAGENTES	33
4.3 PREPARO DO ELETRODO	33
4.4 PROCEDIMENTO DE OTIMIZAÇÃO DOS PARAMETROS DO MÉTODO DE VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL (VPD).....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 COMPORTAMENTOS VOLTAMÉTRICO DE AA E PAR UTILIZANDO ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO (CV) E PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO (NTC).....	36
5.2 INFLUÊNCIA DO TIPO E DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTANTES CATIÔNICOS NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AA E PAR	39
5.3 EFEITO DO PH NA OXIDAÇÃO DO AA E PAR.....	41
5.4 EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA NA OXIDAÇÃO DO AA E PAR	44

5.5	DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO DE AA E PAR NA PRESENÇA DE CPB.....	46
5.6	EFEITOS DO ELETRÓLITO E SUA CONCENTRAÇÃO NA OXIDAÇÃO DO AA E PAR.....	49
5.7	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO FOSFATO.....	50
5.8	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	51
5.9	DETERMINAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO PROPOSTO	56
5.10	ESTUDO DE INTERFERENTES.....	60
6	APLICAÇÃO DO MÉTODO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E EXATIDÃO ANALÍTICA	62
7	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O paracetamol (PAR) ou n-acetil-p-aminofenol é um fármaco muito importante dentro da indústria farmacológica, principalmente encontrada em antipiréticos ou analgésicos, para dores moderadas como dor de cabeça, dores nas costas, artrite e pós-operatório. Este medicamento pode servir como alternativa para pacientes que não podem usar a aspirina [1,2]. Quando ingerido em altas doses pode causar o acúmulo de metabólitos tóxicos causando assim nefrotoxicidade que em alguns casos é associado com insuficiência renal [3].

O ácido ascórbico (AA) ou mais conhecido como vitamina C, é um medicamento solúvel em água e indicado em casos de gripe, entretanto é eficaz em tratamentos de doenças como Alzheimer, arterosclerose, câncer, entre outras. Assim sendo, a presença desta substância para o ser humano é fundamental e a sua ausência pode causar danos, como a síndrome conhecida de escorbuto [4]. Essas duas substâncias encontram-se associadas em alguns medicamentos. O uso de ácido ascórbico em formulações farmacêuticas associado com paracetamol tem papel complementar na ação do analgésico reduzindo sua toxicidade no fígado, justificando a dosagem destes dois compostos em medicamentos [5].

Sendo assim, a determinação simultânea de PAR e AA para o controle de qualidade em formulações farmacêuticas é muito importante, que pode ser realizada com sucesso por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [6-7]. Porém, tendo em vista os relativos altos custos de aquisição e manutenção da técnica cromatográfica supracitada, métodos eletroquímicos, por serem menos onerosos e por apresentarem sensibilidade satisfatória, podem ser utilizados com sucesso na determinação simultânea de fármacos. No entanto, a determinação de AA e PAR em eletrodos a base de carbono não modificado (carbono vítreo e pasta de grafite), ou metálico (Hg, Au, Pt) é impossibilitada devido à falta de seletividade, obtendo uma sobreposição dos picos de oxidação. Assim sendo, algumas abordagens incluindo modificação de superfície de eletrodos ou emprego de novos materiais eletródicos vêm sendo desenvolvidas a fim de solucionar este problema.

Os trabalhos como o poli (3-metiltofeno) / paládio sub-micro-modificado [8], o eletrodo de ouro modificado com nanopartículas de 1,6-hexaneditiol com brometo de tetraoctilamônio [9] e nanopartículas de paládio (Pd_{nano}) em poli(n-

metilpirrole)(PMPy) revestido em película no eletrodo de platina (Pt) [10], são exemplos de modificação de superfícies de eletrodos. A detecção por amperometria de múltiplos pulsos através de um eletrodo de diamante dopado de boro, também tem sido investigada para a determinação simultânea de AA e PAR [11,12]. O uso de sensores eletroquímicos baseados em nanotubos de carbono (NTC) tem sido bastante intensificado para determinação de espécies eletroativas [13,14], devido a sua habilidade em promover a reação de transferência de elétron com alto efeito eletrocatalítico quando usado como materiais eletródicos [15,16]. Além disso, o comportamento eletroquímico em termos de sensibilidade e seletividade destes sensores, utilizados na forma de pastas de nanotubos de carbono, ou dispersos sobre superfícies de platina, ouro ou carbono vítreo, pode ser melhorado por meio de procedimentos que envolvam a modificação química da superfície dos NTC.

Shahrorokhian e Asadian estudaram a determinação simultânea de AA e PAR em fármacos e amostras de plasma utilizando eletrodo de nanotubo de carbono modificado com Tionina. As medidas foram feitas em pH 4,0, observando-se uma separação dos picos de oxidação (~ 303 mV) [17].

Em outro estudo foi desenvolvido um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono multiparedes modificado com *n*-(3,4-nihidroxifenetil)-3,5-dinitrobenzamida e usado como eletrocatalisador para oxidação de AA, PAR e triptofano (TP) em pH 7,0 [18]. São reportados também eletrodos de carbono vítreo modificado com nanotubos multiparedes dispersos em polihistidina [19], e nanotubos de carbono multiparedes covalentemente modificado com polímero redox baseado em ósmio [20] para determinação simultânea de PAR e AA.

No presente trabalho, propõe-se o desenvolvimento de um método voltamétrico baseado em pasta de nanotubo de carbono multiparedes sem qualquer modificação química visando a determinação simultânea de PAR e AA em formulações farmacêuticas. O método aqui desenvolvido é uma alternativa simples e de baixo custo comparada aos métodos acima citados, principalmente por conferir a confecção simples do eletrodo e por fazer uso de medidas na presença de surfactante, o qual promove melhorias significativas na seletividade e sensibilidade das análises eletroquímicas [21,22]. Cabe salientar ainda o ineditismo do trabalho, tendo em vista que o efeito sinérgico de surfactantes catiônicos com eletrodos de pasta de nanotubo de carbono ainda não foi investigado para determinação simultânea de PAR e AA em amostras farmacêuticas.

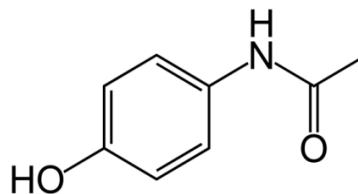
Por fim, no trabalho a ênfase também foi dada à otimização multivariada por meio de planejamento fatorial e função de desejabilidade baseadas em multi-resposta. Este tipo de otimização multivariada apresenta vantagens sobre as técnicas univariadas, uma vez que diminui o número de experimentos, tempo de análise, permite avaliar os efeitos de interações entre os fatores estudados. Já a função de desejabilidade baseada em multi-resposta permite otimizar de forma adequada um método quando mais de uma resposta é analisada, sendo, portanto, de grande importância em determinações simultâneas [23].

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PARACETAMOL

O paracetamol ou n-acetil-p-aminofenol é um amida aromático acilado (Figura 1) muito importante dentro da indústria farmacológica, sendo um analgésico ou antipirético para alívio de dor e febre, recomendado para adultos e crianças. Este medicamento é o segundo mais usado em todo o mundo, ficando atrás apenas do ácido acetilsalicílico, introduzido na medicina por Von Mering em 1983 [24,25], servindo como alternativa para pacientes que não podem consumir medicamentos como a aspirina [26-27].

Figura 1 – Estrutura molecular do paracetamol



Produtos contendo este fármaco na bula é indicado para pacientes que apresentam dores leves à moderadas, incluindo dor de cabeça, ferimentos leves e dores cotidianas apresentadas habitualmente, além de ser um fármaco bastante eficaz em casos de febres, artrite e pós-operatório [28-29]. Este importante fármaco é um ácido fraco que possui pKa de 9,5 obtendo a capacidade de ser absorvido e distribuído rapidamente pelo corpo, passando por glicuronidação e sulfatação em metabólitos inativos que são eliminados pela urina [30].

Quando ingerido em altas doses pode causar o acúmulo de metabólitos tóxicos podendo causar nefrotoxicidade que em alguns casos é associado com insuficiência renal. Essa toxicidade hepática é resultado do metabólito tóxico produzido no fígado pelo citocromo P-450. A enzima CYP2E1 presente no fígado é responsável pelo metabolismo do paracetamol, que quando ingerido com álcool pode aumentar essa toxicidade, pois este tem o papel de induzir essa enzima [31].

O desenvolvimento de técnicas eficientes é utilizado para a determinação de paracetamol, seja ele na forma pura, formulação, combinação com outras substâncias ou até mesmo em amostras biológicas. Dentre as técnicas

utilizadas estão a titulação [32], espectrofotometria [33,34], quimiluminescência [35], cromatografia [36], entre outros.

Apesar da Farmacopéia Americana e a A.O.A.C (Association of Official Analytical Chemists) recomendar o uso de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrofotometria [37], pode-se observar um amplo número de trabalhos empregando métodos eletroanalíticos para a determinação deste analito. Oliveira et al. (2010) [38] desenvolveram um sensor baseado na modificação de eletrodo de carbono vítreo com tetrapiridinoporfirazina (FeTPyPz) na presença de DMF (dimetilformamida) e Nafion® [38]. O eletrodo modificado apresentou propriedades catalíticas na oxidação do paracetamol e foi empregado em sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação do fármaco.

Em outro trabalho, foi empregada a técnica de voltametria de redissolução adsorbtiva para determinação de paracetamol fazendo uso de nanotubos de carbono multicamadas modificados na superfície do eletrodo de grafite pirolítico [39]. A determinação eletroquímica direta de paracetamol em plasma foi reportada por Christie et al.(1993) [40], utilizando a técnica de permeação seletiva em membrana de acetato de celulose e policarbonato tratado com dimetilclorosilano.

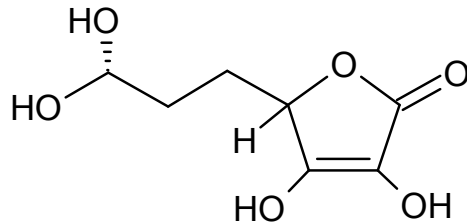
Outra metodologia foi reportada para a determinação de paracetamol, efetuando a modificação de cristal piezelétrico de quartzo com MIPs (Polímeros Molecularmente Impressos) a fim de analisar o fármaco em amostras reais, tal como o soro humano e a urina [41] . A determinação voltamétrica de paracetamol na presença de outros fármacos, tais como norepinefrina, ácido fólico, dopamina, epinefrina e ácido ascórbico também é estudada em formulações simultaneas [42,43]. Nestes trabalhos, foram empregados eletrodos baseados em *nanoclusters* de paládio eletrodepositado em eletrodo de platina modificado com filme de poliuretano, bem como eletrodos de carbono mesoporoso.

2.2 ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico ou popularmente conhecido como vitamina C (Figura 2), é um importante composto para os seres vivos, podendo ser encontrado em frutas cítricas, em produtos hortícolas [44,45] e nos vegetais (brócolis, tomate, repolho e batatas), demonstrando ser um antioxidante, que auxilia na desintoxicação e na melhora da absorção do ferro, além de também desempenhar um importante

papel no corpo, como o radical livre limpador, que contribui a prevenção de radicais livres, causadores de doenças induzidas, como a de Parkinson e o câncer [46].

Figura 2 – Estrutura molecular do ácido ascórbico.



Concentrações inferiores a $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ no organismo humano pode indicar diagnóstico de síndrome de ascorbuto [47-48]. Assim, a ingestão via formulações farmacêuticas é necessária para suprir a falta do fármaco em alimentos. O ácido ascórbico tem grande importância comercial em fármacos antigripais efervescente e associado com outros analitos. Este ácido possui um pka de 4,2 e em meio aquoso no pH fisiológico como qualquer outro ácido, essa molécula se ioniza liberando um próton, tendo a forma oxidada chamada de ascorbato [49]. Dados mostram que o ácido ascórbico pode ser recomendado para prevenção e tratamento de doença mental, câncer, infertilidade e em alguns casos em manifestações do vírus HIV [50].

Na literatura são reportados métodos espectroanalíticos [51,52] e cromatográficos [53] para determinação de ácido ascórbico em formulação farmacêutica, associado a outros medicamentos.

Em relação as técnicas eletroanalíticas, vários trabalhos podem ser encontrados na literatura visando à determinação de ácido ascórbico isoladamente ou na presença de outros fármacos. Recentemente Wu et al. (2012) [54] utilizaram eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de paládio em óxido de grafeno (PdNPs-GO) para determinação de AA em comprimidos de vitamina C. Em outros casos de determinação de AA, foram utilizados como eletrodo de trabalho, pasta de carbono dopado com grafeno [55], filme de óxido de neóbio imobilizado em sílica na superfície de um eletrodo cerâmico de carbono $\text{SiO}_2/\text{C}/\text{Nb}_2\text{O}_5$ [56], eletrodo de carbono vítreo modificado com $(\text{PVP}/\text{Mo}(\text{CN})_8^{4-})$ [57], entre outros.

A determinação de AA concomitante com outros fármacos também foi estudada, utilizando eletrodo de grafeno dopado com nitrogênio, que consiste em uma mistura de óxido de grafeno com melamina, para a determinação de analitos

como a ácido ascorbico, dopamina e ácido úrico [58]. Eletrodos de carbono vítreo modificados com uma fina película de politiramina (Pty) são reportados para determinação de ácido ascórbico e dopamina [59].

2.3 PARACETAMOL E ÁCIDO ASCÓRBICO

Algumas formulações farmacêuticas possuem associação de paracetamol e ácido ascórbico, pois o uso deste último fármaco tem papel complementar na ação do analgésico do paracetamol, bem como permite reduzir a toxicidade do analgésico no fígado, justificando a dosagem destes dois fármacos em medicamentos [5].

Devido à importância dos fármacos supracitados, pesquisadores vêm abordando o desenvolvimento de métodos analíticos para um controle de qualidade em fármacos comerciais, utilizando HPLC [60], métodos espectrofotométricos [61], eletroforese, entre outros. Métodos eletroquímicos podem ser alternativos para a determinação destes fármacos, pois apresentam relativamente, baixo custo de aquisição e manutenção.

No entanto, a determinação simultânea de PAR e AA em eletrodos à base de carbono (carbono vítreo ou pasta de grafite) e eletrodos de ouro e platina, não é possível devido à sobreposição dos picos de oxidação. Desta forma, estudos visando a modificações dos eletrodos supracitados têm sido estudados ao longo dos anos, seja em formulações contendo paracetamol e ácido áscorbico, ou concomitante com outros analitos.

Atta & El-Kady (2009) desenvolveram um sensor voltamétrico baseado na modificação de platina com polímero condutor poli(3-metil-tiofeno) [8]. Neste trabalho, foi possível determinar simultaneamente, em meio ácido ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4), paracetamol, hidroquinona, ácido ascórbico e dopamina por voltametria de pulso diferencial. Apesar do potencial de separação dos picos de oxidação dos analitos, os autores não efetuaram a validação do método em amostras reais e, tampouco, determinam os parâmetros analíticos, tais como faixa linear e limite de detecção do método.

Santhosh et al. (2009) [9] determinaram PAR e AA utilizando um eletrodo de Au (ouro) modificado com 1,6-hexaneditiol (HDT) contendo brometo de tetraoctilamônio (TOAB-AuNPs). Em pH 7,0 o eletrodo foi capaz de determinar

simultaneamente PAR e AA com ΔE de 210 mV. O método foi aplicado em plasma humano e em medicamentos contendo PAR.

Em outra pesquisa estudou-se o uso do eletrodo de carbono vítreo revestido com níquel magnético (C-Ni/GCE) na determinação de PAR na presença de AA e dopamina [62]. Em outro trabalho, através da voltametria de pulso diferencial, foi determinado PAR e AA em formulações farmacêuticas e amostras biológicas, utilizando um eletrodo de nanotubo de carbono cerâmico (SWCNT/CCE) [63].

A determinação de ácido ascórbico, paracetamol e triptofano foi investigada no trabalho de Keyvanfard et al. (2013) [64], através da voltametria de onda quadra utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubo de carbono multicamadas na presença do mediador 3,4-ácido diidroxicinâmico (3,4-DHCA) sendo aplicado em fármacos, sucos, frutas e em amostras de urina.

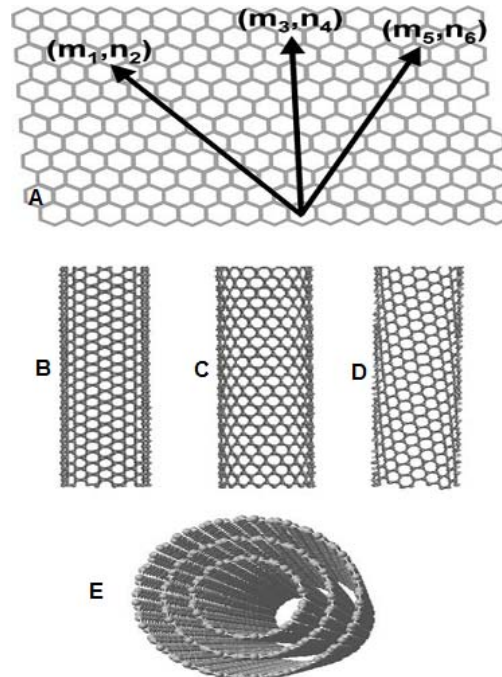
2.4 NANOTUBOS DE CARBONO

A descoberta dos nanotubos de carbonos em 1991 [65] teve um grande impacto na tecnologia e na ciência, em relação ao campo das ciências eletroquímicas, havendo um aumento de pesquisas em metodologias para determinação de diversos analitos, pela vantagem destes materiais apresentarem resistência mecânica, química, flexibilidade e resistência à ruptura quando dobrados ou torcidos e, principalmente, do ponto de vista eletroquímico, alta condutividade, devido o arranjo hexagonal de átomos de carbono sp^2 .

Os NTC podem ser classificados em varios grupos, dentre eles dois tipos de grupos, os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) ou nanotubos de carbono multicamadas (MWCNTs) [66].

Os SWCNTs são compostos por um único tubo ou lâmina de carbono (Figura 3.A), já os MWCNTs são formados por vários cilindros de carbono concêntricos, ou seja, de varias camadas (Figura 3.E) e infinitas possibilidades das moléculas de carbono (Figuras 3. B-D), podendo assim apresentar propriedades físicas distintas [67].

Figura 3 – Esquema de representação estrutural, (A) SWCNTs, (B,C-D) diversas formas de estruturas do grafeno dobrado e (E) MWCNTs [66].



Merkoçi (2006) [67] e Rivas et al. [68] realizaram revisões exaustivas sobre o emprego dos nanotubos de carbono em diferentes seguimentos das ciências analíticas, enfocando desde aplicações em técnicas de extração e no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Como já mencionado, os nanotubos de carbono denominados como “*materiais do século 21*” proporcionam propriedades mecânicas, térmicas e elétricas intrigantes, e além disso observa-se uma grande área superficial, obtendo assim um comportamento eletrônico de semicondutor ou condutor, o que conseqüentemente acarreta em uma maior facilidade na transferência de elétrons em sensores eletroquímicos.

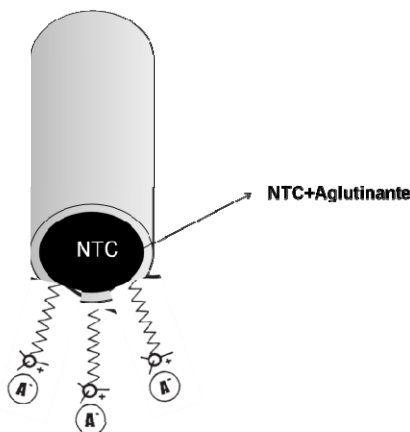
Sensores eletroquímicos baseados em nanotubos de carbono podem ser preparados mediante a confecção na forma de pastas com aglutinantes [69]. No estudo realizado por Abbar et al. (2012) [70], os autores desenvolveram um eletrodo de nanotubos de carbono/parafina 2:7(m/m) para determinação de pentoxifilina, encontrado em fármacos hemorreológicos. Além deste método de preparo, os NTC podem ser dispersos em superfícies eletródicas, tais como ouro ou carbono vítreo.

2.5 PROPRIEDADES E APLICAÇÃO DE SURFACTANTES EM MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Uma alternativa ambientalmente amigável para melhorias no desempenho dos sensores baseados em NTC refere-se ao uso de surfactantes nas medidas eletroquímicas. Surfactantes são compostos anfifílicos baseados em uma cadeia longa de hidrocarbonetos (cauda) e a parte polar (cabeça), podendo ser não-iônico, catiônico, aniônico e anfótero. Os surfactantes catiônicos utilizado neste trabalho consiste em geral a formula $R_nX^+Y^-$, onde R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X é um elemento capaz de formar uma estrutura catiônica e Y é um contra íon [71]. As moléculas de surfactante quando estão acima da concentração micelar crítica (CMC) se reorganizam formando micelas [72], no entanto quando estão abaixo do CMC, ficam como monômeros não organizados.

Na Figura 4 é mostrada a representação de um sensor de NTC na presença de surfactante catiônico [73], revelando a maneira como o surfactante pode ser adsorvido na superfície do eletrodo. A eficiência dos surfactantes catiônicos em medidas eletroquímicas fundamenta-se pelo aumento na transferência eletrônica do analito na superfície eletródica. Isto ocorre por conta da forte atração eletrostática do analito em sua forma ionizada aniônica com o surfactante catiônico. O resultado da atração eletrostática é um aumento das correntes de pico e melhorias na seletividade, pois o potenciais de oxidação/redução são deslocados para valores mais próximos de zero. Os aglutinantes comumente utilizados na confecção de eletrodos de pasta de NTC constituem o óleo mineral ou a parafina.

Figura 4 – Representação esquemática de um eletrodo de pasta de NTC com surfactante catiônico adsorvido na superfície.



A aplicação dos surfactantes não tem sido restrita apenas em análises eletroanalíticas, mas também em outras aplicações eletroquímica, tais como galvanoplastia, corrosão em células de combustível e eletrocatalise [74].

Um exemplo de aplicação de surfactantes catiônicos em eletroanalítica visando melhoria em sensibilidade e seletividade foi reportado por Dos Reis et al. (2008) [22]. Neste trabalho, foi empregado o surfactante cloreto de cetilpiridínio (CPC) com intuito de permitir a separação dos picos de oxidação de ácido ascórbico e ácido úrico, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial e eletrodo de carbono vítreo.

Em outro trabalho, pode-se observar a aplicação de um eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT, cujas medidas por voltametria cíclica, pulso diferencial e onda quadrada para determinação do fármaco gemifloxacino foram feitas na presença do surfactante CTAB e outros agentes tensoativos como SDS (dodecil sulfato de sódio) e Tween-20 [75]. O efeito do surfactante CTAB na corrente de pico do fármaco foi superior em relação aos outros tensoativos. No entanto, cabe salientar que o procedimento de dispersão do NTC sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo é pouco reprodutiva. A utilização de surfactantes catiônicos também pode ser encontradas em determinações eletroanalíticas de isoflavonas [76], nitroprussiato de sódio [77] na presença de CTAB, ácido ascórbico e dopamina na presença de CPC [78], e serotonina na presença de CTAC e CPC [79].

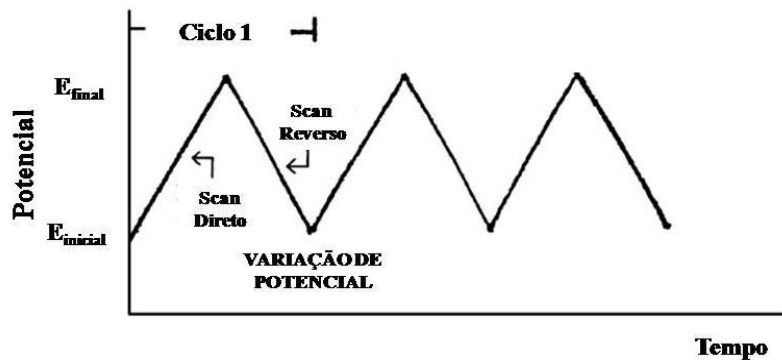
Pode-se observar também que surfactantes não iônicos como o Tween 20, tem promovido melhorias em termos de sensibilidade na determinação eletroquímica por voltametria de onda quadrada de antacapona, uma droga utilizada no tratamento da doença de Parkinson [80].

Surfactantes aniônicos também podem ser explorados em medidas eletroanalíticas, como foi abordado no trabalho de Atta et al. (2007) [74]. Foi observado que a sensibilidade na determinação do anti-hipertensivo terazozina, por voltametria linear e de pulso diferencial, foi substancialmente aumentada na presença de dodecil sulfato de sódico (SDS), em detrimento as medidas feitas em CTAB.

2.6 VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica tem um importante papel nos trabalhos eletroanalíticos, pois é uma técnica que permite fornecer um diagnóstico sobre o processo de oxidação e redução que ocorre do analito a ser estudado, além de averiguar o processo de transferência de elétron e adsorção na superfície do eletrodo. A resposta de corrente para um pequeno eletrodo em repouso é obtida em função de um sinal de excitação na forma triangular como observado na Figura 5 [84].

Figura 5 – Potencial vs Tempo, sinal de excitação da voltametria cíclica.



Fonte: Wang, J (2000, p. 29).

Como pode ser observado na Figura 5, o triângulo é formado pelo potencial inicial até o final, e esta variação pode começar tanto de um valor positivo quanto negativo, da mesma forma que o número de ciclos é escolhido a partir do interesse de cada análise. Pode-se observar também que na voltametria cíclica existe uma varredura direta e uma reversa, e isto ocorre de acordo com a velocidade escolhida dada em $V s^{-1}$.

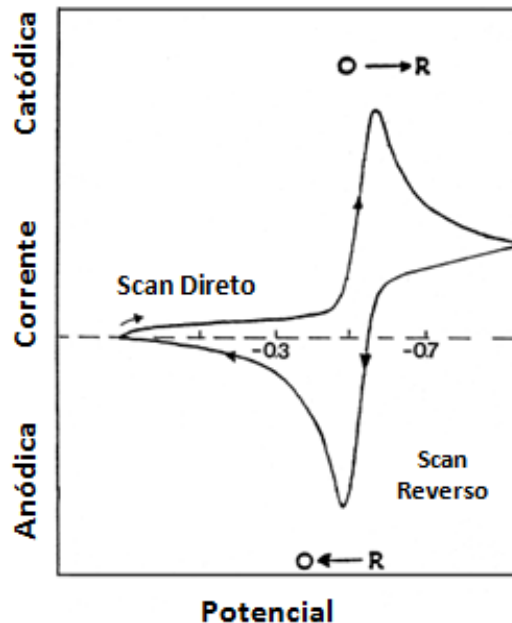
A partir da equação de Randles- Sevcik, sob $25^\circ C$ dada por:

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

onde i_p é a corrente de pico (A), A é a área do eletrodo (cm^2), c é a concentração (mol/cm^3) e v é a velocidade de varredura ($V s^{-1}$), pode-se mostrar que a corrente de pico é diretamente proporcional a concentração do analito [81].

Na Figura 6, observa-se uma resposta para um par redox de uma reação reversível em um único ciclo de varredura de $O + ne \leftrightarrow R$.

Figura 6 – Representação voltamétrica de um processo reversível.



Fonte: Wang, J (2000, p. 29).

Na varredura “scan direto” considera-se que somente a espécie oxidada (O) está presente na reação, sendo assim nessa varredura (direção negativa), começando em um valor onde não ocorre a redução, conforme a varredura do ciclo se aproxima do potencial padrão (E°) característico para o processo redox, a corrente catódica é aumentada, até que o pico seja visualizado. No ciclo reverso (sentido positivo), as moléculas de espécies reduzidas em R (geradas no meio ciclo inicial e acumuladas a superfície) são reoxidadas novamente em O resultando em um pico de oxidação anódico [82].

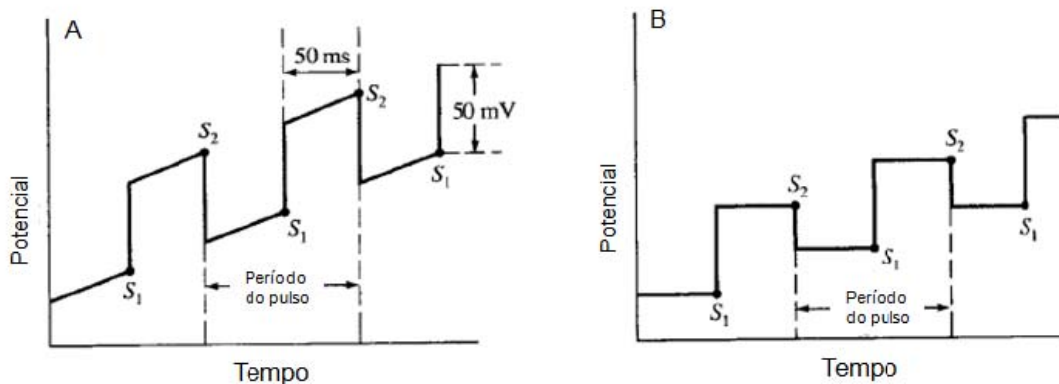
2.7 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

A voltametria de pulso foi introduzida na ciência por Barker e Jenkin, que pretendiam reduzir o limite de detecção das medidas voltamétricas pela substancial diferença entre as correntes faradaicas e não faradaicas, permitindo assim que tais técnicas obtivessem um valor de limite de quantificação abaixo de 10^{-7}

8 mol L^{-1} [82]. Com o desenvolvimento de uma ferramenta instrumental, a voltametria de pulso diferencial possibilitou medidas de correntes e aplicações de potencial em intervalos de pequenos tempos, demonstrando ser uma técnica extremamente útil para a medição de espécies orgânicas e inorgânicas, em diferentes composições de matriz.

Essa técnica consiste em dois sinais mais comuns de excitação utilizados em instrumentos comerciais de voltametria de pulso diferencial (Figura 7), onde o primeiro (Figura 7A) é utilizado em instrumentos analógicos, que é obtido pela sobreposição de um pulso periódico sobre uma rampa linear. Já em instrumentos digitais, a excitação do sinal é obtida como a soma de um pulso sobre uma rampa de potencial na forma de escada, onde assim, um pequeno pulso, tipicamente de 50 mV, é aplicado durante os últimos 50 ms do período de tempo de cada degrau do sinal de excitação [81] (Figura 7B).

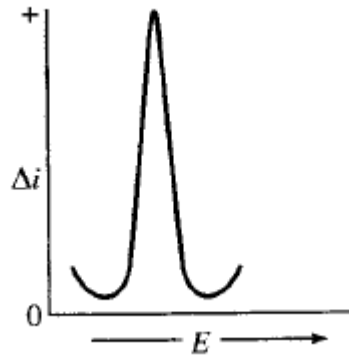
Figura 7 – Representação de sinais de excitação em voltametria de pulso diferencial.



Fonte: Holler, F. J (2009, p. 757)

Sendo assim, observa-se na Figura 7, que dois valores de corrente são obtidos S_1 e S_2 , antes da aplicação do pulso e antes do fim do pulso respectivamente, onde essa diferença de corrente por pulso (Δi) é registrado em função do aumento linear do potencial de excitação. A curva diferencial resultante consiste em picos (Δi vs potencial) conforme demonstrado na Figura 8, onde a intensidade da corrente (altura) é proporcional a concentração do analito na célula eletroquímica.

Figura 8 – Representação de um voltamograma de pulso diferencial.



Fonte: Holler, F. J (2009, p. 757)

Dois fatos pronunciam a maior sensibilidade para a voltametria de pulso em relação a voltametria clássica, o primeiro está relacionado ao aumento da corrente faradaica, e o segundo é a diminuição da corrente de carga (não faradaica). Isso pode ser compreendido ao se considerar os processos que ocorrem na superfície do eletrodo quando o potencial é subitamente aumentado em 50 mV. Se uma espécie eletroativa está presente nesta camada, haverá um rápido aumento no valor da corrente, reduzindo assim o valor da concentração do reagente em função do potencial aplicado. Sendo assim, conforme a concentração se aproxima do valor de equilíbrio, a corrente diminui para um valor determinado pela difusão. Assim, a um determinado potencial aplicado será sempre observado um aumento rápido no valor da corrente idêntica a cada pulso de potencial [81].

2.8 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA E FUNÇÃO DE DESEJABILIDADE

Os fatores que influenciam no desempenho de métodos eletroanalíticos explorando determinações simultâneas, bem como cromatográficos, devem ser otimizados em função do comportamento simultâneo dos analitos em estudo. Desta forma, planejamentos fatoriais associados com multi-resposta empregando função de desejabilidade são ferramentas quimiométricas essenciais para a correta otimização dos métodos supracitados.

A otimização multivariada avalia simultaneamente todos os fatores selecionados levando em consideração também suas interações, além de exigir menor número de experimentos, menor tempo de execução e conseqüentemente menor consumo de reagentes. Em geral, na otimização multivariada aplica-se

primeiramente um planejamento fatorial e num segundo passo, utiliza-se de planejamentos mais complexos, como a metodologia de superfície de resposta, para obter a função matemática entre os fatores significantes e a resposta analítica, a partir da qual é possível calcular a condição ótima [83].

As funções de desejabilidade (do inglês, desirability) apresentadas por Derringer e Suich (1980), propõe uma ferramenta para otimização de experimentos multi-resposta [84]. Com o intuito de obter um resultado global, a desejabilidade global é obtida a partir de respostas individuais. De um modo geral esta ferramenta consiste em primeiramente converter as diversas respostas y_i ($i = 1, 2, \dots, m$) em funções de desejabilidade individuais d_i que varia de $0 \leq d_i \leq 1$. A condição $d_i=1$ é atribuída a resposta desejada e $d_i=0$ para a resposta que estiver fora da região aceitável. A função de desejabilidade individual é calculada pela equação 2 para o caso de se desejar a maximização das respostas estudadas.

$$d_i = \left(\frac{y_i - L}{H - L} \right) \quad (2)$$

Onde, y_i é a resposta, observada em um experimento particular, L e H são a maior e menor resposta, respectivamente, observada no conjunto de respostas consideradas. As variáveis independentes são escolhidas de maneira a maximizar a desejabilidade global (D), que é definida como a média geométrica ponderada das funções de desejabilidade individuais (d_i), de acordo com a equação 3:

$$D = \sqrt[m]{d_1^{P_1} \times d_2^{P_2} \times \dots \times d_n^{P_n}} \quad (3)$$

Onde m é o número de respostas e P_i é o peso correspondente a cada uma delas. Em se tratando da otimização de determinado sistema, as funções de desejabilidade são desenvolvidas adotando como critério as respostas máximas obtidas para as duas respostas, atribuindo a mesma importância para ambas respostas. Assim, os menores valores para cada conjunto de duas respostas são assumidos como não aceitável (desejabilidade zero) e para os

valores máximos, considerados como valores ótimos, uma desejabilidade 1 ($D=1$) é atribuída. Para se obter os perfis de desejabilidade atribui-se peso unitário para todas as funções de desejabilidade individuais. A aplicação de funções de desejabilidade oferece vantagens como objetividade, economia e eficiência na otimização de procedimentos de resposta múltipla.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral desenvolver um novo método voltamétrico visando a determinação simultânea de AA e PAR em formulações farmacêuticas, utilizando um eletrodo de pasta de nanotubo de carbono sem modificação química, na presença de surfactante catiônico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudo voltamétrico de AA e PAR, comparando o desempenho do eletrodo de NTC/nujol com o eletrodo de carbono vítreo;

Estudos do efeito do pH, tipos de eletrólitos suporte e força iônica, além da otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de pulso diferencial;

Determinação das figuras de mérito da metodologia analítica como limites de detecção, quantificação e precisão;

Avaliação do efeito de interferentes;

Aplicação do método na determinação de PAR e AA em formulações farmacêuticas;

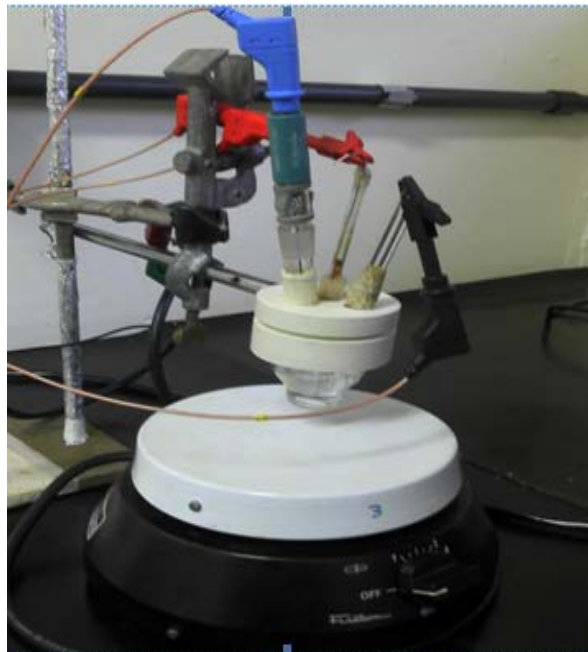
Validação da metodologia voltamétrica usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 INSTRUMENTAL

As medidas eletroquímicas foram realizadas num potenciostato/galvanostato modelo PGSTAT101 da Autolab com o emprego de uma célula eletroquímica de 3 eletrodos, como ilustrado na Figura 9. O eletrodo de Ag/AgCl (3 mol L^{-1}) foi empregado como referência (azul), uma espiral de fio de platina como contra eletrodo (preto) e o eletrodo de pasta de NTC como eletrodo de trabalho (vermelhos). Com intuito de avaliar o desempenho do eletrodo de NTC, utilizou-se um eletrodo de carbono vítreo (CV).

Figura 9 – Representação de uma célula eletroquímica utilizada nos experimentos, sendo (azul) o eletrodo de referência, (vermelho) o eletrodo de trabalho e (preto) o contra eletrodo.



Para o estudo de exatidão analítica, foi empregado, como técnica de referência, um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo LC-20AT, Shimadzu, operando como gradiente. Foi utilizado o detector de foto diodo UV-VIS a 225 nm e injetor com alça de $20 \mu\text{L}$. A separação foi realizada em uma coluna Shimadzu CLC-ODS (tamanho da coluna: $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$, tamanho da partícula: $5 \mu\text{m}$) a 25°C e uma velocidade de fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ usando como fase móvel tampão fosfato/metanol (50:50, v/v) em pH 6,2 sob condição isocrática [85].

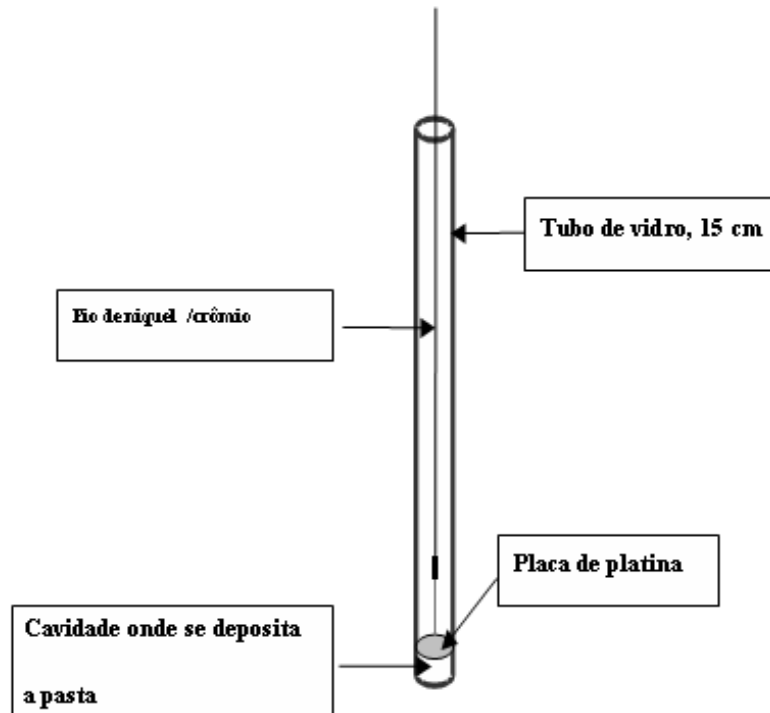
4.2 REAGENTES

As soluções de ácido ascórbico (Synth, 99%), paracetamol (Sigma-Aldrich, 99%), brometo de cetilpirídínio (CPB) (Sigma-Aldrich, 98%), brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) (Acros, 99%), foram preparados em água desionizada MILLI-Q (resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Soluções tampão de fosfato (Merck, 99%-102%), Tris-HCl (Invitrogen, 99,9%-100,1%), NaCl (F.MAIA,99%), KCl (Dinamica,99,5%) e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Vetec 98%-102%), foram utilizadas nos estudos relativos ao efeito do tampão no perfil voltamétrico de AA e PAR. Metanol (Sigma-Aldrich, $\geq 99,9\%$) foi utilizado para a validação por HPLC.

4.3 PREPARO DO ELETRODO

O eletrodo de trabalho (area geométrica $0,942 \text{ cm}^2$) foi preparado através de uma mistura de nanotubos de carbono multicamadas (fornecido por CNT Co. Ltda. Yeonsu-Gu, Incheon, Korea 93% diâmetro 10-40 nm e comprimento de 5-20 μm) e óleo mineral (Nujol®), na proporção de 22:78% (m/m) [86]. Cabe mencionar que, devido a seu caráter isolante, a diminuição da proporção do aglutinante óleo mineral possivelmente ocasionaria aumento das correntes de pico de PAR e AA. No entanto, o manuseio da pasta se torna prejudicado com pouca quantidade de óleo mineral, ocasionando baixa aderência da pasta na cavidade do eletrodo. Assim sendo, a composição acima mencionada foi adotada nos experimentos. Após a mistura de NTC e óleo mineral, esta foi homogeneizada em uma placa de petri com uma espátula metálica por 15 minutos. Após esse procedimento, a pasta foi colocada cuidadosamente em uma cavidade (3 mm de diâmetro, 1 mm de profundidade) de eletrodo de vidro tendo como suporte uma placa de platina (Figura 10). Finalmente, a superfície do eletrodo de pasta foi compactada a fim de deixar sua superfície lisa e enxaguada cuidadosamente com água MILLI-Q.

Figura 10 – Esquema representativo do eletrodo de trabalho baseado em pasta de NTC.



4.4 PROCEDIMENTO DE OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MÉTODO DE VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL (VPD)

Os parâmetros de otimização do método de VPD para determinação simultânea de PAR e AA foi otimizado por meio de um planejamento fatorial de 2^3 , utilizado para fazer uma triagem da influência de cada fator sobre a resposta analítica, e uma matriz de Doehlert para otimização final. Os parâmetros instrumentais analisados foram a Amplitude de Pulso (AP)(mV), o tempo de modulação (TM) em segundos e Velocidade de Varredura (VV) (mV s^{-1}). Todos os dados foram processados usando o programa STATISTICA (versão 6.0).

As respostas analíticas averiguadas foram a corrente de pico de oxidação e a largura do pico para ambos analitos, AA e PAR. Cada resposta analítica foi calculada como desejabilidade individual (d_i), conforme mencionado na seção 2.8. No presente trabalho, foi adotado a escala de desejabilidade individual variando de 0 (para uma resposta inaceitável) a 1 (para a resposta desejada), conforme equação 2, para maximizar a resposta analítica, ou seja, aumentar a corrente de oxidação e diminuir a largura do pico de AA e PAR. No entanto, deve-se ressaltar que a melhor resposta para largura do pico ($W/2$) foi definida como aquela

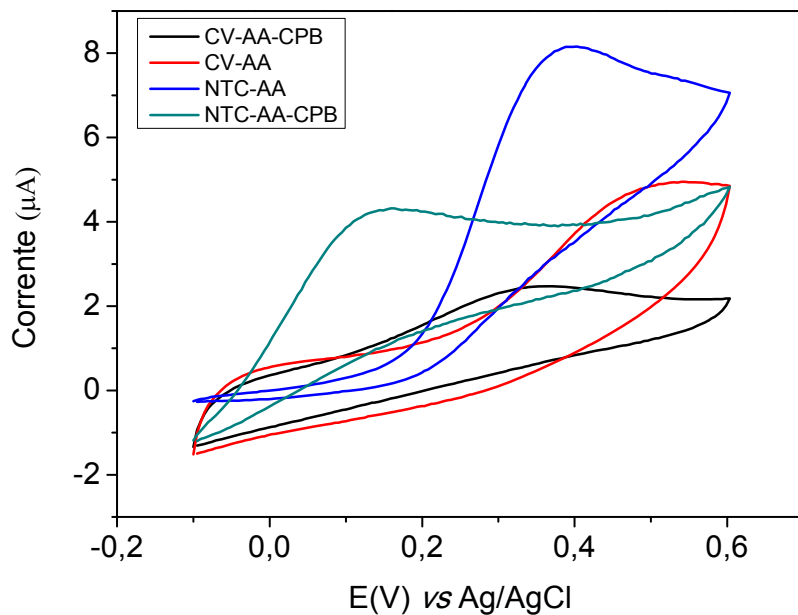
que proporciona a menor largura do pico. Após o cálculo das desejabilidades individuais, foram determinadas as desejabilidades globais (D) (seção 2.8), utilizando o mesmo peso para as respostas de PAR e AA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPORTAMENTOS VOLTAMÉTRICO DE AA E PAR UTILIZANDO ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO (CV) E PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO (NTC)

Para o estudo do comportamento voltamétrico dos analitos AA e PAR utilizou-se a técnica de voltametria cíclica e os eletrodos de carbono vítreo (CV) e nanotubo de carbono (NTC) na ausência e presença do surfactante CPB. A eficiência do eletrodo de estudo (NTC/Nujol) foi comparado com o eletrodo de CV, conforme pode ser observado nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 – Voltamogramas cíclicos de AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) na ausência e na presença de surfactante CPB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. 3º ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s^{-1} em eletrodos de CV e NTC. Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.

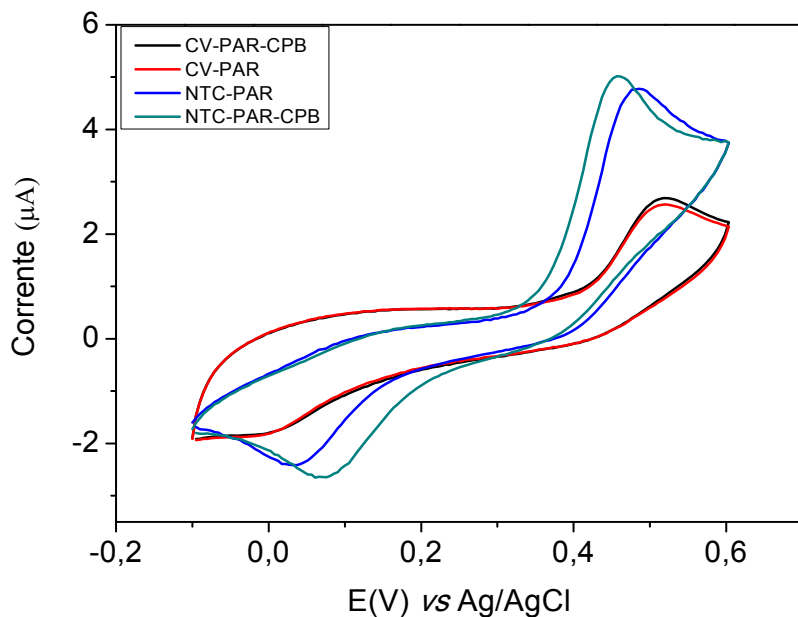


Os voltamogramas representados pela Figura 11 do AA demonstram que mediante a adição do surfactante, há um deslocamento de potencial de oxidação para valores menos positivos de 0,4 a 0,1 V para o eletrodo de NTC e de 0,5 a 0,3 V para o eletrodo de CV. Este comportamento pode ser explicado tendo em vista que o pKa do AA é de 4,2; ou seja, em pH 7,0 a molécula encontra-se desprotonada em forma de anion ascorbato, facilitando a interação eletrostática com

o surfactante catiônico que provavelmente está adsorvido na superfície do eletrodo de NTC, aumentando a transferência de elétrons [87]. Pode-se observar também que para o eletrodo de NTC há uma diminuição da corrente de pico do AA na presença de CPB, o que pode ser justificado provavelmente pela diminuição da área eletroativa do eletrodo.

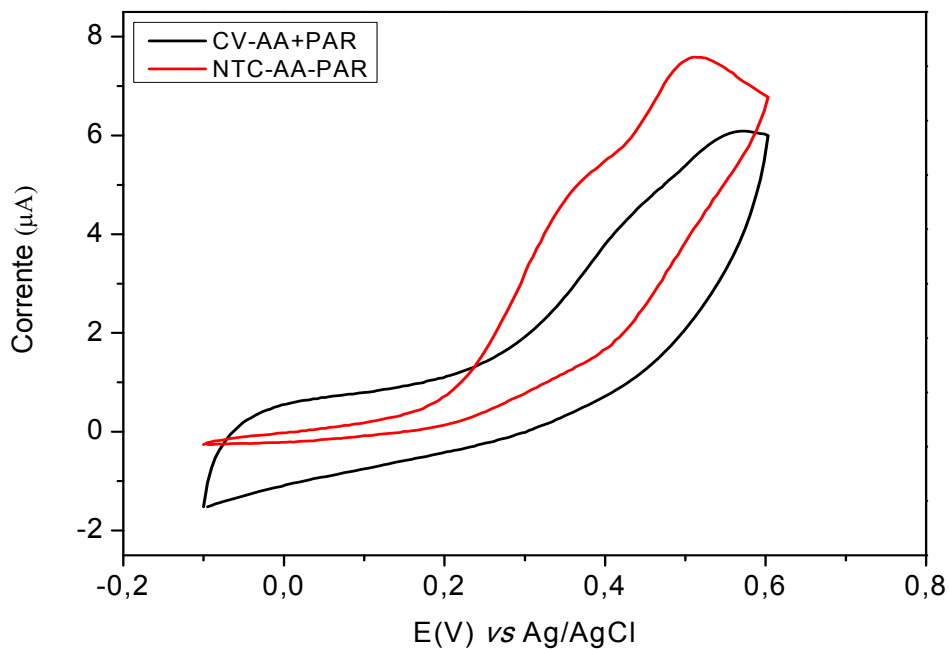
Para o PAR, constata-se que o deslocamento de potencial para valores menos positivo é menos pronunciado, de 0,5 a 0,45 V, para ambos os eletrodos de CV e NTC (Figura 12). No entanto, pode-se notar ganhos consideráveis na corrente de pico de oxidação ao se comparar o eletrodo de NTC com o de CV, tanto na presença quanto na ausência de surfactante, mostrando o melhor desempenho do sensor NTC para determinação de PAR. As medidas feitas com o eletrodo de NTC na presença de surfactante apresentaram um leve aumento na corrente de pico e deslocamento de potencial de oxidação para valores menos positivos de 20 mV, comparando com as medidas com eletrodo de NTC na ausência de surfactante.

Figura 12 – Voltamogramas cíclicos de PAR ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na ausência e na presença de surfactante CPB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. 3º ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s^{-1} em eletrodos de CV e NTC. Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.



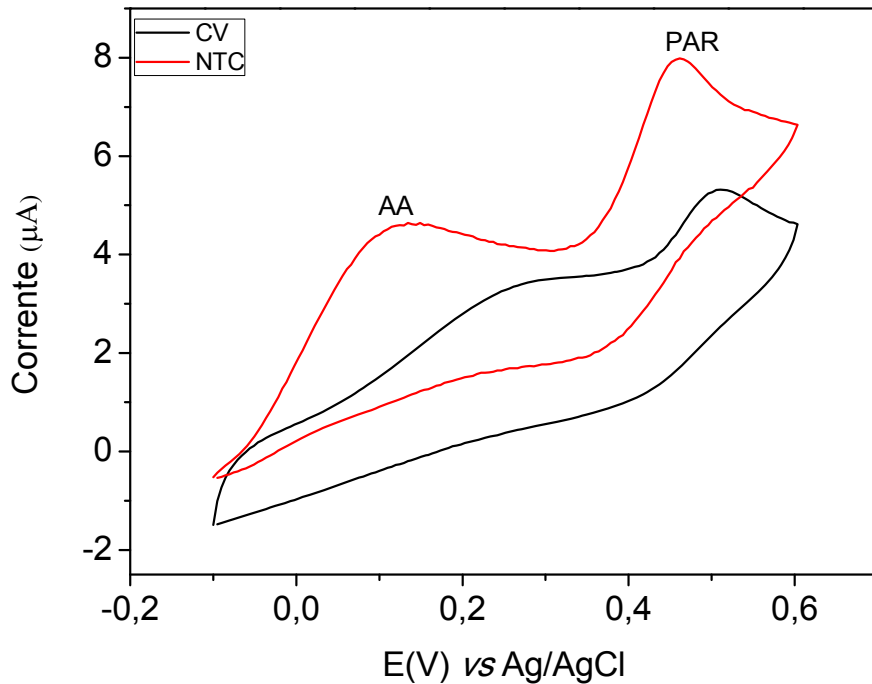
Foi avaliada a possibilidade de determinação simultânea de AA e PAR na ausência do surfactante catiônico em eletrodo de CV e NTC conforme Figura 13.

Figura 13 – Voltamogramas cíclicos de AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e PAR ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na ausência de CPB. 3º ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s^{-1} em eletrodos de CV e NTC. Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.



Na Figura 13 observa-se uma limitação na separação dos picos na determinação simultânea de AA e PAR em eletrodo de carbono vítreo. Porém, quando se utiliza o eletrodo de NTC, além do aumento na intensidade de corrente, ha também uma leve separação dos picos de AA e PAR, mas ainda impossibilitando a determinação simultânea dos dois fármacos. Entretanto, com a adição do surfactante CPB observa-se uma separação entre os picos de AA e PAR no eletrodo de CV de 250 mV. Por outro lado, a separação fica mais evidente (340 mV) quando se emprega o eletrodo de NTC como pode ser observado na Figura 14.

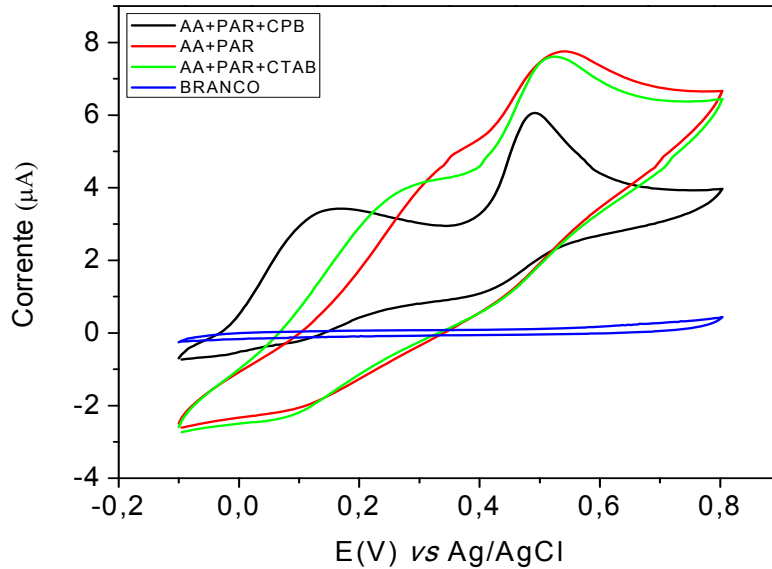
Figura 14 – Voltamogramas cíclicos de AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e PAR ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de surfactante CPB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. 3º ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s^{-1} com eletrodos de CV e NTC. Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.



5.2 INFLUÊNCIA DO TIPO E DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTANTES CATIÔNICOS NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AA E PAR

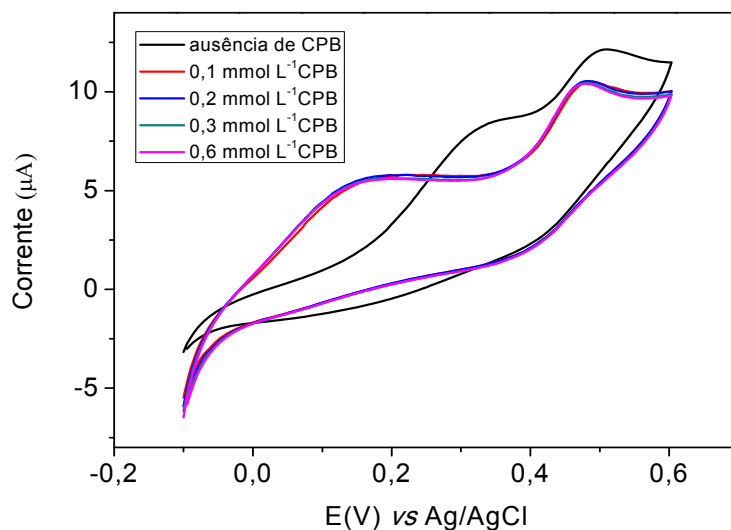
Embora o uso de surfactante catiônico seja essencial na separação dos picos, principalmente no eletrodo de NTC, foram avaliados o CPB e CTAB ambos em concentrações de $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 15). Verificou-se que a separação de pico na presença de CTAB foi substancialmente menor ($\Delta E_{pa} = 240 \text{ mV}$) em comparação com CPB ($\Delta E_{pa} = 350 \text{ mV}$). Este comportamento pode ser atribuído à maior atividade surfactante do CPB [88] em detrimento ao CTAB. Mediante estes resultados, optou-se pelo surfactante CPB para os estudos posteriores.

Figura 15 – Voltamogramas cíclicos de AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e PAR ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) com surfactantes catiônicos CPB e CTAB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. 3º ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s^{-1} . Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.



O efeito da concentração de CPB na separação dos picos de corrente de oxidação do AA e PAR foi estudado na faixa de $0,1$ a $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 16).

Figura 16 – Voltamogramas cíclicos de AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e PAR ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de surfactante CPB em concentrações de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ a $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$. 3º ciclo e velocidade de varredura de 80 mV s^{-1} . Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.

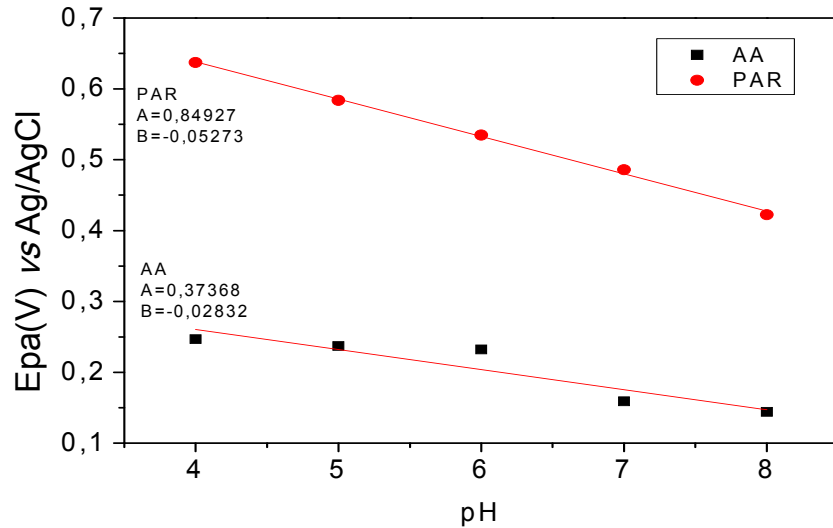


Não foi observada diferença significativa dentro deste intervalo de concentração, sendo assim a concentração de $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, foi adotada durante os demais experimentos. Concentrações menores não foram escolhidas a fim de garantir adequada separação dos picos de oxidação de AA e PAR, ao se empregar concentrações elevadas destes fármacos durante a construção da curva analítica. Cabe salientar ainda que o intervalo de concentração estudado ($0,1$ a $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$) está abaixo da concentração micelar crítica (CMC) do surfactante CPB [72], indicando que a separação dos dois fármacos em eletrodo de pasta de nanotubo de carbono não requer a um ambiente altamente organizado pelas micelas adsorvidas no eletrodo, como observado em trabalhos que fazem uso de eletrodos comerciais de carbono vítreo [22,78].

5.3 EFEITO DO PH NA OXIDAÇÃO DO AA E PAR

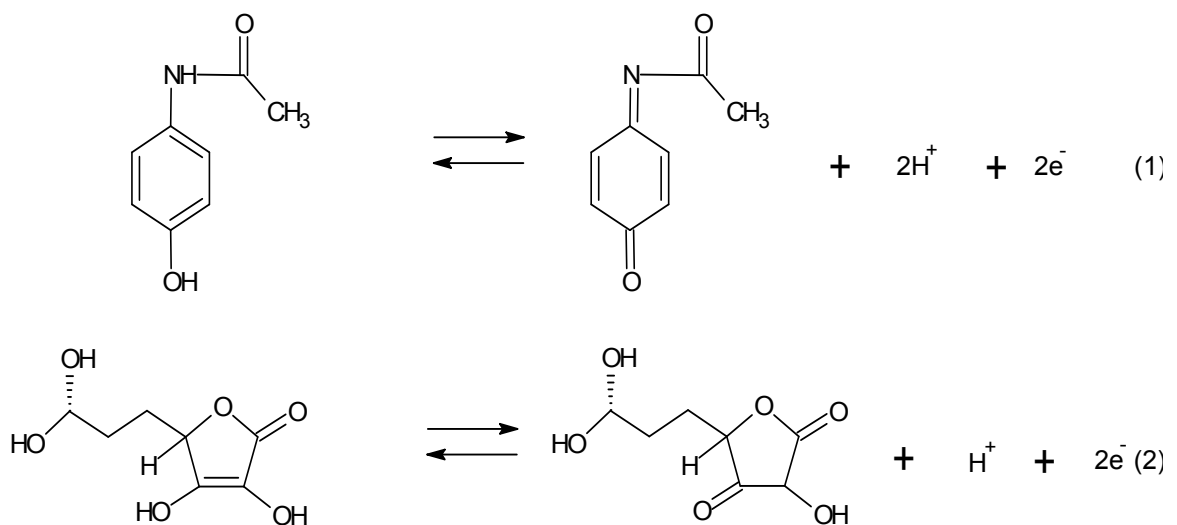
O efeito do pH no perfil voltamétrico de AA e PAR foi avaliado de 4,0 a 8,0. Nessa faixa de pH foi utilizado tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Como observado na Figura 17, os potenciais de pico de oxidação do AA e PAR dependem do pH e apresentam um comportamento linear, com coeficiente angular de $-52,7 \text{ mV}$ para o PAR, indicando que o número de elétrons e H^+ que participam do processo de oxidação é o mesmo; esses dados foram similares aos que foram observados por Habibi et al. (2011) [63]. No entanto, para o AA obteve-se um coeficiente angular de $-28,3 \text{ mV}$ indicando que a relação entre elétrons e H^+ é de 2:1, sendo esta relação também encontrada no trabalho de Dos Reis et al. (2005) [78].

Figura 17 – Dependência do pH com Epa (V). AA (0,5 mmol L⁻¹), PAR (0,1 mmol L⁻¹) na presença de CPB 0,3 mmol L⁻¹, 80 mV s⁻¹, 3º ciclo. Tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹.



O efeito do pH na oxidação do AA também pode ser interpretado pela participação dos íons H⁺ na oxidação (Esquema 1). Em meio ácido há um deslocamento da reação para a esquerda, indicando que potenciais maiores serão necessários para promover a oxidação do AA (2). No esquema 1 pode-se também observar a oxidação do PAR (1), deslocando-se para direita em meio básico assim como o AA (2), com conseqüente aumento do potencial de oxidação.

Esquema 1 - Mecanismo proposto para oxidação de PAR (1) e AA (2).



As correntes de pico anódico (I_{pa}) de AA e PAR também foram avaliadas em função do pH. De acordo com a Figura 18, a maior corrente de pico foi obtida em pH 6,0. Porém, ao analisarmos o efeito do pH numa solução binária (Figuras 19 A,B), observou-se uma melhor separação dos picos de oxidação de AA e PAR em pH 7,0, uma vez que a molécula de AA, por possuir pK_a de 4,2 encontra-se desprotonada ocasionando atração eletrostática com o surfactante catiônico adsorvido na superfície do eletrodo, e como consequência, promovendo um deslocamento do pico de oxidação do AA para valores mais negativos, aumentando a seletividade do método. Para o PAR apesar de em pH 7,0 a corrente ter sido menor do que em relação ao pH 6,0, nota-se que na Figura 19 que o pico ficou melhor definido em uma solução binária, sendo assim o pH 7,0 foi escolhido para os estudos posteriores.

Figura 18 – Dependência do pH com I_{pa} (μA), AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e PAR ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de CPB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, 80 mV s^{-1} , 3º ciclo. Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

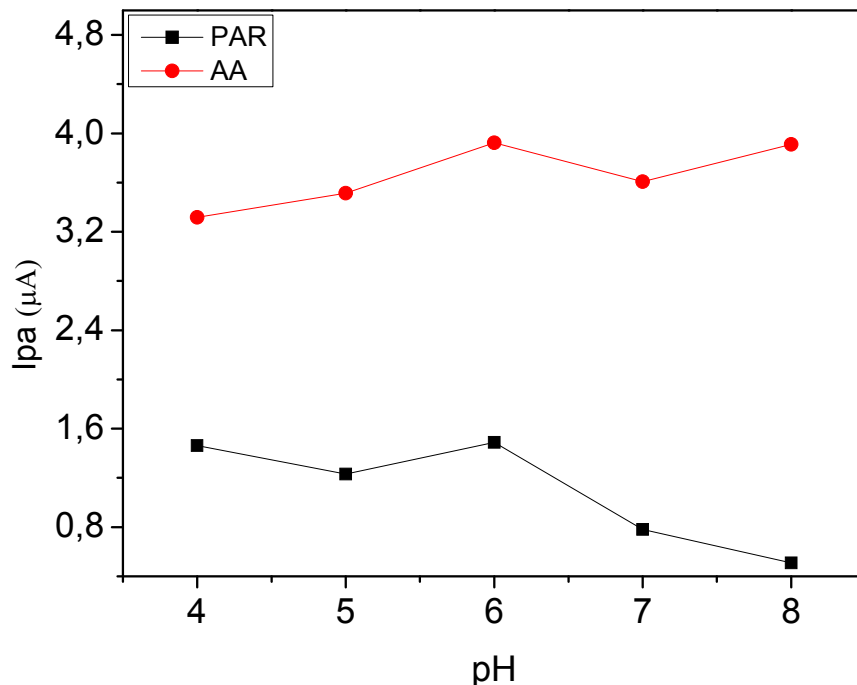
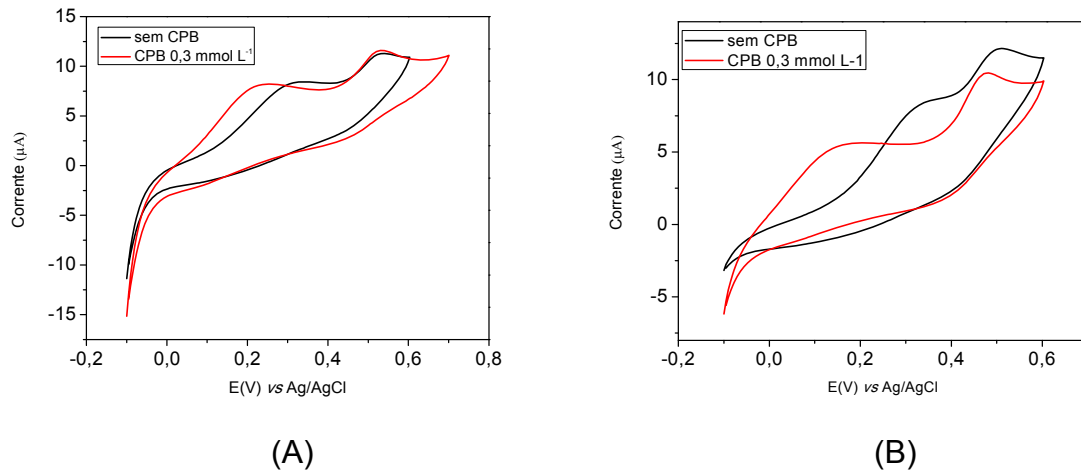


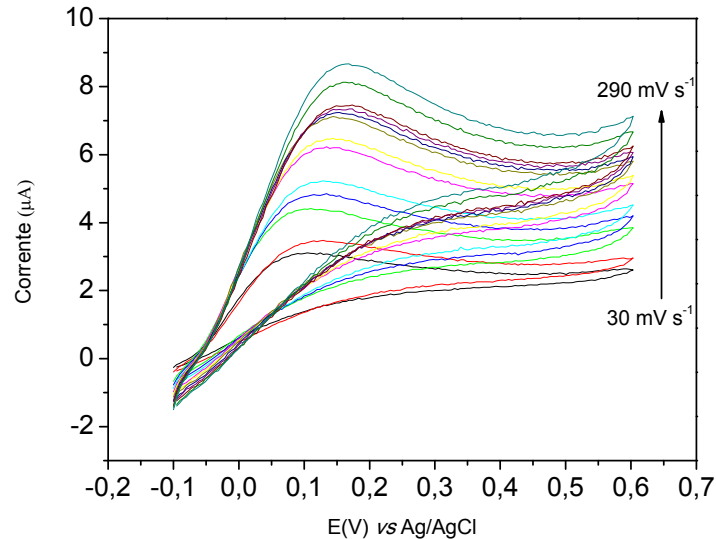
Figura 19 – Voltamogramas cíclicos para (AA 0,5 mmol L⁻¹) e PAR (0,1 mmol L⁻¹) na presença de CPB 0,3 mmol L⁻¹. Tampão fosfato 0,1mol L⁻¹. (A) pH 6,0 (B) pH 7,0.



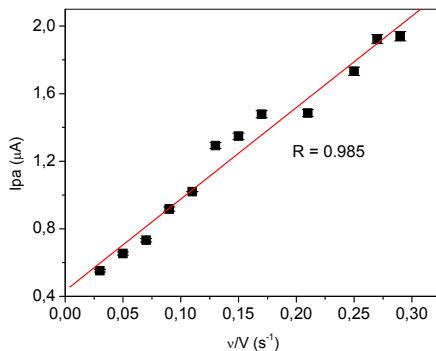
5.4 EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA NA OXIDAÇÃO DO AA E PAR

O efeito da velocidade de varredura no comportamento voltamétrico do AA e PAR foi realizado no eletrodo de trabalho NTC/Nujol em tampão fosfato 0,1mol L⁻¹, AA 0,5 mmol L⁻¹, PAR 0,1 mmol L⁻¹, CPB 0,3 mmol L⁻¹, como mostrado nos voltamogramas das Figuras 20 e 21 aplicando velocidades de varredura de 30 a 290 mV s⁻¹.

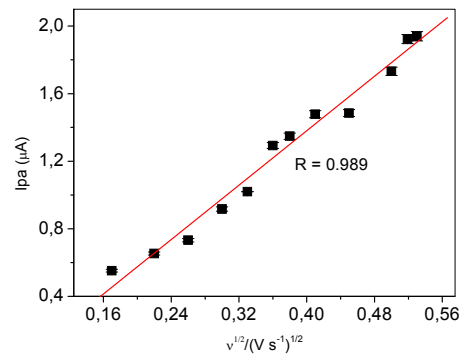
Figura 20 – (A) Voltamogramas cíclicos de AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de CPB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$; (B) Relação de I_{pa} (μA) vs v (mV s^{-1}); (C) relação de I_{pa} vs $v^{1/2}$ (mV s^{-1}) $^{1/2}$. Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



(A)



(B)

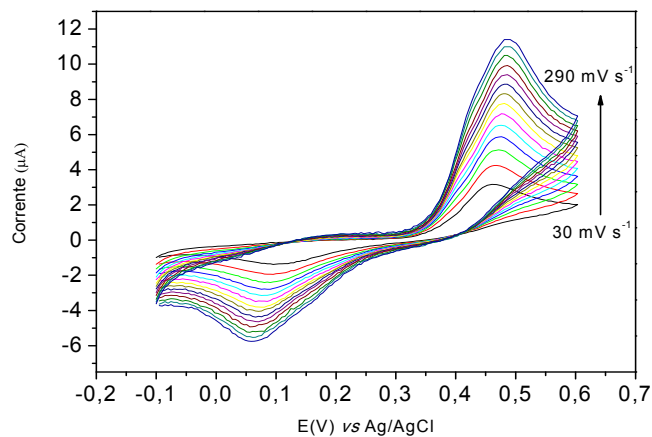


(C)

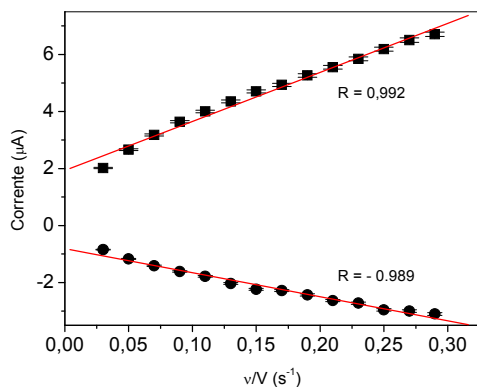
As Figuras 20 (B e C) e 21 (B e C) mostram um aumento na magnitude de correntes anódicas e catódicas (apenas para o PAR) com o aumento da velocidade de varredura, (I_{pa} vs v assim como de a I_{pa} vs $v^{1/2}$). A melhor correção linear destes gráficos foi verificada para o comportamento da I_{pa} vs $v^{1/2}$, mostrando que o processo de oxidação de ambos os analitos é controlado por difusão. Porém, uma análise mais detalhada do comportamento I_{pa} vs v , revela boa correlação para baixas velocidades de varredura inferiores a 100 mV s^{-1} (Figuras 20 B e 21 B). Este comportamento mostra que não há limitação cinética do transporte de elétrons. Porém, para altas velocidades (acima de 100 mV s^{-1}), a transferência de

massa dos analíticos por meio do fenômeno de difusão para a superfície do eletrodo, não acompanha a taxa de transferência de elétrons. Este comportamento é corroborado pelo leve deslocamento dos potenciais de oxidação do AA e PAR para valores mais positivos quando se aumenta a velocidade de varredura (Figura 20A e 21A).

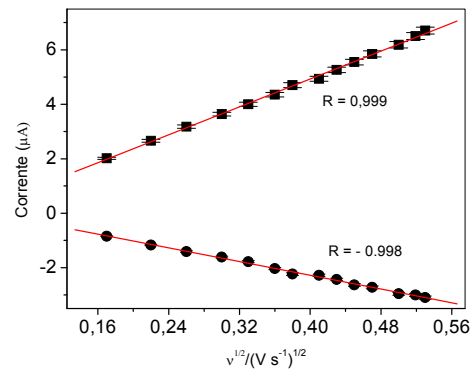
Figura 21 – (A) Voltamogramas cíclicos de PAR (0,1mmol L⁻¹) na presença de CPB 0,3 mmol L⁻¹. (B) Relação de I_{pa} (μA) vs v (mV s⁻¹). (C) relação de I_{pa} vs $v^{1/2}$ (mV s⁻¹)^{1/2}. Tampão fosfato 0,1mol L⁻¹.



(A)



(B)



(C)

5.5 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO DE AA E PAR NA PRESENÇA DE CPB

A cronoamperometria foi empregada para determinar o coeficiente de difusão do AA e PAR, em um tempo de 60 s e potenciais de 0 e 400 mV respectivamente, variando a concentração dos analitos de 0,05 mmol L⁻¹ a 0,20

mmol L⁻¹, conforme verificado nos amperogramas das Figuras 22 e 23. Para o analito eletroativo (AA e PAR) com coeficiente de difusão D, a corrente observada para a reação eletroquímica na condição limite de transporte de massa é descrita pela equação de Cottrell (4) [89].

$$I = \frac{nFAC_oD_o^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (4)$$

onde, n = 2, F é a constante de Faraday (96500 C), A é a área efetiva do eletrodo (cm²), D_o é o coeficiente de difusão (cm² s⁻¹) e C_o é a concentração (mol cm⁻³).

Figura 22 – Cronoamperograma de I_{pa} (μA) vs tempo (s). AA 0,05 mmol L⁻¹ a 0,20 mmol L⁻¹ na presença de CPB 0,3 mmol L⁻¹. Tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) t = 60 s e E_a = 0 V.

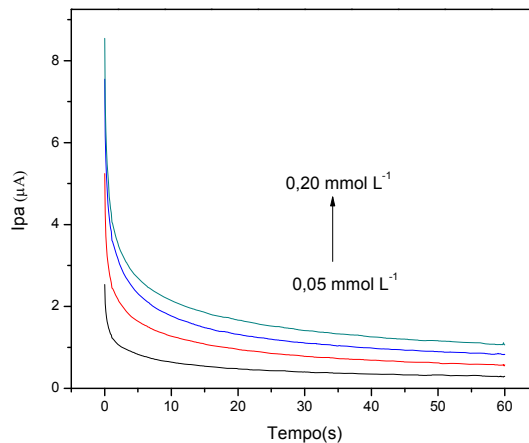
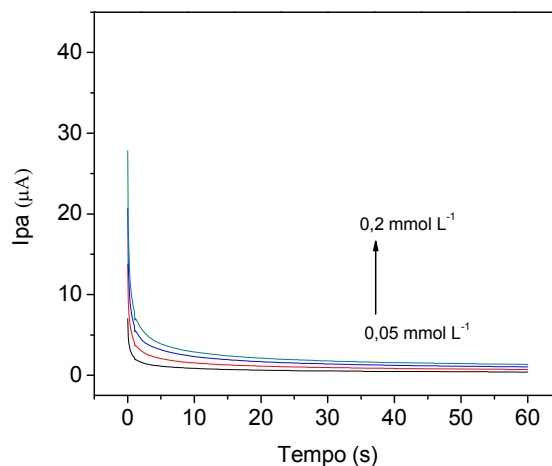


Figura 23 – Cronoamperograma de I_{pa} (μA) vs tempo (s). PAR 0,05 mmol L⁻¹ a 0,20 mmol L⁻¹ na presença de CPB 0,3 mmol L⁻¹. Tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) t = 60 s e E_a = 400 mV.



Para determinar o coeficiente de difusão do AA e PAR foram construídos gráficos lineares de I (μA) vs $t^{-1/2}$ ($\text{s}^{-1/2}$) em diferentes concentrações, cujo coeficiente angular foi utilizado para o cálculo dos coeficientes de difusão.

Figura 24 – Gráficos de I_{pa} (μA) vs $t^{-1/2}$ obtidos dos cronoamperogramas variando concentrações de 0,05 a 0,20 mmol L^{-1} de AA.

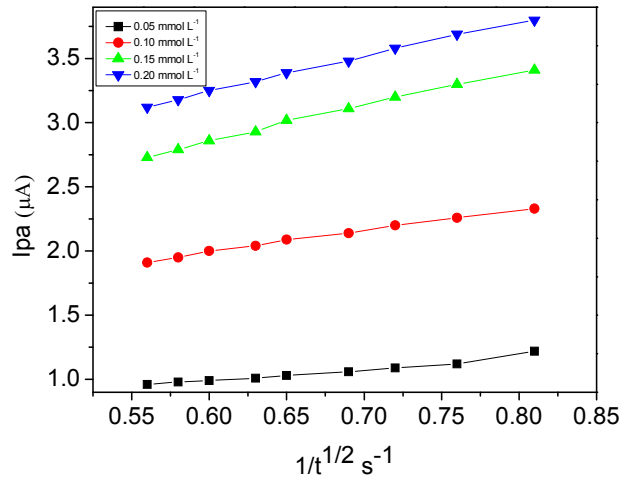
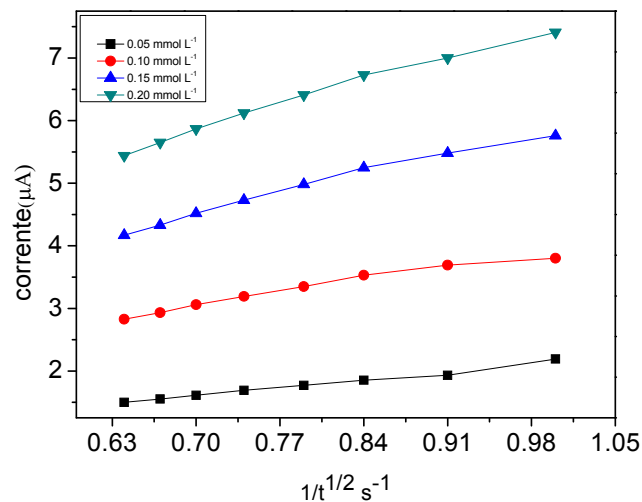


Figura 25 – Gráficos de I_{pa} (μA) vs $t^{-1/2}$ obtidos dos cronoamperogramas variando concentrações de 0,05 a 0,20 mmol L^{-1} de PAR.



A partir da equação de Cottrell, com os coeficientes angulares dos gráficos I (μA) vs $t^{-1/2}$ ($\text{s}^{-1/2}$), determinou-se os coeficientes de difusões médios para o AA de $4,12 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e de $3,31 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para o PAR.

Cabe salientar que, para o cálculo do coeficiente difusional por meio da equação de Cottrell, encontrou-se a área efetiva do eletrodo através da equação de Randles-Sevcik (5) [89], usando o coeficiente angular de I_p vs $v^{1/2}$ da sonda $K_4Fe(CN)_6$ 5,0 mmol L⁻¹ em 1,0 mol L⁻¹ KCl.

$$I_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C \quad (5)$$

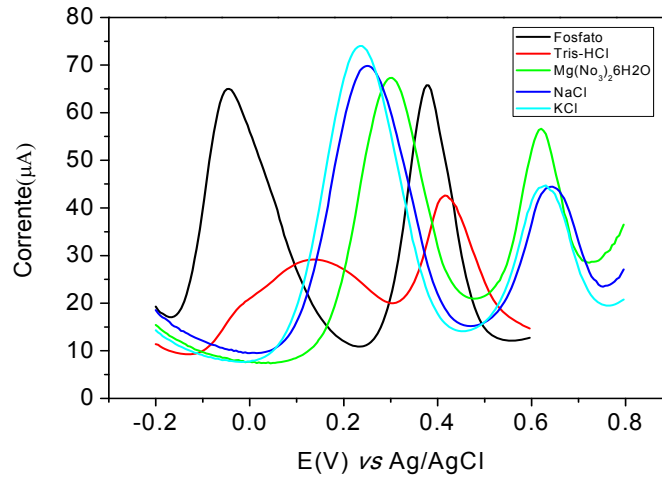
Onde $n = 1$ e D é o coeficiente de difusão de $K_4Fe(CN)_6$ no valor de $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Os valores dos coeficientes de difusão aqui obtidos são similares aos reportados na literatura. Wang et al. (2007) [62], utilizando um eletrodo de carbono vítreo revestido com nanopartículas de níquel magnético, obteve coeficiente de difusão de $4,97 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para o PAR. Por outro lado, no trabalho realizado por Dos Reis et al. (2005) [78] utilizando medidas na presença de 1,0 mmol L⁻¹ de CPC, os autores determinaram um coeficiente de difusão substancialmente baixo para o AA de $2,15 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, possivelmente por conta da formação de micelas no seio da solução.

5.6 EFEITOS DO ELETRÓLITO E SUA CONCENTRAÇÃO NA OXIDAÇÃO DO AA E PAR

Para avaliar os diferentes compostos como suporte eletrolítico na oxidação do AA e PAR, foram usados os seguintes eletrólitos: tampão fosfato, Tris-HCl e os sais cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl) e nitrato de magnésio $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ em concentrações de 0,1 mol L⁻¹ e em pH 7,0. Adotou-se a técnica de pulso diferencial nestes experimentos, por conta da inerente maior sensibilidade em comparação a voltametria cíclica. Os voltamogramas apresentados na Figura 26 foram realizados a uma velocidade de varredura de 30 mV s^{-1} e uma amplitude de 100 mV.

Figura 26 – Voltamogramas de pulso diferencial variando eletrólitos na presença de CPB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e PAR ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), velocidade de varredura 30 mV s^{-1} e amplitude de 100 mV .

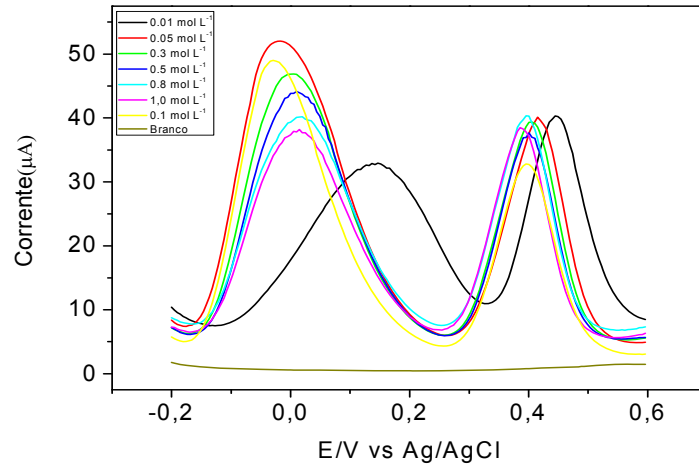


De acordo com os voltamogramas de pulso diferencial apresentados na Figura 21, a escolha do eletrólito tampão fosfato foi destacada devido ao deslocamento dos potenciais de oxidação para valores menos positivo, bem como pelos maiores valores de corrente de oxidação, rendendo um aumento na seletividade e sensibilidade na determinação simultânea de AA e PAR. Dentre os eletrólitos avaliados, o tampão Tris-HCl apresentou menor desempenho no tocante as correntes de oxidação e a separação dos picos, possivelmente por apresentar baixa condutividade na solução. Em relação aos sais KCl, NaCl e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, verificou-se satisfatórias correntes para AA e PAR, porém, os potenciais de oxidação, quando comparado ao tampão fosfato, foram deslocados para valores mais positivos. Assim, adotou-se o tampão fosfato para os posteriores estudos.

5.7 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO FOSFATO

Foi avaliado o efeito da concentração do tampão fosfato no desempenho voltamétrico de AA e PAR, alterando a concentração de $0,01$ a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, conforme apresentado na Figura 27.

Figura 27 – Influência da concentração do tampão fosfato no perfil voltamétrico da mistura de AA ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e PAR ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de surfactante CPB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$.



Analisando a Figura 27, observa-se um deslocamento do potencial de oxidação de AA e PAR para valores mais positivos, bem como menores correntes de oxidação quando se emprega $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato. Alterando a concentração do tampão para $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, verifica-se um aumento considerável nas correntes de oxidação de AA e PAR, porém, os picos de corrente são mais alargados. Utilizando $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão, a separação dos picos de AA e PAR e as intensidades de correntes de oxidação são satisfatórias. Por outro lado, concentrações de tampão acima de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, conferem uma diminuição da intensidade de corrente de oxidação do AA, mas pouca influência do pico de oxidação do PAR. Estes resultados eram um tanto quanto esperado, tendo em vista que em pH 7,0, o AA encontra-se na forma aniônica e um excesso de tampão atenua a atração eletrostática do analito com a superfície do eletrodo, que se encontra carregada positivamente com o surfactante CPB, diminuindo a transferência de elétrons. Mediante os resultados obtidos, optou-se por utilizar a concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato.

5.8 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL

A técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) foi selecionada para o desenvolvimento do método analítico visando à determinação simultânea de

AA e PAR. A influência dos tipos e concentrações dos eletrólitos no perfil voltamétrico do AA e PAR, utilizando VPD foram previamente estudadas. Assim, a influência dos parâmetros eletroquímicos relativos à técnica VPD incluindo tempo de modulação (TM), velocidade de varredura (VV) e amplitude de pulso (AP), foram estudados fixando a concentração do tampão fosfato em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e surfactante CPB em $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$.

Para avaliar o efeito dos parâmetros eletroquímicos, fez-se uso de um planejamento fatorial 2^3 , ou seja, realizou-se um conjunto de oito ensaios em duplicata totalizando 16 experimentos, utilizando como resposta a corrente e a largura do pico. O planejamento fatorial permite extrair do sistema em estudo o máximo de informações com um número mínimo de experimentos [83]. A variação dos níveis esta representada na Tabela 1.

Tabela 1 – Fatores e níveis empregados no planejamento fatorial 2^3

Parâmetros estudados	Mínimo (-)	Máximo (+)
Tempo de modulação (ms) (TM)	5	50
Velocidade de Varredura (mV s^{-1}) (VV)	30	100
Amplitude de modulação (mV) (AM)	25	100

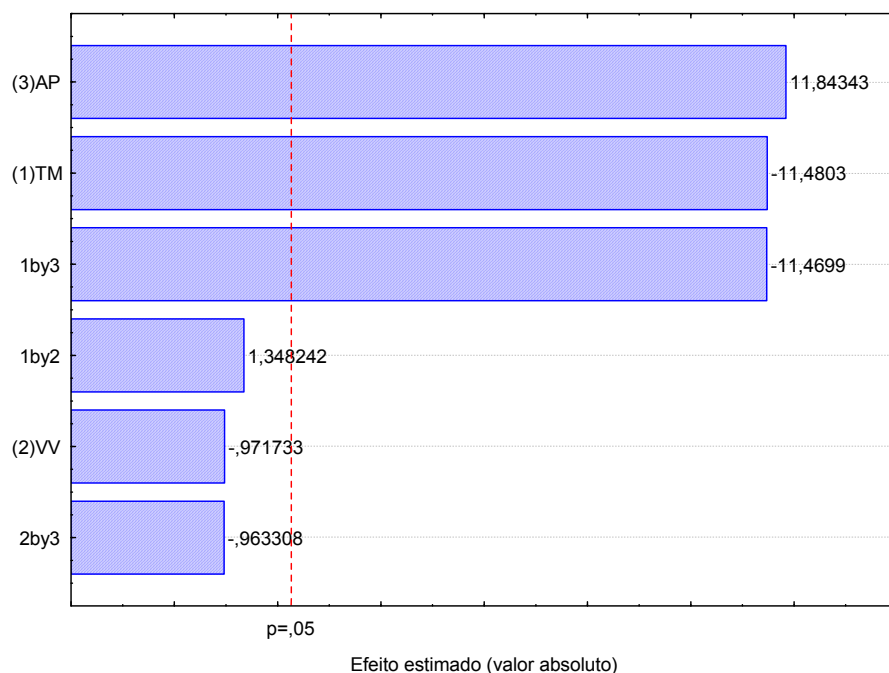
A Tabela 2 apresenta os resultados do planejamento fatorial 2^3 e o resultado da desejabilidade global. Adotou-se neste trabalho como resposta analítica a desejabilidade global, uma vez que a alteração dos níveis dos fatores estudados reflete na corrente e a largura do pico. Conforme mencionada na seção 4.4, para calcular a desejabilidade global de cada experimento foi necessário primeiramente determinar a desejabilidade individual de cada resposta, neste caso corrente e largura de pico. Assim sendo, cada resposta individual foi transformada em uma escala adimensional de desejabilidades individuais (d_i). A escala de desejabilidades individuais variou de 0 (para uma resposta inaceitável) a 1 (para a resposta desejada). Esta transformação tornou possível combinar os resultados obtidos para as propriedades medidas em diferentes ordens de grandeza. Com as desejabilidades individuais, determinou-se a desejabilidade global (D).

Tabela 2 – Matriz do planejamento fatorial e respostas analíticas

Ensaio	TM	VV	AP	Ipa (μ A) AA	Ipa (μ A) PAR	(W/2) AA	(W/2) PAR	DIpa AA	DIpa PAR	DW/2 AA	DW/2 PAR	D. GLOBAL
1,00	+	+	+	20,43	9,59	0,18	0,13	0,36	0,20	0,55	0,20	0,00193
2,00	-	+	+	47,36	38,84	0,19	0,12	1,00	1,00	0,37	0,47	0,04344
3,00	+	-	+	17,22	6,41	0,18	0,15	0,28	0,11	0,60	0,00	0
4,00	-	-	+	45,25	28,46	0,17	0,11	0,95	0,71	0,65	0,60	0,06588
5,00	+	+	-	5,78	3,09	0,18	0,10	0,01	0,02	0,55	0,73	0,00001
6,00	-	+	-	7,33	4,45	0,22	0,09	0,04	0,06	0,02	1,00	0,00001
7,00	+	-	-	5,50	2,38	0,14	0,10	0,00	0,00	1,00	0,77	0
8,00	-	-	-	6,02	3,89	0,18	0,11	0,01	0,04	0,60	0,68	0,00005
9,00	+	+	+	20,40	9,45	0,17	0,14	0,35	0,19	0,62	0,17	0,00184
10,00	-	+	+	47,50	38,90	0,19	0,11	1,00	1,00	0,39	0,64	0,06239
11,00	+	-	+	17,30	6,30	0,18	0,15	0,28	0,11	0,59	0,00	0,00001
12,00	-	-	+	45,20	28,20	0,17	0,11	0,95	0,71	0,63	0,60	0,06322
13,00	+	+	-	5,60	3,40	0,17	0,10	0,00	0,03	0,63	0,82	0,00001
14,00	-	+	-	7,10	4,30	0,23	0,09	0,04	0,05	0,00	1,07	0
15,00	+	-	-	5,70	2,50	0,14	0,10	0,00	0,00	1,00	0,76	0
16,00	-	-	-	6,10	3,90	0,17	0,11	0,01	0,04	0,63	0,69	0,00006

TM = tempo de modulação (ms), VV = velocidade de varredura (mV s^{-1}) e AP = amplitude de modulação (mV)

A fim de avaliar a significância dos fatores na resposta dada pela desejabilidade global, utilizou-se o diagrama de Pareto (Figura 28).

Figura 28 – Diagrama de Pareto obtido a partir dos experimentos reunidos na Tabela 2.

A significância dos fatores pode ser graficamente interpretada quando a barra horizontal forma maior que o valor de 0,05 (nível de confiança de 95%). Assim, o aumento da amplitude de pulso (25 para 100 mV) promove aumento do sinal analítico mostrando um efeito positivo de 11,84. Por outro lado, quando se aumenta o tempo de modulação (5 para 50 ms) a resposta analítica diminui. Dentro do domínio experimental (30 a 100 mV s⁻¹) a velocidade de varredura não apresentou significância na resposta analítica. Assim, esta variável foi fixada em 100 mV s⁻¹. É importante mencionar que a interação entre tempo de modulação (TM) e amplitude de pulso (AP) foi significativa, com efeito negativo de -11,46, mostrando que melhores respostas analíticas podem ser obtidas com o menor e maior nível para TM e AP, respectivamente. Desta forma, a otimização final destas duas variáveis foi realizada mediante o uso da matriz de Doehlert, como mostrado na Tabela 3. Esta matriz é composta por 7 ensaios diferentes, sendo o ponto central realizado em quadruplicata. Igualmente ao planejamento fatorial completo 2³, adotou-se a desejabilidade global como resposta para a matriz de Doehlert.

Tabela 3 – Matriz de Doehlert utilizada para otimização do tempo de modulação e amplitude de pulso.

	TM (ms)	AP (mV)	Ipa (μA)	Ipa (μA)	W/2	W/2	Dlpa	Dlpa	DW/2	DW/2	D GLOBAL
			AA	PAR	AA	PAR	AA	PAR	AA	PAR	
1	0(5)	0(100)	49,56	27,96	0,15	0,10	0,45	0,44	1,00	0,78	0,03812989
1	0(5)	0(100)	52,79	31,70	0,16	0,10	0,48	0,50	0,80	0,89	0,04301413
1	0(5)	0(100)	47,18	30,06	0,15	0,10	0,42	0,48	1,00	0,78	0,03881579
1	0(5)	0(100)	51,84	29,18	0,16	0,10	0,47	0,46	0,80	0,78	0,03371301
2	0(5)	1(180)	100,60	45,43	0,18	0,14	1,00	0,74	0,00	0,00	0
3	0,866(8)	0,5(140)	70,17	42,31	0,17	0,13	0,67	0,68	0,40	0,11	0,00507433
4	0(5)	-1,0(20)	8,55	1,94	0,16	0,09	0,00	0,00	0,60	1,00	0
5	-0,866(2)	-0,5(60)	28,97	19,49	0,16	0,11	0,22	0,30	0,60	0,67	0,0065882
6	-0,866(2)	0,5(140)	88,61	61,05	0,17	0,11	0,87	1,00	0,20	0,56	0,02415297
7	0,866(8)	-0,5(60)	23,10	10,07	0,17	0,09	0,16	0,14	0,40	1,00	0,00217316

* experimentos realizados fixando a velocidade de varredura em 100 mV s⁻¹. Os primeiros números representados são os valores codificados da matriz de Doehlert e os números entre parênteses são os valores reais das variáveis.

O modelo estatístico obtido à partir da matriz de Doehlert é dado por:

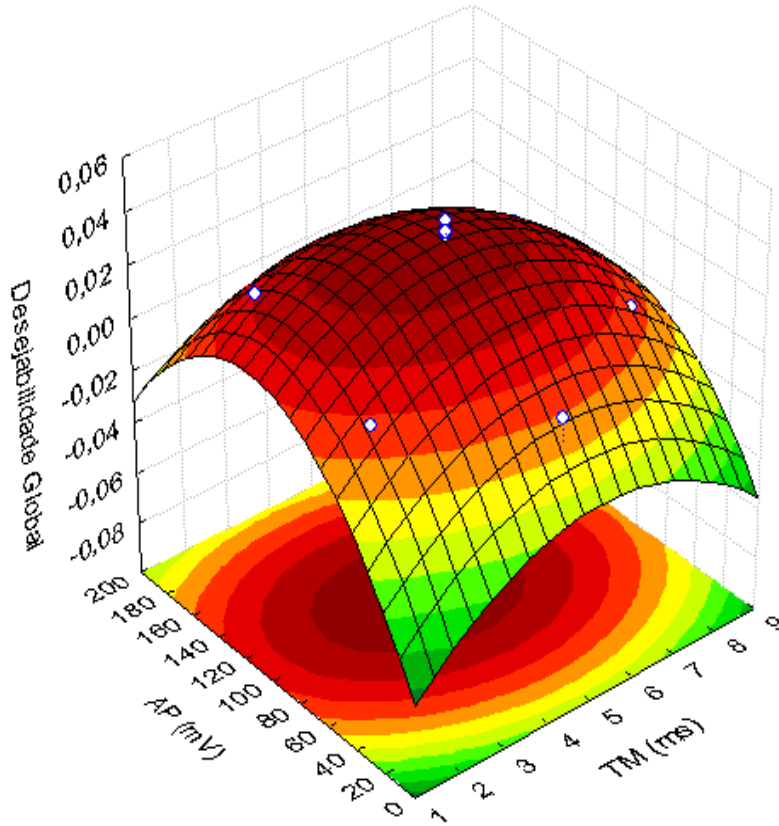
$$Dg = -0,085016 + 0,022560 AP - 0,002146 AP^2 + 0,001396 TM - 0,000006 TM^2 - 0,000031 APTM \quad (6)$$

Por meio da análise de variância (ANOVA) representada na Tabela 4, observa-se que o modelo quadrático não apresenta falta de ajuste, pois o F obtido experimentalmente (F(MQ falta de ajuste/ MQ erro puro)) é de 4,8141 sendo menor que o valor tabelado $F_{1,2} (5,59)$ [83]. Desta forma, foi possível construir a superfície de resposta da Figura 29. O modelo estatístico acima (equação 6) foi derivado em função do TM e AP e assim permitiu obter valores máximos de TM= 4,5 ms e AP= 104,7 mV.

Tabela 4 – ANOVA obtida pelo modelo quadrático gerado pela matriz de Doehlert.

Efeitos	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos Quadrados (MQ)	Teste F	Nível de Probabilidade (p)
TM	0,000138	1	0,000138	9,5159	0,053934
TM ²	0,000884	1	0,000884	60,9928	0,004370
AP	0,000035	1	0,000035	2,4071	0,218586
AP ²	0,001968	1	0,001968	135,7123	0,001359
TMxAP	0,000054	1	0,000054	3,7070	0,149846
Falta de ajuste	0,000070	1	0,000070	4,8141	0,115808
Erro puro	0,000044	3	0,000015		
Total	0,002931	9			

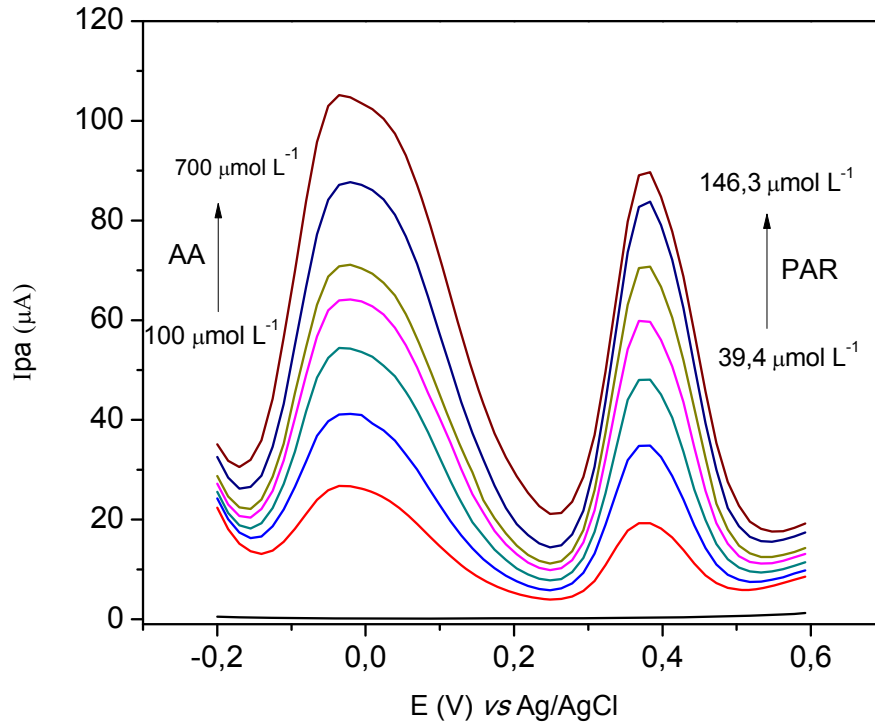
Figura 29 – Superfície de resposta da desejabilidade global entre amplitude de pulso e tempo de modulação.



5.9 DETERMINAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO PROPOSTO

Para a construção das curvas analíticas nas condições otimizadas da técnica de pulso diferencial, variou-se as concentrações de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $700,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para AA e de $39,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $146,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR.

Figura 30 – Voltamogramas de pulso diferencial de AA e PAR em tampão fosfato 0,1mol L⁻¹ (pH 7,0). Concentrações de 100 μmol L⁻¹ a 700 μmol L⁻¹ de AA e 39,4 μmol L⁻¹ a 146,3 μmol L⁻¹ de PAR. Tempo de modulação de 4,5 ms, amplitude de pulso de 104,7 mV e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.



Através das Figuras 31 e 32 foram calculados os limites de detecção e quantificação do método de acordo com as recomendações da IUPAC [90], equações 7 e 8:

$$LD = \frac{3xs_b}{b} \quad (7)$$

$$LQ = \frac{10xs_b}{b} \quad (8)$$

onde s_b é o desvio padrão do branco para 10 medidas e o b é o coeficiente angular da curva analítica. Sendo assim, foram obtidos os limites de detecção 2,1 μmol L⁻¹ e quantificação de 7,2 μmol L⁻¹ para o PAR. Para o AA os

limites de detecção e quantificação foram de $7,11 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $23,71 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 31 – Curva analítica para o PAR. Tempo de modulação de 4,5 ms, amplitude de pulso de 104,7 mV e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

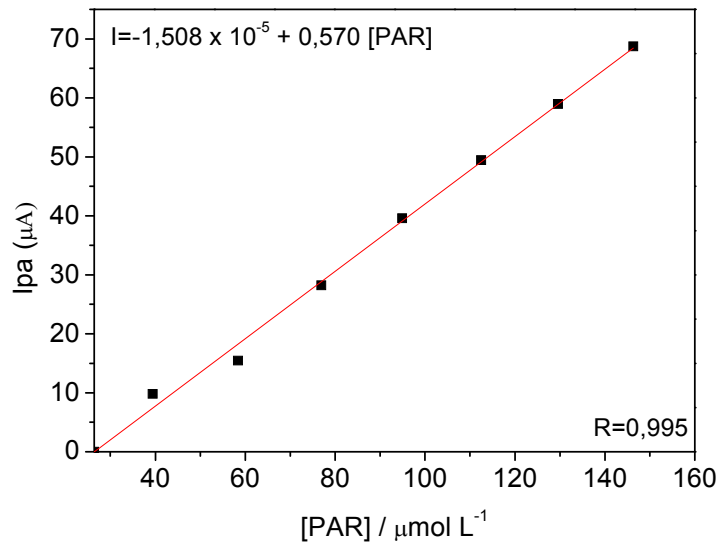
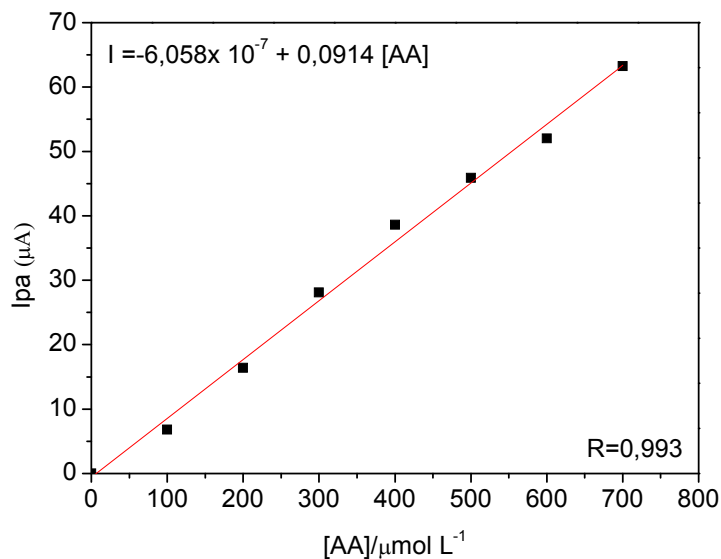


Figura 32 – Curva analítica para AA. Tempo de modulação de 4,5 ms, amplitude de pulso de 104,7 mV e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).



A precisão intra-dia do método foi checada tendo em vista o desvio padrão relativo (DPR) obtido para 10 medidas de soluções padrão de AA e PAR. Os

valores de DPR obtidos para AA foram de 1,4 e 1,0% para as respectivas concentrações de de 30,0 e 300,0 mmol L^{-1} . Para o PAR os valores foram de 1,9 e 1,3% para as concentrações de 10,0 e 120,0 mmol L^{-1} , respectivamente.

A influência de diferentes concentrações de AA e PAR sobre a eficiência de separação dos picos de oxidação também foi analisada. A Figura 33 mostra que concentrações crescentes de AA (100 a 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$) não altera o pico de oxidação e tampouco a corrente para PAR na concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Adicionalmente, a sensibilidade da curva analítica para AA nesta condição não difere significativamente daquela apresentada na Figura 32. Resultados similares foram obtidos para concentrações crescentes de PAR (39 a 146,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AA (Figura 34 e Figura 31). Estes resultados permitem concluir que o método desenvolvido é confiável para determinação simultânea de AA e PAR em diferentes proporções.

Figura 33 – Voltamogramas de pulso diferencial de AA e PAR. Concentrações de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AA e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ PAR. Tempo de modulação de 4,5 ms, amplitude de pulso de 104,7 mV e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0.

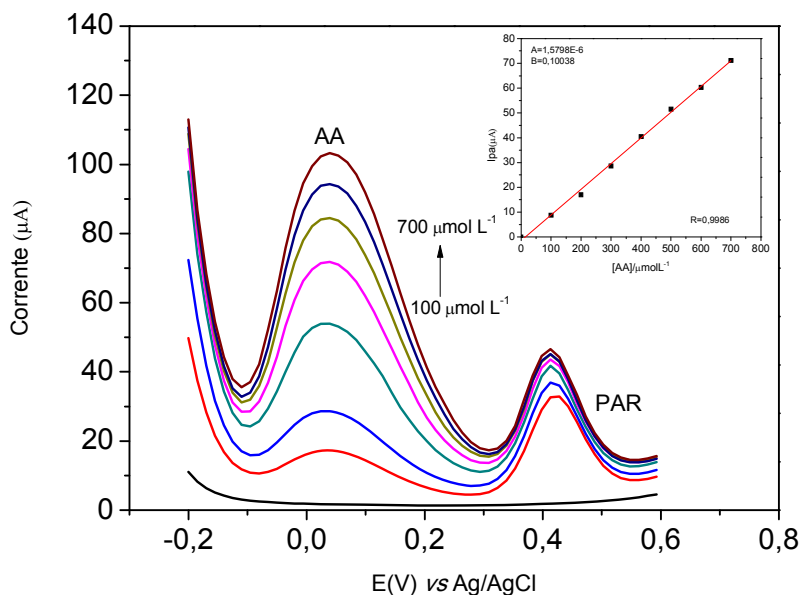
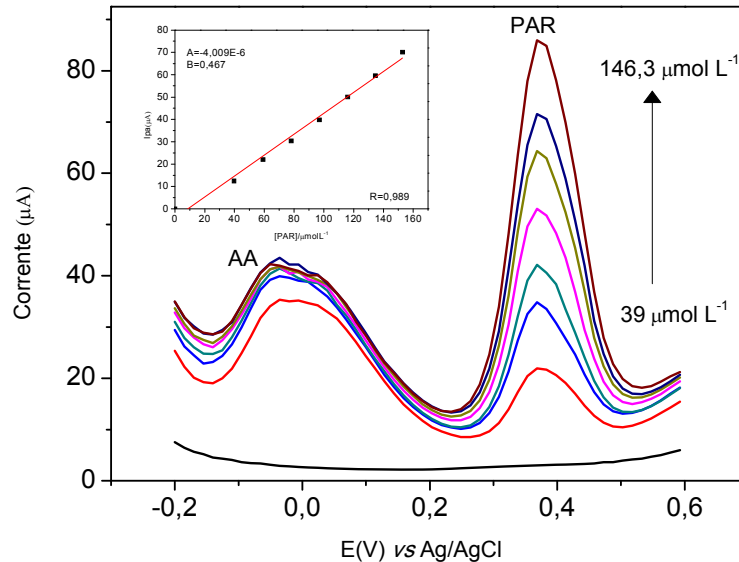


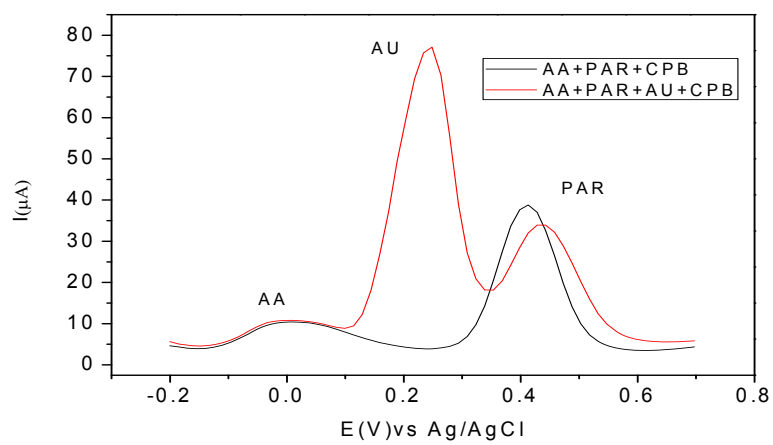
Figura 34 – Voltamogramas de pulso diferencial de AA e PAR. Concentrações de $39,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $146,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR e $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Tempo de modulação de $4,5 \text{ ms}$, amplitude de pulso de $104,7 \text{ mV}$ e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Tampão fosfato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH $7,0$.



5.10 ESTUDO DE INTERFERENTES

Com as condições otimizadas do método, foi analisado possíveis interferentes, dentre eles o ácido úrico, cafeína, glicose, uréia e 2-nitrofenol. Cada composto foi avaliado na determinação individual de AA e PAR ou simultânea de ambos, na presença de CPB $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. A concentração de AA e PAR foi fixada em $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Nenhuma alteração na resolução dos picos de AA e PAR foi observada até a proporção de 1:10 (mol/mol, analito:interferente). No entanto, constatou-se ainda, que o método permite determinar ácido úrico (AU) na presença de AA e PAR com satisfatória separação dos picos de oxidação (Figura 35), embora é notado que em concentrações superiores, o pico de oxidação do PAR desloca para potenciais mais positivos.

Figura 35 – Voltamogramas de Pulso Diferencial de AA e PAR na presença e ausência de ácido úrico.



6 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E EXATIDÃO ANALÍTICA

Através das condições já otimizadas, o método desenvolvido foi aplicado em diferentes amostras farmacêuticas contendo AA e PAR, individual ou simultaneamente.

Foram analisados seis fármacos, sendo 5 de marcas comerciais (3 comprimidos, 1 em pó (antigripal) e o outro em líquido). Para a determinação de PAR na Amostra I (Líquido “medicamento em gotas”), inicialmente a amostra foi diluída 100 vezes em uma solução água/álcool (1:1, v/v). Posteriormente, uma alíquota de 0,1 mL dessa solução foi transferida para a célula eletroquímica contendo CPB e posteriormente o volume foi completado para 15 mL com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0.

Para os medicamentos II (PAR e AA), III (PAR) e IV (PAR), contendo AA e/ou PAR, pesou-se 5 comprimidos, macerou-os até se obter um pó fino e bem misturado. Os mesmos foram pesados com uma massa conhecida e diluídos em 5 mL de água/álcool (1:1, v/v) de acordo com as concentrações desejadas e sonificado por 10 minutos [2,26]. Posteriormente, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL. Uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para uma célula eletroquímica contendo CPB e, posteriormente, o volume foi completado para 15 mL com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0.

Para as amostras V (pó antigripal) e VI (comprimido efervescente), 0,25 g e 0,38 g, respectivamente, foram pesados e dissolvidos em água.

Os mesmos procedimentos adotados no preparo das amostras visando às análises voltamétricas foram adotados nas análises por HPLC, exceto pelo processo de filtração em filtros de porosidade de 0,22 µm. Para construção da curva analítica por HPLC, foram pesados 30,0 mg e 100,0 mg de padrões de PAR e AA, respectivamente. Os padrões foram dissolvidos na fase móvel MeOH/Tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ pH 6,2, cujo volume foi aferido para balão volumétrico de 10 mL. Um volume de 20 µL da solução foi injetado manualmente no HPLC e cromatografado conforme seção 4.1.

Conforme Tabela 5, observa-se com base nos erros relativos (Er_2) que os valores determinados pelo método foram muito semelhantes aos valores descritos pelos fabricantes. A exatidão do método foi checada comparando as

concentrações determinadas pelo método com aquelas obtidas pela técnica de referência (HPLC). Os resultados obtidos foram iguais estatisticamente (teste t pareado ao nível de confiança de 95%), indicando que o procedimento de determinação de AA e PAR é livre de interferências, em diferentes amostras de fármacos.

Tabela 5 – Determinação de AA e PAR por sensor e método de referência (HPLC)

Amostras	Sensor (AA)	Sensor (PAR)	HPLC (AA)	HPLC (PAR)	Erro relativo (Er ₁) (%)	Erro relativo (Er ₂) (%)
I (PAR 200 mg mL ⁻¹)	-----	202,5±4,7	-----	213,7±6,3	-5,3	1,2
II (PAR 50 mg-AA 250 mg)	257,3±5,9	50,1±2,3	256,1±0,6	49,0±0,2	0,5 (AA) 2,1 (PAR)	2,9(AA) 0,1(PAR)
III (PAR 750 mg)	-----	711,3±4,3	-----	776,6±3,9	-8,4	-5,2
IV (PAR 500 mg)	-----	533,1±4,0	-----	502,3±2,9	6,1	6,6
V (PAR 400 mg)	-----	434,3±7,4	-----	427,0±2,9	1,2	8,5
VI (AA 1 g)	0,96±0,01	-----	1,10±0,02	-----	13,5	-4,0

n=3; valor de *t* calculado=-0,44(PAR), 1,52(AA); valor de *t* tabelado 3,18(PAR), 12,70(AA), com 95% de confiança. Er₁ = sensor vs método oficial; Er₂ = sensor vs valor do rótulo

7 CONCLUSÕES

O método eletroquímico possibilitou realizar a determinação simultânea de AA e PAR utilizando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono na presença de surfactante catiônico CPB. Observou-se um ganho considerável na separação dos picos e nas correntes de AA e PAR quando comparando com eletrodo convencional de carbono vítreo. Em condições otimizadas da técnica de pulso diferencial, o sensor apresentou sensibilidade e seletividade na determinação de AA e PAR e com uma faixa linear de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $700,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $39,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $146,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, e com limite de detecção de $7,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ para AA e $2,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para PAR. Comparando a outros métodos analíticos e eletroquímicos, este trabalho apresenta a vantagem de ser caracterizado pela sua simplicidade na execução não requerendo etapas complexas de preparo de amostra e baixo custo, além da aplicação em fármacos comerciais, validado pelo método comparativo (HPLC).

REFERÊNCIAS

1. LEVENT, Ö., YUCE, Ş. Determination of paracetamol based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 127, p. 362-369, 2007.
2. GOYAL, R. N. et. al. Differential pulse voltammetric determination of paracetamol at nanogold modified indium tin oxide electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 7, p. 803–807, 2005.
3. KACHOOSANGI, R.T., WILDGOOSE, G. G., COMPTON, R. G. Sensitive adsorptive stripping voltammetric determination of paracetamol at multiwalled carbon nanotube modified basal plane pyrolytic graphite electrode. **Analytica chimica acta**, v. 618, p. 54–60
4. SHANKARAN, D. R., LIMURA, K., KATO, T. Simultaneous determination of ascorbic acid and dopamine at a sol–gel composite electrode. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 94, p. 73- 80, 2003.
5. PADAYATTY, S. J. et. al. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, p. 18–35, 2003.
6. TSVETKOVA, B. et. al. Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of paracetamol and ascorbic acid in tablet dosage forms. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 1332-1336, 2012.
7. SARA KBI, A. et. al. Simultaneous Determination of Acetaminophen (Paracetamol) and Ascorbic Acid in Pharmaceutical Formulations by LC Coupled to a Screen Printed Carbon Based Amperometric Detector. **Electroanalysis**, v. 23, p. 29–36, 2011.
8. ATTA. N. F., EL-KADY, M. F. Poly(3-methylthiophene)/palladium sub-micro-modified sensor electrode.Part II: Voltammetric and EIS studies, and analysis of catecholamine neurotransmitters, ascorbic acid and acetaminophen. **Talanta**, v. 79 p. 639–647, 2009.
9. SANTHOS, N. S., ABRAHAM, J. S., TAKAMASA, S. Simultaneous determination of paracetamol and ascorbic acid using tetraoctylammonium bromide capped gold nanoparticles immobilized on 1,6-hexanedithiol modified Au electrode. **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 6837–6843, 2009.
10. ATTA, N. F., EI-KADY, M. F., GALAL, A. Simultaneous determination of catecholamines, uric acid and ascorbic acid at physiological levels using poly(N-methylpyrrole)/Pd-nanoclusters sensor. **Analytical Biochemistry**, v. 400, p. 78–88, 2010.

11. DOS SANTOS, W. T. P. et. al. Simultaneous Flow Injection Analysis of Paracetamol and Ascorbic Acid with Multiple Pulse Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 20, p. 1878 – 1883, 2008.
12. RODOVAN, C., COFAN, C., CINGHITA, D. Simultaneous determination of acetaminophen and ascorbic acid at an unmodified boron-doped diamond electrode by differential pulse voltammetry in buffered media. **Electroanalysis**, v. 20, p. 1346-1353, 2008.
13. JACOBS, C. B., PEAIRS, M. J., VENTON, B. J. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 105–127, 2010.
14. AGÜÍ, L., YÁÑEZ-SEDEÑO, P., PINGARON, J. M. Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, p. 11–47, 2008.
15. IONESCU, M. I. et. al. Hydrogen-free spray pyrolysis chemical vapor deposition method for the carbon nanotube growth: Parametric studies. **Applied Surface Science**, v.257, p. 6843–6849, 2011.
16. DE MENEZES, V. M. et. al. Electronic transport properties of ascorbic acid and nicotinamide adsorbed on single-walled carbon nanotubes. **Chemical Physics Letters**, v. 506, p. 233–238, 2011.
17. SHAROKHIAN, S., ASADIAN, E. Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, acetaminophen and isoniazid using thionine immobilized multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 666–672, 2010.
18. ENSAFI, A. A., KARIMI-MALEH, H., MALLAKPOUR, S. Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Acetaminophen, and Tryptophan by Square Wave Voltammetry Using N-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-3,5-Dinitrobenzamide-Modified Carbon Nanotubes Paste Electrode. **Electroanalysis**, v. 24, p. 666 – 675, 2012.
19. DALMASSO, P. R., PEDANO, M. L., RIVAS, G. A. Electrochemical determination of ascorbic acid and paracetamol in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes dispersed in polyhistidine. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 173, p. 732- 736, 2012.
20. HAVENS, N. et. al. Redox polymer covalently modified multiwalled carbon nanotube based sensors for sensitive acetaminophen and ascorbic acid detection. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 2186–2190, 2010.
21. DOS REIS, A. P. et. al. Simple and Sensitive Electroanalytical Method for the Determination of Ascorbic Acid in Urine Samples Using Measurements in an Aqueous Cationic Micellar Medium. **Analytical Sciences**, v. 24, p. 1569-1574, 2008.

22. DOS REIS, A. P., TARLEY, C. R. T., KUBOTA, L. T. Micelle-Mediated Method for Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Uric Acid by Differential Pulse Voltammetry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, p. 1567-1573, 2008.
23. TARLEY, C. R. T. et. al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, p. 58-67, 2009.
24. ŠVORC, L. et. al. Simultaneous determination of paracetamol and penicillin V by square-wave voltammetry at a bare boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 68, p. 227-234, 2012.
25. BOSCH, M. E. et. al. Determination of paracetamol: Historical evolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 291-321, 2006.
26. GOYAL, R. M., GUPTA, V. K., CHATTERJEE, S. Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 149, p. 252-258, 2010.
27. ÖZCAN, L., ŞAHİN, Y. S. Determination of paracetamol based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 127, p. 362-369, 2007.
28. ATTA, N. F., EI-KADY, M. F., GALAL, A. Palladium nanoclusters-coated polyfuran as a novel sensor for catecholamine neurotransmitters and paracetamol. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 14, p. 566-574, 2009.
29. MESSINA, G. A., DE VITO, I. E., RABA, J. On-line microfluidic sensor integrated with an enzyme-modified pre-cell for the monitoring of paracetamol in pharmaceutical samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, p. 152-158, 2006.
30. FAN, Y. et. al. Electrochemical behavior and voltammetric determination of paracetamol on Nafion/TiO₂-graphene modified glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 85, p. 289-292, 2011.
31. GÓMEZ-MORENO, G., GUARDIA, J., CUTANDO, A. Interaction of paracetamol in chronic alcoholic patients. Importance for odontologists. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 13, p. 235-238, 2008.
32. BURGOT, G., AUFFRET, F., BURGOT, J-F. Determination of acetaminophen by thermometric titrimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 343, p. 125-128, 1997.
33. LÓPEZ-CUETO, G., OSTRÁ, M., UBIDE, C. New way of application of the bromate-bromide mixture in kinetic analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, p. 117-126, 2001.
34. BOUHSAIN, Z. et. al. Flow injection spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals by means of on-line microwave-assisted hydrolysis and reaction with 8-hydroxyquinoline (8-quinolinol). **Analytica Chimica Acta**, v. 330, p. 59-69, 1996.

35. EASWARAMOORTHY, D., YU, Y-C., HUANG, H-J. Chemiluminescence detection of paracetamol by a luminol-permanganate based reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 439, p. 95–100, 2001.
36. BUCHANAN, T., P. ADRIAENSSENS., STEWART, M. J., A micromethod for the emergency estimation of plasma paracetamol concentration using high performance liquid chromatography. **Clinica Chimica Acta**, v. 99, p. 161-165, 1979.
37. FATIBELLO-FILHO, O., LUPETTI, K. O., VIEIRA, I. C. Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor. **Talanta**, v. 55, p. 685–692, 2001.
38. OLIVEIRA, M. C. Q. et. al. Flow injection analysis of paracetamol using a biomimetic sensor as a sensitive and selective amperometric detector. **Analytical Methods**, v. 2, p. 507–512, 2010.
39. KACHOOSANGI, R. T., WILDGOOSE, G. G, COMPTON, R. G. Sensitive adsorptive stripping voltammetric determination of paracetamol at multiwalled carbon nanotube modified basal plane pyrolytic graphite electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 618, p. 54–60, 2008.
40. CHRISTIE, I. et. al. Direct electrochemical determination of paracetamol in plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 272, p. 145-150, 1993.
41. TAN, Y. et. al. A study of a bio-mimetic recognition material for the BAW sensor by molecular imprinting and its application for the determination of paracetamol in the human serum and urine . **Talanta**, v. 55, p. 337–347, 2001.
42. MAZLOUM-ARDAKANI, M. et. al. Electrochemical sensor for simultaneous determination of norepinephrine, paracetamol and folic acid by a nanostructured mesoporous material. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 172, p.380-386, 2012.
43. ATTA, N. F., EL-KADY, M. F., GALAL, A. Palladium nanoclusters-coated polyfuran as a novel sensor for catecholamine neurotransmitters and paracetamol. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 141, p. 566–574, 2009.
44. LI, J., HU, M., YU, R. Pressed-pellet solid potentiometric sensor for ascorbic acid based on derivatives of cobalt(II) phthalocyanine doped with iodine. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 30, p 65-69, 1996.
45. LUO, X-L. et. al. Ascorbic acid sensor based on ion-sensitive field-effect transistor modified with MnO₂ nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 512, p. 57–61, 2007.
46. O'CONNELL, P. J. et. al. Development of an amperometric l-ascorbic acid (Vitamin C) sensor based on electropolymerised aniline for pharmaceutical and food analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 431, p. 239–247, 2001.

47. PRASAD, B. B. et. al. Ascorbic acid sensor based on molecularly imprinted polymer-modified hanging mercury drop electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 1082–1087, 2009.
48. PRASAD, B. B. et. al. Molecularly imprinted polymer-based solid-phase microextraction fiber coupled with molecularly imprinted polymer-based sensor for ultratrace analysis of ascorbic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 1199 p. 59–66, 2008.
49. REBEC, G. V., PIERCE, R.C. A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. **Progress in neurobiology**, v. 43, p. 537–565, 1994.
50. ATTA, N. F. et. al. Simultaneous determination of catecholamines, uric acid and ascorbic acid at physiological levels using poly(N-methylpyrrole)/Pd-nanoclusters sensor. **Analytical Biochemistry**, v. 400, p. 78–88, 2010.
51. RUIZ-MEDINA. A. et. al. A flow-through solid phase UV spectrophotometric biparameter sensor for the sequential determination of ascorbic acid and paracetamol. **Analytica Chimica Acta**, v. 404, p. 131–139, 2000.
52. ZHANG, Z., QIN, W. Chemiluminescence flow sensor for the determination of ascorbic acid with immobilized reagents. **Talanta**, v. 43, p 119-124, 1996.
53. NOJAVAN, S. et. al. Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit . **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 300- 305, 2008.
54. WU, G-H. et. al. An electrochemical ascorbic acid sensor based on palladium nanoparticles supported on graphene oxide. **Analytica Chimica Acta**, v. 745, p. 33-37, 2012.
55. LI, F. et. al. Electrochemical behavior of graphene doped carbon paste electrode and its application for sensitive determination of ascorbic acid. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 157, p. 110-114, 2011.
56. ARENAS, L. T. et. al. Niobium oxide dispersed on a carbon–ceramic matrix, SiO₂/C/Nb₂O₅, used as an electrochemical ascorbic acid sensor. **Talanta**, v. 83, p. 241-248, 2010.
57. R. THANGAMUTHU, R., KUMAR, S. M. S., PILLAI, K. C. Direct amperometric determination of l-ascorbic acid (Vitamin C) at octacyanomolybdate-doped-poly(4-vinylpyridine) modified electrode in fruit juice and pharmaceuticals. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 120, p. 745-753, 2007.
58. SHENG, Z-H. et. al. Electrochemical sensor based on nitrogen doped graphene: Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Biosensors and Bioelectronics**, v .34, p. 125-131, 2012.

59. KHUDAISH, E. A. et. al. A solid state sensor based polytyramine film modified electrode for the determination of dopamine and ascorbic acid in a moderately acidic solution. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 676, p. 27-34, 2012.
60. GIOIA, M. G. et. al. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and acetaminophen in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 331-339, 2008.
61. RUIZ-MEDINA. A. et. al. A flow-through solid phase UV spectrophotometric biparameter sensor for the sequential determination of ascorbic acid and paracetamol. **Analytica Chimica Acta**, v. 404, p. 131-139, 2000.
62. Wang, S., Xie, F., Hu, R. Carbon-coated nickel magnetic nanoparticles modified electrodes as a sensor for determination of acetaminophen. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 123, p. 495-500, 2007.
63. HABIBI, B., JAHANBAKHSI, M., AZAR, M. H. P. Differential pulse voltammetric simultaneous determination of acetaminophen and ascorbic acid using single-walled carbon nanotube-modified carbon-ceramic electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 411, p.167-175, 2011.
64. KEYVANFARD, M. et. al. Highly selective and sensitive voltammetric sensor based on modified multiwall carbon nanotube paste electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, acetaminophen and tryptophan . **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 811-816, 2013.
65. IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p.56-58, 1991.
66. WILDGOOSE, G. G. et. al. Chemically Modified Carbon Nanotubes for Use in Electroanalysis. **Microchimica Acta**, v. 152, p. 187-214, 2006.
67. MERKOÇI, A. Carbon Nanotubes in Analytical Sciences. **Microchimica Acta**, v. 152, p. 157-174, 2006.
68. RIVAS, G. A. et. al. Carbon Nanotubes Paste Electrodes. A new alternative for the development of electrochemical sensors. **Electroanalysis**, v. 19, p. 823 - 831, 2007.
69. TARLEY, C. R. T. et. al. Simultaneous determination of zinc, cadmium and lead in environmental water samples by potentiometric stripping analysis (PSA) using multiwalled carbon nanotube electrode. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 256-262, 2009.
70. ABBAR, J. C., MALODE, S. J., NANDIBEWOOR, S. T. Electrochemical determination of a hemorheologic drug, pentoxifylline at a multi-walled carbon nanotube paste electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 83, p. 1-7, 2012.
71. MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, p. 87-93, 2001.

72. HUANG, X. et. al. Determination of the Critical Micelle Concentration of Cationic Surfactants. **Journal of Chemical Education**, v. 96, p. 93-94, 1999.
73. ŠVANCARA, I. et. al. Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 311-345, 2001.
74. ATTA, N. F. et. al. Effect of surfactants on the voltammetric response and determination of an antihypertensive drug. **Talanta**, v. 72, p. 1438-1445, 2007.
75. JAIN, R., RATHER, J. A. Voltammetric determination of antibacterial drug gemifloxacin in solubilized systems at multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 83, p. 340-346, 2011.
76. DONG, S., ZHENG, J., GAO, H. Voltammetric behavior of 4,7-dimethoxy-3-isoflavone sulfonic sodium and its enhancement determination in the presence of surfactant. **Analytical Biochemistry**, v. 323, p. 151-155, 2003.
77. YANG, X., WANG, F., HU, S. High sensitivity voltammetric determination of sodium nitroprusside at acetylene black electrode in the presence of CTAB. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 54, p. 60-66, 2007.
78. DOS REIS, A. P. et. al. Exploiting micellar environment for simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid and dopamine. **Talanta**, v. 67, p. 829-835, 2005.
79. HOYER, B., JENSEN, N. Stabilization of the voltammetric serotonin signal by surfactants. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 323-328, 2006.
80. JAIN, R., YADAV, K. R., DWIVEDI, A. Square-wave adsorptive stripping voltammetric behaviour of entacapone at HMDE and its determination in the presence of surfactants. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 359, p. 25-30, 2010.
81. HOLLER, F. J., DKOOG, D. A., CROUCH, SATNLEY. R. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução de: Célio Pasquini. Porto Alegre: Bookman, 2009.
82. WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. Segunda edição. New York: Wiley-VCH, 2000.
83. NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na industria**. Porto Alegre: Bookman, 2010.
84. Calado, V., Montgomery, D. C. **Planejamento de Experimentos usando Estatística**. Rio de Janeiro, 2003.
85. Korany, M. A., Fahmy, O. T., Mahgoub, H. Maher, H. M. High performance liquid chromatographic determination of some guaiphenesin-containing cough-cold preparations. **Journal of Advanced Research**, v. 2, p. 121-130, 2011.

86. SANTOS, V. S. et. al. Speciation of Sb(III) and Sb(V) in meglumine antimoniate pharmaceutical formulations by PSA using carbon nanotube electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p. 151-157, 2009.
87. WEAST, R. C. **CRC Handbook of chemistry and physic**. Florida: CRC Press, 1984.
88. LIU, L. et. al. Improved Voltammetric Response of Malachite Green at a Multi-Walled Carbon Nanotubes Coated Glassy Carbon Electrode in the Presence of Surfactant. **International Journal of Electrochemical Science**, v .4, p. 525 - 534, 2009.
89. BARD, A. J., FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications**. New York: Wiley, 2001.
90. Long, G. L., Winefordner, J.D. Limit of detection: A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, p.712A-24A, 1983.