UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO E LICENCIATURA EM QUÍMICA

DETERMINAÇÃO RÁPIDA E SIMULTÂNEA DE PARACETAMOL, ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E CAFEÍNA EM MEDICAMENTOS EMPREGANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) COM DETECÇÃO POR AMPEROMETRIA DE MÚLTIPLOS PULSOS

Dourados/MS

2015

Leticia Machado Alencar

DETERMINAÇÃO RÁPIDA E SIMULTÂNEA DE PARACETAMOL, ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E CAFEÍNA EM MEDICAMENTOS EMPREGANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) COM DETEECÇÃO POR AMPEROMETRIA DE MÚLTIPLOS PULSOS

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado para a obtenção do título de Bacharelado e Licenciatura em Química com Atribuições Tecnológicas pela Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias – FACET da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva

Dourados/MS

Outubro/2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A368d Alencar, Leticia Machado

Determinação rápida e simultânea de paracetamol, ácido acetilsalicílico e cafeína em medicamentos empregando análise por injeção em batelada (bia) com detecção por amperometria de múltiplos pulsos / Leticia Machado Alencar -- Dourados: UFGD, 2015.

42f. il.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva.

Monografia (TCC em Química) FACET, Faculdade de Ciências Exatas e da Tecnologia – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Paracetamol. 2. Ácido Acetilsalicílico. 3. Cafeína. 4. Determinação Simultânea. I. Título.

CDD – 540

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte

Leticia Machado Alencar

DETERMINAÇÃO RÁPIDA E SIMULTÂNEA DE PARACETAMOL, ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E CAFEÍNA EM MEDICAMENTOS EMPREGANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) COM DETEECÇÃO POR AMPEROMETRIA DE MÚLTIPLOS PULSOS

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharelado e Licenciatura em Química com Atribuições Tecnológica na Universidade Federal da Grande Dourados pela comissão constituída pelos docentes:

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva

Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade

Prof. Dr. João Batista Gomes de Souza

DOURADOS

MATO GROSSO DO SUL – BRASIL

OUTUBRO/2015

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada e pelos sonhos que se concretizam.

Agradeço a minha mãe Roseli de Oliveira Machado, heroína que me deu apoio, pelo amor, incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço. Ao meu pai Luiz Rosa de Alencar, que me fortaleceu e não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Ao meu namorado, melhor amigo e companheiro de todas as horas, Eduardo Arnhold, pelo carinho e compreensão.

Agradeço a Universidade Federal da Grande Dourados em especial a FACET, seu corpo docente, direção e coordenadores que com dedicação, presteza e competência conduz sua profissão. A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva, pela orientação, apoio, confiança, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional e minha gratidão pela sua paciência, por ser um profissional extremamente qualificado.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Camila Garcia, Tamires Macedo, Camila Neves, Priscila Ferreira e principalmente Rafael Backes pelo apoio no trabalho desenvolvido.

A todos os meus colegas do curso de Química, que de alguma forma tornaram minha vida acadêmica cada dia mais desafiante.

E a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

Obrigada!!!

Sumário

RESUMO 7
Palavras – chave: 7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 8
1. INTRODUÇÃO: 9
2. PARTE EXPERIMENTAL: 13
2.1. Reagentes, soluções e preparo das amostras 13
2.2. Medidas Eletroquímicas 14
2.3. Célula Eletroquímica de Análise por Injeção em Batelada (BIA) 15
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES 17
3.1. Estudos da detecção simultânea de PA, ASA (ou SA) e CA empregando BIA-MPA 17
3.2. Otimizações experimentais do sistema BIA-MPA 22
3.3. Determinação simultânea de PA, ASA e CA em medicamentos comerciais 34
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 41
5. REFERÊNCIAS 42

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia para determinar simultaneamente Paracetamol (PA), Ácido Acetilsalicílico (ASA) e Cafeína (CA) em formulações farmacêuticas empregando apenas um eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro (BDD) acoplado a um sistema de Análise por Injeção em Batelada (BIA) e detecção por amperometria de múltiplos pulsos (MPA). Deste modo, aplicando-se apenas três pulsos de potencial (+1,0 V, +1,3 V e +1,6 V) no eletrodo de BDD e empregando simples equações matemáticas é possível detectar cada analito seletivamente. O sistema BIA-MPA apresentou sensibilidade e limites de detecção (0,24, 0,23 e 0,008 mg L^{-1} para PA, ASA e CA, respectivamente) adequados para a determinação simultânea dos três analitos em oito medicamentos, sendo obtidas dosagens próximas aos valores rotulados para a maioria das amostras. As injeções foram rápidas (145 injeções por hora), principalmente considerando que em cada injeção são detectados até três analitos. O sistema BIA-MPA é mais simples, rápido e de baixo custo do que os sistemas cromatográficos, indicados para a maioria das análises simultâneas de fármacos em medicamentos.

Palavras – chave: Paracetamol, Ácido Acetilsalicílico, Cafeína, Determinação Simultânea.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PA	Paracetamol
ASA	Ácido Acetilsalicílico
CA	Cafeína
AS	Ácido salicílico
BDD	Diamante Dopado com Boro
BIA	Análise por injeção em batelada
MPA	Amperometria de múltiplos pulsos
Mg	Miligramas
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
UV	Ultravioleta
GCE	Eletrodo de carbono vítreo
DPV	Voltametria de pulso diferencial
SWV	Voltametria de onda quadrada
CME	Eletrodo quimicamente modificado
CNT	Nanotubo de carbono
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
FIA	Analise por injeção em fluxo
ET	Eletrodo de trabalho
RE	Eletrodo de referencia
AE	Eletrodo auxiliar
µL	Microlitro
s	Segundo
cm	Centímetro
V	Volts
mL	Mililitros
L	Litro
CF	Fator de correção
µA	Microampère
DP	Desvio padrão
ms	Milissegundos
RPM	Rotações por minutos

1. INTRODUÇÃO:

Medicamentos são substâncias ou preparações elaboradas em farmácias (medicamentos manipulados) ou indústrias (medicamentos industriais), que devem seguir determinações legais de segurança, eficácia e qualidade. São produtos especiais elaborados com a finalidade de prevenir, curar doenças ou aliviar seus sintomas, sendo produzidos com rigoroso controle técnico para atender às especificações determinadas pela Anvisa. O efeito do medicamento se deve a uma ou mais substâncias ativas com propriedades terapêuticas reconhecidas cientificamente, que fazem parte da composição do produto, denominadas fármacos, drogas ou princípios ativos [1].

Entre os medicamentos mais consumidos pelos jovens estão os tranquilizantes, emagrecedores, ansiolíticos, de disfunção erétil e analgésicos. Devido ao fácil acesso aos analgésicos o setor movimentou no Brasil US$ 902 milhões em 2010. Com 21,5 milhões de unidades comercializadas entre abril do ano passado e março deste ano, a área de analgésicos da empresa registrou crescimento de 50%. Dentre os analgésicos mais populares destacam-se o paracetamol (PA) e o ácido acetilsalicílico (ASA)[2].

O ácido acetilsalicílico (ASA), aspirina ou ácido 2-acetoxibenzóico foi o primeiro fármaco sintetizado (Bayer em 1897), sendo o mais vendido e consumido em todo o mundo[3]. Este fármaco possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antipiréticas (antitérmicas) e anti-plaquetárias. O ASA pertence ao grupo dos fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINE), e atua no organismo inibindo a ciclo oxigenase (COX), enzima atuante na formação das prostaglandinas, que são mediadores responsáveis pelo aparecimento da dor e febre[3]. Nas farmácias pode ser encontrado na forma de comprimido com dosagem variando de 50 a 1000 mg, sendo indicada dependendo do efeito terapêutico desejado. No Brasil são comercializadas aproximadamente 18 formulações distintas contendo apenas ASA ou ASA associado a outros fármacos[4].

O paracetamol (PA), acetaminofeno ou N-(4-hidroxifenil) etanamida (IUPAC) é um fármaco com propriedades analgésicas e antipiréticas (antitérmicas)[4], sendo um fármaco alternativo aos pacientes com intolerância ao ASA[5]. Foi descoberto em 1948 e comercializado pela primeira vez em 1955, vendido com o nome de Tylenol.

No organismo, o PA também atua na inibição da formação das prostaglandinas. No entanto, o PA pode ser altamente perigoso para o fígado, devido ao seu alto potencial hepatotóxico (máximo de 4000 mg diárias), principalmente se bebidas alcoólicas foram ingeridas concomitantemente, o que pode levar à falência do fígado e morte. Além disso, em virtude da fácil aquisição (sem receita médica), o PA é utilizado em várias tentativas de suicídio. Nas drogarias, é encontrado na forma de comprimidos, cápsulas, gotas, xaropes e injetáveis, no medicamento original (Tylenol) e em genéricos. Cerca de 50 formulações contendo PA e associações são comercializadas nas drogarias brasileiras[4].

Apesar da eficácia de ambos (PA e ASA) no combate à dor e febre, em alguns casos estes dois princípios ativos (juntamente com a cafeína – CA) estão combinados na mesma formulação farmacêutica, devido ao aumento da eficácia no tratamento da enxaqueca. Diener *et al.*[6] concluíram que uma combinação de ASA (250 mg), PA (200 mg) e CA (50 mg) foi eficaz para o tratamento de enxaquecas leves à severas, independentemente da causa da dor. De acordo com Anneken[7], a ingestão de uma formulação contendo uma combinação de ASA, PA e CA produz um efeito mais efetivo no tratamento da enxaqueca do que o de medicamentos que contém estes fármacos separadamente na mesma dosagem (Efeito sinérgico).

Devido à elevada presença destes fármacos no mercado farmacêutico, é de suma importância o controle de qualidade de formulações que contenham PA, ASA e/ou CA. De acordo com a farmacopéia brasileira, é recomendado que a dosagem de mais de um princípio ativo na mesma formulação deve ser realizada através de metodologias analíticas que empregam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “High Performance Liquid Chromatography”) com detecção óptica na região do ultravioleta (UV)[8]. No entanto, devido ao elevado custo destes equipamentos e dos solventes de alta pureza (grau espectroscópico), as análises quantitativas ficam limitadas em muitos laboratórios brasileiros[9]. Neste sentido, o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação simultânea de fármacos pode ser uma alternativa interessante, devido ao baixo custo de aquisição e manutenção do equipamento de detecção (potenciostato) e de eletrodos alternativos, a possibilidade utilização de materiais alternativos na confecção dos eletrodos, e principalmente a possibilidade de detectar simultaneamente três

compostos sem que haja uma separação prévia destes em uma coluna (tal como em HPLC), o que pode reduzir o tempo de análise e diminuir a geração de resíduos.

Na literatura podem ser encontrados vários trabalhos para a determinação individual ou simultânea de PA, ASA e CA e outros princípios ativos bem como combinações entre estes em formulações farmacêuticas empregando diferentes técnicas eletroquímicas: potenciometria, voltametria de pulso (SWV e DPV), biamperometria, amperometria de múltiplos pulsos. Lau et al. [10] desenvolveram um método simples para a determinação individual e simultânea de ácido ascórbico, PA e CA, no qual foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo (GCE), detecção por voltametria de pulso diferencial (DPV) e medidas em eletrólito aquoso/orgânico. Zen e Ting[11] propuseram um método empregando um eletrodo quimicamente modificado (CME) com óxido de rutênio e um filme de Nafion e detecção por voltametria de onda quadrada (SWV) em meio de ácido perclórico para a CA e PA em medicamentos.

Comparando as respostas deste eletrodo com um GCE, o CME apresentou uma aparente mudança dos potenciais de oxidação na direção catódica e uma melhoria nas respostas de ambos analitos. Sanghavi e Srivastav[12] propõem um método para a determinação simultânea de PA, ASA e CA (em medicamentos, urina e soro), utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado in situ com o nanotubo de carbono (CNT) e o surfactante neutro Triton X e detecção com a técnica de análise de redissolução adsortiva por DPV. Segundo os autores, este método apresentou a maior faixa linear e os menores LD reportados na literatura, o que permitiu a quantificação dos três (PA, ASA e CA) em medicamentos, urina e soro sanguíneo. Lourenção *et al.*[13] descrevem uma metodologia para a determinação individual e simultânea de PA e CA empregando um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) pré-tratado catodicamente e detecção por DPV ou SWV em meio ácido (pH 4,7). Faria et al.[14], também empregando um eletrodo de BDD, propuseram um método para a determinação simultânea de ASA e CA, com detecção por DPV[14]. O uso de BDD exibe uma maior janela de potencial em meios aquosos e baixa sensibilidade ao oxigênio dissolvido, o que torna este material favorável para a detecção direta de analitos com alto potencial de oxidação,[15] tal como CA e o ASA[14, 16].

No entanto, as determinações realizadas por técnicas voltamétricas estacionárias propostas [10, 12] não são muito rápidas, devido à necessidade de realizar uma curva de adição padrão para cada amostra. Além disto, devido ao elevado tempo que o analito fica em contato com o eletrodo de trabalho nestas medidas, as superfícies destes eletrodos estão mais sujeitas à contaminação (passivação ou envenenamento), tornando necessário muitas vezes o polimento e/ou limpeza eletroquímica entre medidas para a obtenção de certa reprodutibilidade.

Para minimizar estas limitações, a utilização de sistemas hidrodinâmicos com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (MPA) tem sido propostas para a determinação simultânea de até dois princípios ativos (PA e CA) utilizando apenas um eletrodo de trabalho. Em 2011, Silva *et al*[17] utilizaram um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) e um eletrodo de BDD posicionado na configuração "walljet" com detecção por MPA. Conforme apresentado pelos autores, aplicando-se uma sequência de dois pulsos é possível determinar seletivamente dois analitos (PA e CA) da seguinte maneira: no pulso de potencial de +1,20 V/50 ms (E_1) é possível oxidar seletivamente o PA e no pulso de +1,55 V/50 ms (E_2) são oxidados ambos (PA e CA).

No entanto, fazendo uma subtração as correntes obtidas nos dois pulsos ($i_{E2} - i_{E1}$) é possível realizar a determinação seletiva de CA. Posteriormente, da Silva *et al.*[17] realizaram o mesmo esquema de detecção para a determinação simultânea de PA e CA (e outros dois pares, DI/CA e BHA/BHT) porém empregando um sistema de análise por injeção em batelada (BIA), que é um sistema mais simples no qual os analitos são injetados diretamente sobre a superfície de um eletrodo de trabalho (WE) mergulhado em um certo volume de eletrólito suporte. Neste sistema não existem bombas, válvulas ou tubulações (tal como FIA), evitando a formação de bolhas. Logo, o sistema BIA é mais robusto e portátil do o que o FIA.

Neste trabalho propomos, pela primeira vez, a determinação simultânea de PA, ASA e CA (e combinações entre estes) em formulações farmacêuticas empregando um sistema de análise por injeção em batelada (BIA) contendo apenas um eletrodo de trabalho (BDD pré-tratado catodicamente) e a detecção através da técnica de amperometria de múltiplos pulsos (MPA). Para o desenvolvimento da metodologia foram otimizadas as condições do sistema BIA (volume injetado,

velocidade de injeção, agitação do eletrólito), bem como a sequência de aplicação dos pulsos de potencial no eletrodo de BDD e posteriormente a determinação dos três fármacos em oito amostras comerciais.

2. PARTE EXPERIMENTAL:

2.1. Reagentes, soluções e preparo das amostras

Todos os reagentes e padrões dos fármacos foram de pureza analítica, e todas as soluções foram preparadas com água deionizada obtida do sistema de purificação OS10LXE, GEHAKA. As soluções estoque dos fármacos (PA, ASA e CA) foram obtidas a partir da dissolução do padrão sólido em água deionizada. No preparo das amostras de formulações farmacêuticas, os comprimidos presentes em uma cartela (12 comprimidos) foram triturados com auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, empregando uma balança analítica (precisão de 0,0001 g), uma massa deste material foi dissolvida em água em um balão volumétrico apropriado.

Posteriormente, um volume apropriado da solução estoque dos padrões (ou amostras) foi diluído no eletrólito suporte (solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1}) para então serem injetadas no sistema BIA-MPA. No total foram analisadas oito formulações farmacêuticas (contendo PA, ASA e/ou CA), sendo sete comerciais adquiridas em drogarias locais e uma amostra manipulada (contendo mistura dos três medicamentos). Na ativação do eletrodo de BDD foi utilizada uma solução H_2SO_4 0,5 mol L^{-1}, preparada pela diluição de uma alíquota de 27,00 mL de solução de H_2SO_4 concentrado (98 %) em um balão de 1,0 L.

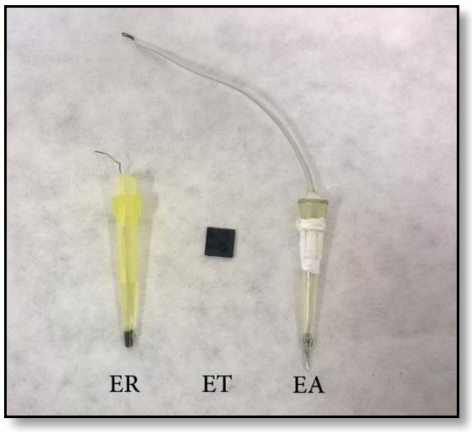
Para a detecção eletroquímica indireta do ASA, um procedimento adotado foi realizar a hidrólise prévia deste composto, que gera como produtos a espécie detectável ácido salicílico (SA) e ânions acetato. Esta hidrólise básica foi realizada dissolvendo-se uma massa do padrão de ASA (ou de medicamento contendo ASA) em 25,0 mL de solução de hidróxido de sódio 0,2 mol L^{-1} durante 15 minutos[18]. Alíquotas desta solução foram posteriormente diluídas no eletrólito suporte (H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}).

2.2. Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas com potenciostato Autolab III (Metrohm® Autolab) interfaceado a um computador contendo o software GPES 4.9.007. Para a detecção de PA, ASA e CA foi utilizada a Amperometria de Múltiplos Pulsos (MPA). Esta técnica aplica de dois até dez pulsos de potencial sequenciais (tempo mínimo de 30 milissegundos) no mesmo eletrodo de trabalho, permitindo o registro das correntes em todos estes pulsos, possibilitando a obtenção de até dez amperogramas “simultâneos”. Vale ressaltar que, no momento, esta técnica só é disponível no software GPES 4.9.007.

O eletrodo de referência (RE) utilizado foi um eletrodo de Ag/AgCl/KCl saturado construído em laboratório [19]. Como eletrodo auxiliar (AE) foi utilizado um fio de platina. O eletrodo de trabalho (ET) utilizado foi uma placa de filme de diamante dopado com boro (BDD), adquirida da empresa Adamant Technologies As (La Chaux-de-Fonds, Suiça). Segundo especificação do fabricante, esta placa possui uma base de silício cristalino de 1 mm de espessura (7 mm x 7mm) coberta com uma camada de BDD de 1,2 µm e 8000 ppm de dopagem com boro. Esta placa de BDD fica armazenada entre dias em isopropanol (PA). Para o condicionamento inicial (funcionalização), em meio de solução H_2SO_4 0,5 mol L^{-1}o BDD é submetido a leve ativação anódica (aplicando-se +0,1 A por 75s) seguida de uma ativação catódica (-0,1 A por 300 s). Este protocolo foi adaptado de trabalhos anteriores, que sugeriram melhores respostas de PA, ASA e CA em eletrodo de BDD com ativação catódica [13, 16, 20]. Deste modo, a superfície do BDD é funcionalizada predominantemente com grupos hidrogênio. Os três eletrodos (ER, EA e ET) são apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Imagem do eletrodo de Ag/AgCl/$KCl_{sat.}$(RE), mini placa de filme de BDD (WE) e um fio de platina (AE).



2.3. Célula Eletroquímica de Análise por Injeção em Batelada (BIA)

A célula eletroquímica de análise por injeção em batelada (BIA) é apresentada na Figura 2. Conforme apresentado, na tampa da célula existem quatro orifícios, sendo dois menores para acomodação do ER e EA, um orifício central para o posicionamento do injetor e um orifício maior para a entrada de um agitador mecânico, construído em laboratório a partir de uma hélice de PVC encaixada em um motor DC de 24 V. O motor foi encaixado uma fonte universal, que permite que a velocidade de rotação seja controlada pela tensão de saída da fonte (3 a 12 V). Na parte inferior central da célula existe um orifício (localizado no mesmo eixo do injetor) no qual é prensada uma placa de BDD (ET) entre este orifício e a base da célula. Deste modo, as injeções das soluções são realizadas frontalmente ao ET, ou seja, na configuração jato impingente (mais conhecida como “walljet”). A área do ET (0,2 cm^2) é definida por um anel de borracha (“o-ring”). O contato elétrico entre o ET e o potenciostato é realizado com uma chapa metálica localizada abaixo da placa de BDD.

A célula possui uma capacidade volumétrica de aproximadamente 100 mL. Além disso, o material do corpo da célula (PVC) permite a realização de medidas eletroquímicas em meio aquoso e orgânico. Foi utilizada uma micropipeta eletrônica Eppendorf® MultipetteStream para a injeção das amostras. A ponteira desta micropipeta (“combitip”) utilizada possui uma capacidade volumétrica de 1,0 mL, sendo permitida a injeção de volumes de 10 µL a 1000 µL (em incrementos de no

mínimo 1µL) de solução na célula BIA. Além disso, esta permite a injeção das soluções em até dez velocidades distintas, experimentalmente foi verificado que: v_1= 28; v_2 = 43; v_3 = 56; v_3 = 56; v_4 = 75; v_5 = 100; v_6 = 113; v_7 = 156; v_8 = 193; v_9 = 256 e v_{10} = 344 µL s^{-1}.

Figura 2 - Imagem em perspectiva da célula eletroquímica de BIA e o injetor (pipeta eletrônica).

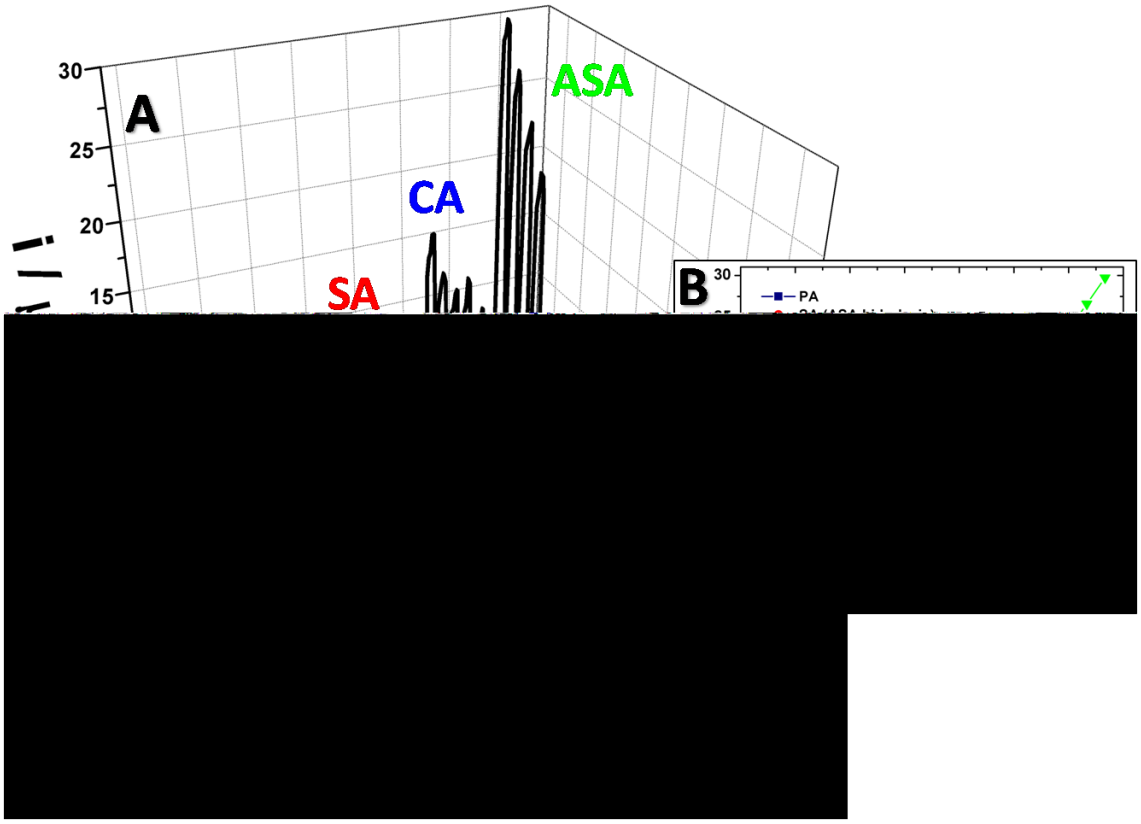
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. ESTUDOS DA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE PA, ASA (OU SA) E CA EMPREGANDO BIA-MPA

Inicialmente, foi realizado um estudo empregando MPA para verificar o comportamento eletroquímico de PA, ASA e CA sob a superfície de BDD pré-tratado catodicamente em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. Para isto, foram aplicados dez pulsos de potencial sequencial e ciclicamente em função do tempo no eletrodo de BDD, enquanto uma injeção de cada solução individual contendo PA, ASA, SA (ASA hidrolizado) ou CA era realizada na célula BIA. Os respectivos dez amperogramas obtidos “simultaneamente” para cada analito são apresentados na Figura 3A. A partir dos picos transientes registrados em cada amperograma, foram plotados os voltamogramas hidrodinâmicos de cada analito (Fig.3B).

Conforme observados, todos os analitos são oxidados irreversivelmente no eletrodo de BDD. No entanto, o PA é oxidado na superfície do BDD a partir de +0,7 V, atingindo uma corrente limite acima de + 0,9 V. O ácido salicílico (SA, oriundo da hidrólise de ASA) inicia a oxidação em potenciais superiores a + 1,1 V, apresentando um aumento na corrente até o último pulso de potencial aplicado (+1,6 V). A cafeína inicia a oxidação em + 1,4 V e atinge uma corrente máxima acima de + 1,5 V. Já o ASA exibe correntes anódicas pronunciáveis acima de + 1,8 V, sendo observado um aumento gradativo até + 2,3 V (intervalo estudado). Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos da literatura que empregaram BDD para detectar estes compostos em BDD e meio ácido[13, 14]. Os mecanismos de oxidação destes compostos em BDD também são discutidos nestes trabalhos.

Figura 3 - (A) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos* após injeções de soluções de PA, SA (ASA hidrolizado), CA ou ASA 10 mg L^{-1}. (B) Respectivos voltamogramas hidrodinâmicos. Condições: Sequência dos dez pulsos (limitado pelo software) aplicados no BDD: +0,7 V até + 1,6 V (PA e AS), + 1,0 V até +1,9 V (CA) e +1,4 V a +2,3 V (ASA), todos em intervalos de 100 mV; Tempo de pulso: 70 ms. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. Velocidade de injeção:100 µL s^{-1}; Volume injetado: 300 µL. * Correntes da linha base normalizadas até zero.



Conforme descrito em trabalhos anteriores que utilizam o sistema BIA ou FIA com detecção por MPA[17, 20, 21], para a determinação simultânea de dois compostos que oxidam na superfície de um dado ET, e que apresentem uma separação de pelo menos 150 mV no potencial de pico, pode-se utilizar a seguinte estratégia: a) Aplicar dois pulsos de potencial, sendo o primeiro pulso (E_1) suficiente para oxidar o analito (A_1) com menor potencial de oxidação, e o segundo pulso (E_2) suficiente para oxidar os dois analitos simultaneamente (A_1 + A_2); b) Realizar a subtração da corrente obtida no segundo pulso (detecção de A_1 + A_2) pela corrente no primeiro pulso (detecção de A_1) corrigida por um fator de correção (FC), de maneira a obter apenas

a corrente de A_2. Deste modo, em E_1 é possível detectar A_1 separadamente, e A_2 é detectado indiretamente pela subtração da corrente obtida em E_2 pela obtida em E_1.

Com um raciocínio análogo, no caso da determinação simultânea de três compostos eletroativos oxidáveis na superfície do ET, é necessário aplicar três pulsos de potencial no ET, sendo que os potenciais de pico de cada analito devem exibir uma resolução de pelo menos 150 mV entre si. De acordo com os voltamogramas hidrodinâmicos (Fig. 3), podemos adotar duas estratégias distintas (A ou B) para a determinação simultânea de PA, ASA e CA:

A) Aplicar a sequência de pulsos + 1,0 V, + 1,6 V e + 2,1 V, na qual seria observado:
(1) + 1,0 V: oxidação do PA sem interferência de ASA e CA;
(2) + 1,6 V: oxidação simultânea de PA e CA, sem a interferência do ASA;
(3) + 2,1 V: oxidação simultânea de PA, CA e ASA.

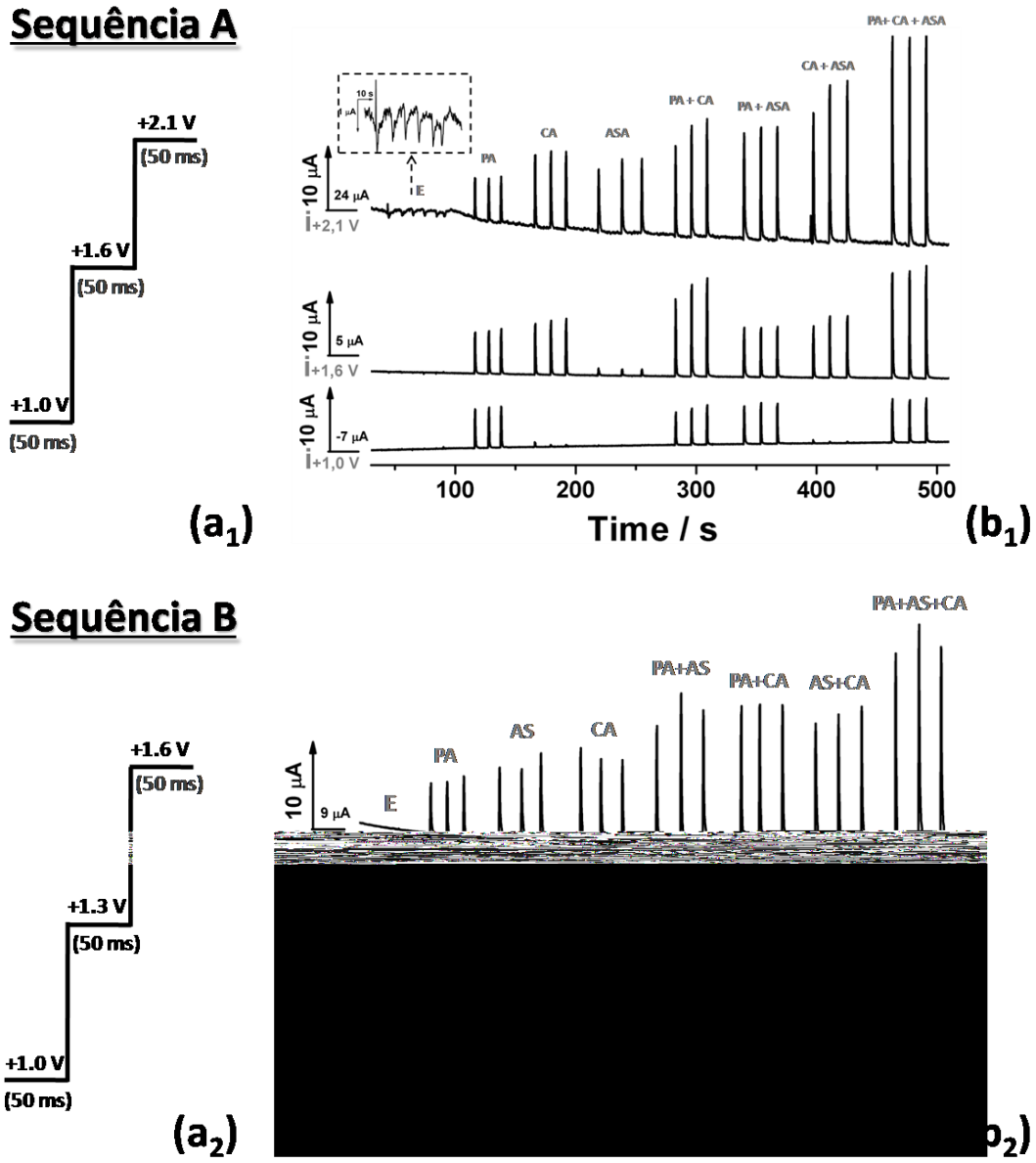
B) Aplicar a sequência de pulsos + 1,0 V, + 1,3 V e + 1,6 V, na qual seria observado:
(1) + 1,0 V: oxidação do PA sem interferência de SA e CA;
(2) + 1,3 V: oxidação simultânea de PA e SA (ASA hidrolizado), sem interferência de CA;
(3) + 1,6 V: oxidação simultânea de PA, SA e CA.

Logo, se adotada a estratégia A, podemos detectar o ASA diretamente sem necessidade de hidrólise. No entanto, se for utilizada a estratégia B, o ASA deve ser hidrolizado em uma etapa prévia, de maneira a gerar o SA, detectável em +1,3 V. Na literatura, observa-se que se forem utilizados outros eletrodos (exceto BDD)[12], somente é possível detectar o SA devendo então realizar a hidrólise prévia do ASA. No entanto, devido a maior faixa de trabalho do BDD, neste é possível detectar o ASA diretamente[14, 16], sendo dispensável a sua hidrólise. Logo, como neste trabalho é utilizado o eletrodo de BDD, a princípio poderíamos escolher qualquer das sequências de pulso (A ou B), sendo que se for adotada a opção A seria vantajoso pois seria desnecessário realizar uma etapa prévia de hidrólise do ASA.

Logo, para avaliar as duas possibilidades, foram injetadas no sistema BIA soluções individuais e misturas de PA, CA e ASA sequência de pulsos A ou de PA, SA hidrólise do ASA e CA sequência de pulsos B. Na Fig. 4 são apresentados os

amperogramas de múltiplos pulsos obtidos após estas injeções, bem como a sequência de pulsos utilizada em cada caso.

Figura 4 - Duas sequências de pulso de potencial distintas (a_1 e a_2) e respectivos amperogramas de três pulsos obtidos após seis injeções de eletrólito (E), e injeções em triplicata de soluções individuais de PA, CA e ASA e soluções mistas contendo misturas de dois ou três analitos (b_1) e individuais de PA, SA (ASA hidrolisado previamente) e CA e mistas (b_2). Condições: [Analito] = 20 μmol L^{-1}; Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. Velocidade de injeção: 156 μL s^{-1}; Volume injetado: 100 μL.



Empregando a sequência A (Fig. 4a_1), podemos observar os seguintes resultados para injeções de soluções de ASA e misturas (Fig. 4b_1): o PA apresenta sinal pronunciável nos três pulsos de potencial, visto que este apresenta correntes anódicas máximas a partir de +0,9 V. A CA apresenta picos de oxidação em +1,6 V e +2,1 V, pois apresenta corrente máxima a partir de +1,5 V. Já o ASA apresenta corrente anódica pronunciável no pulso de +2,1 V e uma pequena corrente anódica no pulso de +1,6 V.

Todos os resultados obtidos corroboram com o comportamento eletroquímico de cada analito apresentado na Fig. 3. Além disso, no último pulso (+2,1 V) é possível observar uma maior corrente de fundo (≈24 μA), um aumento na instabilidade bem como um ruído elevado. Adicionalmente, foram obtidos picos negativos consideráveis após injeções de solução contendo apenas o eletrólito (H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}). Este comportamento ocorreu provavelmente devido ao pulso de +2,1 V estar fora da faixa de trabalho, o que acarreta na oxidação do eletrólito suporte.

Quando adotada a sequência B (Fig. 4a_2) para injeções de soluções de SA (ASA hidrolizado) e misturas (Fig. 4b_2), os resultados obtidos foram: oxidação de PA nos três pulsos de potencial (+1,0 V, +1,3 V e +1,6 V), oxidação de SA nos pulsos de +1,3 V e +1,6 V e oxidação de CA apenas em +1,6 V, o que está de acordo com o comportamento eletroquímico (Fig. 3). Além disso, empregando-se esta sequência de pulsos não foram observados sinais pronunciados para injeções do eletrólito nem correntes de pico residuais consideráveis tal como SA em +1,6 V na sequência A, Fig. 3b_1.

Adicionalmente, quando são injetadas soluções contendo misturas de PA, CA e ASA (Fig. 4b_2), as correntes são obtidas e acumuladas (somadas), devido à oxidação de duas ou três espécies (dependendo das espécies e dos pulsos de potencial). Por exemplo, no pulso de +1,6 V foi obtida uma corrente média de 27,0 μA para injeções da solução mista contendo PA, SA e CA (20 μmol L^{-1} de cada), o corresponde praticamente à soma das correntes obtidas para as injeções das soluções individuais de PA (6,0 μA), SA (10,5 μA) ou CA (11,2 μA).

No entanto, em uma determinação simultânea dos analitos em amostras na qual três (ou dois) analitos possam estar presentes em um mesmo medicamento, é necessário obter uma seletividade para cada analito, ou seja, detectar cada um

separadamente. Para isto é necessário o emprego de simples equações matemáticas, conforme demonstrado anteriormente[17, 21]. Para a detecção seletiva de PA, SA e CA são utilizadas as equações 1, 2 e 3, respectivamente:

(1)

(2)

(3)

Conforme apresentado, nas equações 2 e 3 são incluídos fatores de correção (CF). Estes fatores são necessários para corrigir diferenças nas correntes de um dado analito nos distintos pulsos de potencial empregados (Por exemplo, na Fig. 4b$_2$ pode-se notar uma nítida diferença entre as correntes de SA em +1,6 V e +1,3 V). O valor a ser usado como CF é obtido mediante a injeção de solução contendo somente de um analito que é oxidado em mais de um pulso de potencial. Neste caso, CF_1 ($i_{PA+1,3V}/i_{PA+1,0V}$) e CF_2 ($i_{PA+1,6V}/i_{PA+1,0V}$) são calculados a partir das correntes obtidas nas injeções de solução individual de PA, e o CF_3 ($i_{AS+1,6V}/i_{AS+1,3V}$) é calculado com as correntes obtidas pela injeção de solução de SA.

3.2. OTIMIZAÇÕES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA BIA-MPA

Conforme demonstrado, o emprego das equações matemáticas propostas é útil para separar as correntes relativas de cada analito individualmente. No entanto, os perfis dos picos (altura, largura) obtidos por BIA com detecção amperométrica são fortemente influenciados pelas condições de injeção dos analitos na célula BIA (volume injetado, velocidade de injeção, distância entre a ponteira do injetor até a superfície do eletrodo de trabalho, presença de agitação do eletrólito) e parâmetros instrumentais, intensidade e tempo de pulso e aplicação de potencial de limpeza[22]. Conforme já demonstrado no primeiro trabalho divulgado por Wang e Taha[23], um incremento no volume injetado promove um aumento da corrente de pico até um

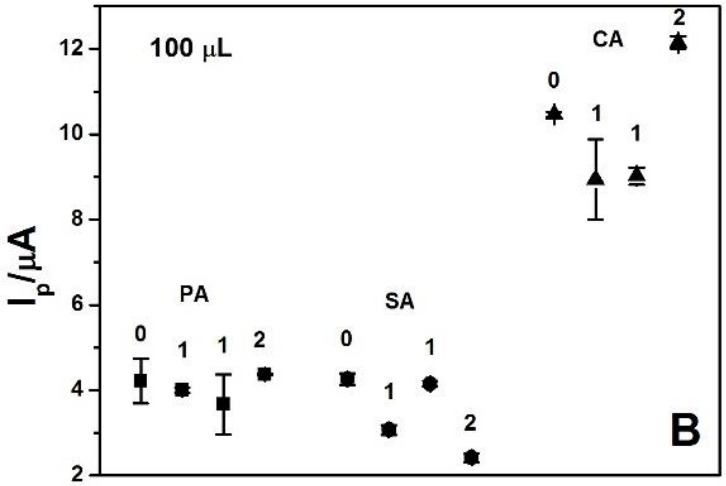
certo limite (patamar de corrente). O aumento da velocidade de injeção na célula promove um aumento na corrente de pico e diminuição na largura do pico, devido à redução da dispersão do analito no eletrólito. Logo, utilizando um maior volume injetado e uma alta velocidade de injeção favorece a obtenção de respostas com maior detectabilidade. Já a presença de agitação do eletrólito promove uma diminuição da largura do pico, devido à rápida remoção do analito da superfície do eletrodo (“lavagem”), promovida pela convecção criada na solução.

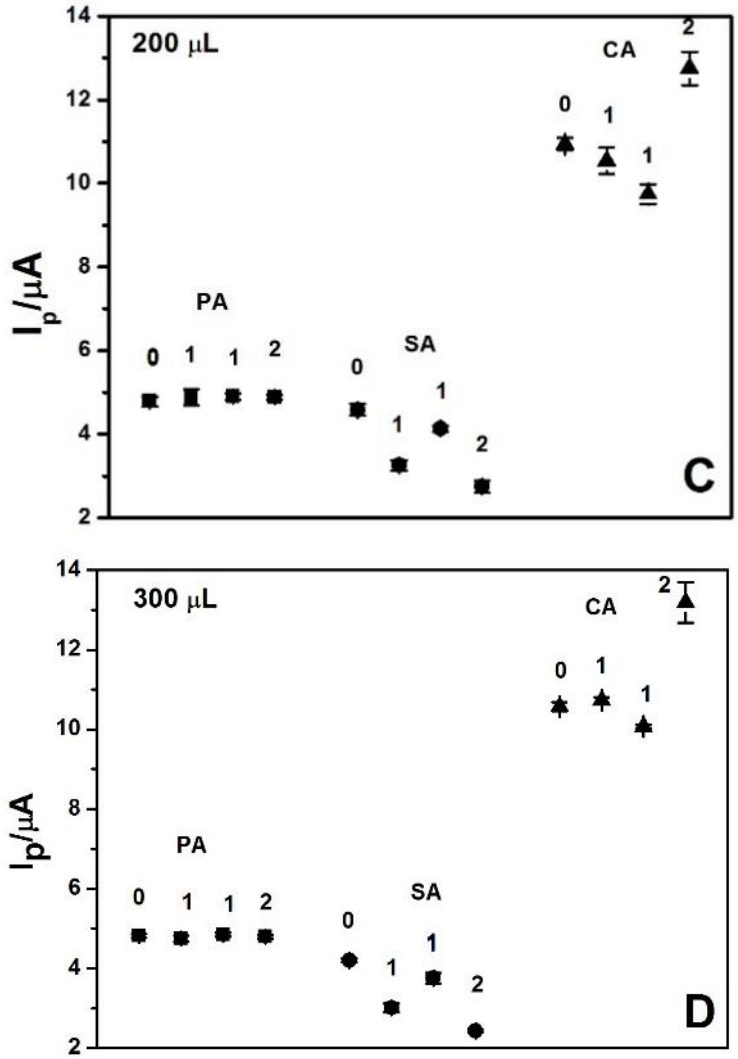
Logo, o emprego de agitação favorece a obtenção de um sistema com maior frequência analítica. Apesar de muitos trabalhos posteriores demonstrarem estes efeitos, em poucos é discutido o efeito destas variáveis sobre a precisão do método. No caso de uma determinação simultânea de três espécies empregando o sistema BIA-MPA, o estudo desta precisão é de suma importância, visto que os sinais obtidos para SA e CA são indiretos (obtidos pelas equações 2 e 3, respectivamente).

Para avaliar o efeito do volume injetado na precisão do sistema, foram realizadas injeções em triplicata de solução individuais de PA, SA ou CA (20 μmol L^{-1}) e soluções mistas contendo dois ou três destes fármacos na mesma solução (também 20 μmol L^{-1} de cada) empregando os volumes de 50, 100, 200 e 300 μL (cada volume em um experimento). A sequência de injeções para cada volume injetado foi similar ao da Fig. $4b_2$. A Fig. 5 apresenta as correntes de pico individuais médias (± desvio padrão) de cada analito (calculadas a partir das eq. 1, 2 e 3), na ausência e na presença de um ou dois destes analitos para cada volume avaliado (50 a 300 μL). Conforme apresentado, em todos os volumes a precisão mais baixa para CA e maior para PA ($DP_{CA} > DP_{SA} > DP_{PA}$), pois as medidas de SA (eq. 2) e CA (eq. 3) são indiretas, ou seja, obtidas mediante subtrações matemáticas, o que torna o desvio mais elevado. No entanto, para o PA este efeito não é tão pronunciado, pois a detecção deste é direta sem a necessidade de equações (Eq. 1).

Figura 5 - Correntes de pico amperométrica médias (± barra de desvio padrão) para cada fármaco na ausência (0), na presença de um (1) ou dos outros dois princípios

[CA] = [SA] (individual ou mistura) = 20 μmol L^{-1}. Condições: Velocidade de Injeção: 156 μL s^{-1}. Tempo de pulso: 50 ms. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}.



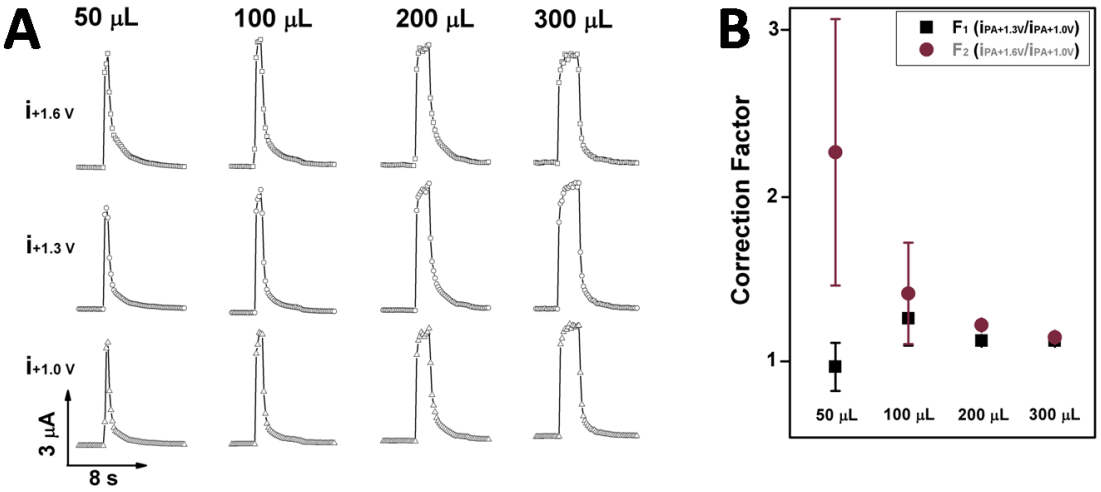


Comparando-se os quatro experimentos da Fig. 5, são observados os maiores desvios (baixa precisão) quando é utilizado um volume injetado de 50 µL. Este efeito pode ser melhor compreendido observando-se os picos obtidos no amperograma de múltiplos pulsos da Fig. 6, que apresenta parte do amperograma utilizado para obter as i_{PA}, i_{SA} e i_{CA} da Fig. 5. Conforme apresentado (Fig. 6A), os picos obtidos para a injeção de 50 µL apresentam poucos pontos na região de corrente máxima. Em outras palavras, o pacote de amostra que chega até superfície do ET não é grande para registrar um número de pontos de corrente de pico suficiente no software (GPES 4.9). Devido a isto, os fatores FC_1 e FC_2 (Fig. 6B) apresentam desvios elevados, o que resultam em correntes indiretas (SA e CA) também com baixíssima precisão (Fig. 5A). Comparativamente, injetando-se 300 µL os picos apresentam um número de pontos bem maior na corrente máxima, acarretando em menores desvios dos fatores (Fig. 6B) e consequentemente em I_{SA} e

I_{CA}. Adicionalmente (Fig. 6A), neste volume os picos são um pouco mais largos (resultando em frequência analítica reduzida) e a princípio aumenta a contaminação do ET (pois um maior volume de amostra entra contato com a superfície do ET).

No entanto, para a obtenção de precisão adequada para cada fármaco em uma determinação simultânea, nos experimentos subsequentes foi adotado um volume injetado de 300 µL.

Figura 6 - Picos do amperograma de múltiplos pulsos obtidos para injeção de solução de PA 20 µmol L^{-1} sob distintos volumes de injeção (50, 100, 200 e 300 µL) (A) e respectivos fatores de correção médios (± DP)* (B). Condições: Tempo de pulso: 50 ms; Velocidade de injeção: 156µL s^{-1}; Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}.
*CF_1 e CF_2 médios (± DP) calculados para injeções em triplicata de cada volume de injeção.



Apesar da obtenção da melhor precisão quando é utilizado o volume de 300 µL, é observada uma discrepância entre a corrente obtida para SA (ou CA) em solução individual e a corrente quando está em solução mista contendo um ou dois destes princípios ativos (Fig. 5D). No entanto, para a obtenção de uma maior exatidão em uma análise simultânea de PA, ASA e CA é de suma importância que as correntes obtidas para cada analito sejam as mesmas, independemente se cada fármaco está em uma amostra contendo apenas este fármaco ou este na presença de outros fármacos.

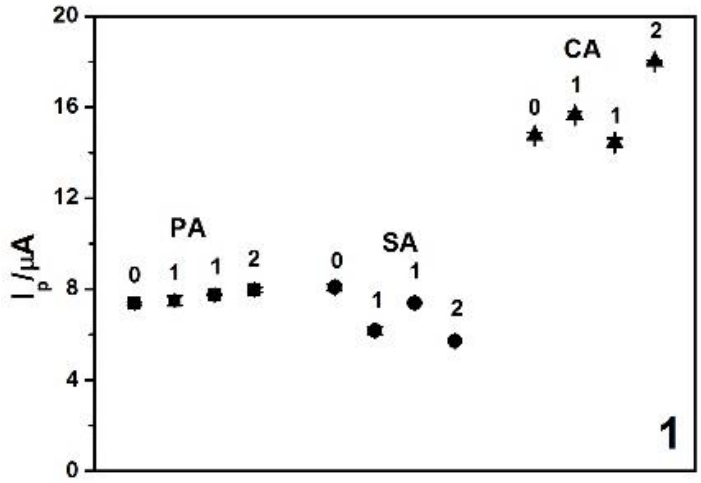
Na busca por tal condição, foram realizados sete ciclos de injeções (na mesma sequência da Fig. $4b_2$), sendo adotada uma condição de velocidade de

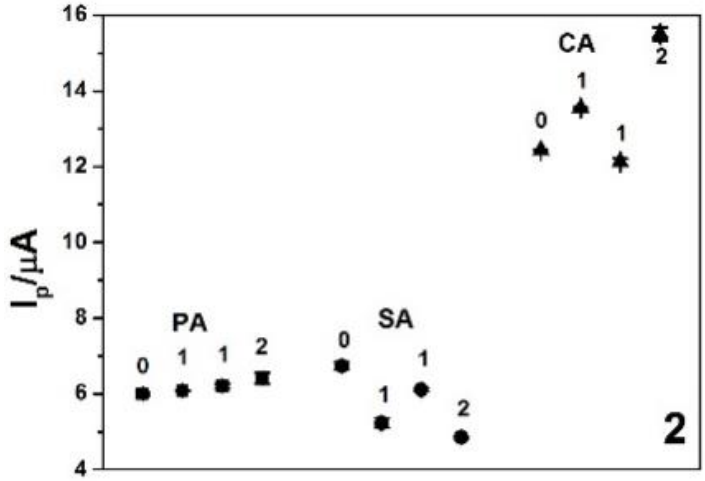
injeção e agitação da solução da célula BIA em cada experimento. As sete condições experimentais são apresentadas na Tabela 1, e as correntes de cada fármaco (na ausência ou presença de outros) nestes experimentos são apresentadas na Fig. 7.

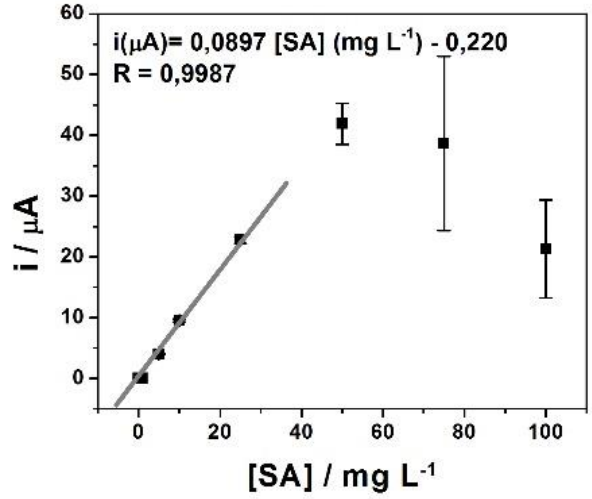
Tabela 1. Condições dos experimentos para as otimizações das variáveis do sistema BIA-MPA para a determinação simultânea de PA, ASA e CA.

Experimento	Velocidade de injeção ($\mu L\ s^{-1}$)	Agitação (rpm)
1	344	1400
2	256	2200
3	75	1760
4	113	1400
5	153	1760
6	256	1200
7	113	880

Figura 7 - Correntes de pico amperométrica médias (± DP) para cada fármaco na ausência (0), na presença de um (1) ou dos outros dois princípios ativos (2) nas sete condições experimentais (Tabela 1). [PA] = [CA] = [SA] (individual ou mistura) = 20 µmol L^{-1}. Condições: Tempo de pulso: 50 ms. Eletrólito suporte: H_2SO_4 0,1 $molL^{-1}$. Volume injetado: 300 µL.




16
14
12
10
8
6
4
$I_p/\mu A$
PA
SA
CA
0
1
1
2
0
1
1
2
0
1
1
2
2


i(μA)= 0,0897 [SA] (mg L-1) - 0,220
R = 0,9987
i / μA
[SA] / mg L-1

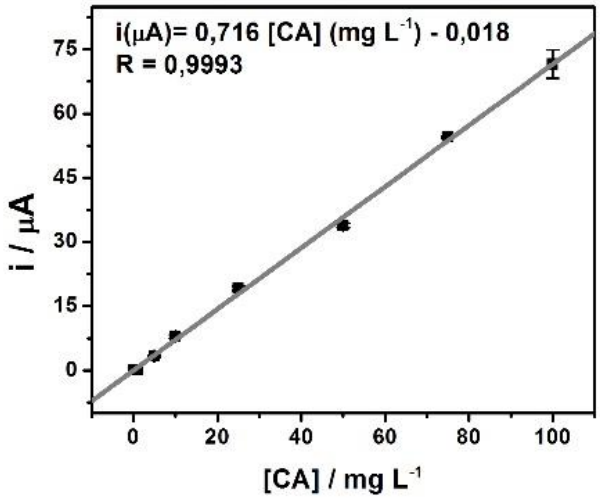
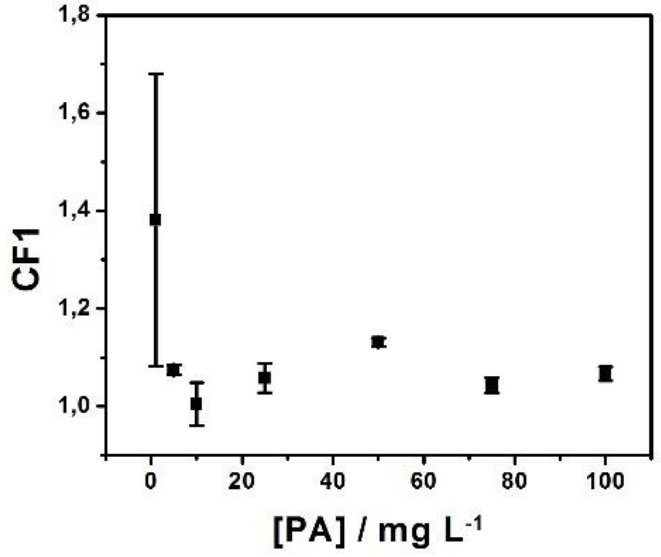
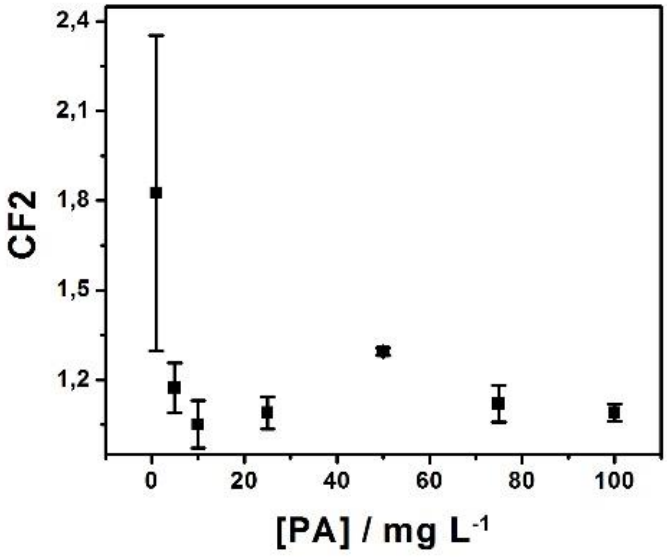
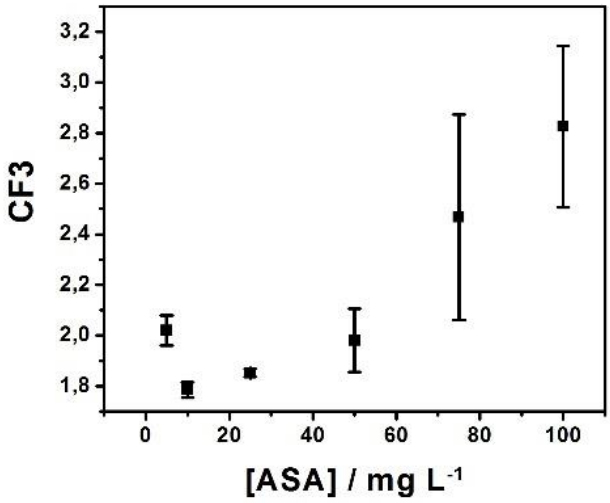

i(μA)= 0,716 [CA] (mg L-1) - 0,018
R = 0,9993
i / μA
[CA] / mg L-1

Figura 9 - Fatores de correção médios (± DP) obtidos em distintas concentrações de cada fármaco*.

* CF_1 e CF_2 calculados a partir das correntes dos amperogramas de múltiplos pulsos obtidos para injeções de PA nas respectivas concentrações; CF_3 calculado a partir dos amperogramas (não apresentados) para injeções de ASA.







Conforme apresentado, a curva de PA (Fig. 8A) e de CA (Fig. 8C) apresentaram faixa linear em todo o intervalo de concentração avaliado (1 a 100 mg L^{-1}). Além disso, os fatores de correção CF_1 (Fig. 9A) e CF_2 (Fig. 9B), calculados a partir das correntes para injeção de solução apenas de PA, apresentaram um valor praticamente constante no intervalo de 5 a 100 mg L^{-1} (CF_1 = 1,06 ± 0,04; CF_2 = 1,14± 0,09). No entanto, a curva obtida para SA (Fig. 8B) apresentou faixa linear apenas até 25 mg L^{-1}, provavelmente devido a uma hidrólise básica incompleta do ASA. Consequentemente o CF_3 (Fig. 9C), calculado a partir da injeção de solução contendo SA, apresentou um valor praticamente constante (CF_3 = 1,91 ± 0,06) apenas neste intervalo de concentração (1 a 25 mg L^{-1}).

Logo, para a determinação simultânea, no qual serão injetados no sistema padrões mistos (contendo os três fármacos) e amostras comerciais contendo até três princípios ativos, para a obtenção de resultados confiáveis as concentrações dos padrões (e amostras diluídas) devem estar presentes nestes intervalos de concentração (PA e CA: 5 a 100 mg L^{-1}; SA 1 a 25 mg L^{-1}).

3.3. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE PA, ASA E CA EM MEDICAMENTOS COMERCIAIS

Para a determinação simultânea de PA, ASA e CA foram adotadas as condições otimizadas: - Pulsos de potencial: +1,0 V, +1,3 V e +1,6 V (50 ms cada);

- Volume injetado na célula BIA: 300 µL;

- Velocidade de injeção das soluções na célula BIA: 113 µL s^{-1};

- Agitação do eletrólito suporte na célula BIA: 1400 RPM;

- [PA] = [CA] no intervalo de 5 a 100 mg L^{-1} e [ASA] no intervalo 1 a 25 mg L^{-1}.

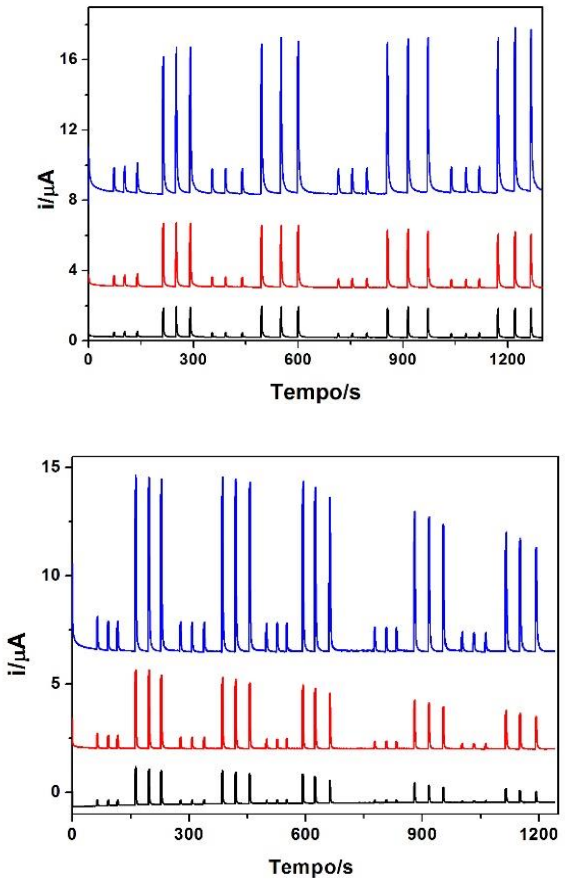
Logo, preparou-se o padrão de PA (cálculo de CF_1 e CF_2), padrão de AS (cálculo de CF_3), seis padrões mistos contendo distintas concentrações de PA, ASA e CA e diluiu-se oito medicamentos (nos intervalos de concentrações pré-estabelecidos). Cada solução preparada foi injetada em triplicata nas condições otimizadas.

No entanto, a partir dos amperogramas de múltiplos pulsos obtidos (não apresentados), concluímos que os fatores calculados apresentavam uma grande variação no decorrer das injeções de padrões e amostras. Mediante as soluções de PA e SA no início e no final da curva foi possível monitorar esta variação. No início (e no final) foram obtidos os seguintes fatores: F_1 = 1,05 (1,38), F_2 = 1,07 (1,23), F_3 = 1,80 (3,33). Em outras palavras, F_1, F_2 e F_3 aumentaram em 31 %, 15 % e 85% no decorrer das injeções. Provavelmente esta diferença ocorreu devido à passivação parcial da superfície do eletrodo de BDD, devido a adsorção de produtos de oxidação dos analitos, ou uma possível desativação da superfície do BDD, que inicialmente continha grupos hidrogênio gerados pela ativação catódica prévia. Para evitar esta adsorção, avaliamos a inclusão de outros pulsos de potencial. Conforme relatado na literatura[21], em alguns casos é possível reduzir a contaminação do eletrodo de trabalho através da aplicação de um ou mais pulsos de “limpeza” e/ou ativação, aumentando a estabilidade da superfície do eletrodo e das medidas eletroquímicas.

Na Fig. 10b são apresentadas injeções em triplicata de uma solução mista de PA, ASA e CA na concentração de 2,5, 4,0 e 1,0 mg L^{-1}, respectivamente e outra solução seis vezes mais concentrada (15, 24 e 6 mg L^{-1}), injetadas alternadamente. Conforme apresentado após injeções alternadas e sucessivas das duas soluções (concentração alta e baixa) é possível observar um decaimento gradativo nas

correntes (tal como observado na primeira curva de calibração não apresentada), devido a passivação do eletrodo de BDD. Na Fig. 10a são apresentadas as mesmas injeções, porém no BDD são aplicados mais três pulsos de potencial (+0,65 V/200 ms, +0,7 V/200 ms, +0,9 V/200 ms) (Fig. 10a), de maneira sequencial com os pulsos de detecção (+1,0 V/50 ms, +1,3 V/50 ms e +1,6 V/50 ms). Conforme apresentado é possível observar uma maior reprodutibilidade nas três correntes de pico anódicas ($i_{+1,0V}$, $i_{+1,3V}$ e $i_{+1,6V}$), devido provavelmente a manutenção da superfície do BDD no decorrer das injeções. Logo, a inclusão destes três potenciais promoveu uma limpeza eletroquímica da superfície do BDD.

Figura 10 - Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos para injeções em triplicata de solução mista de PA/SA/CA 2,5/4,0/1,0 (mg L^{-1}) e 15/25/6 (mg L^{-1}), injetadas alternadamente com três pulsos de potenciais de limpeza (+ 0,65 V/200 ms, + 0,7 V/200 ms, +0,9 V/200 ms) (A) e sem pulsos potencial de limpeza (B). Condições: Tempo de pulso de detecção: 50 ms; Volume injetado: 300 uL; Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}.



Após estes experimentos, foi realizado a determinação simultânea dos fármacos. Para tal, foram injetadas no sistema BIA-MPA soluções padrão mistas de concentrações crescentes de PA, ASA e CA (razão em massa de 5:8:2, respectivamente) e oito soluções de medicamentos distintos. Os amperogramas de múltiplos pulsos obtidos neste experimento e as respectivas curvas de calibração calculadas para PA, ASA e CA são apresentados na Figura 11.

Figura 11 - (A) Sequência dos pulsos de potencial aplicados no eletrodo de BDD (B) Amperogramas obtidos nos três pulsos de potencial para injeções em triplicata de soluções contendo somente PA (a), ASA (b), padrões mistos de PA:ASA:CA na razão em massa de 5:8:2 (p_1 – p_6) em concentrações crescentes, oito soluções de amostras contendo PA, ASA e/ou CA (a_1 – a_8); Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}; Condições otimizadas: Volume de injeção: 300 µL; Velocidade de injeção:113 µL s^{-1}.

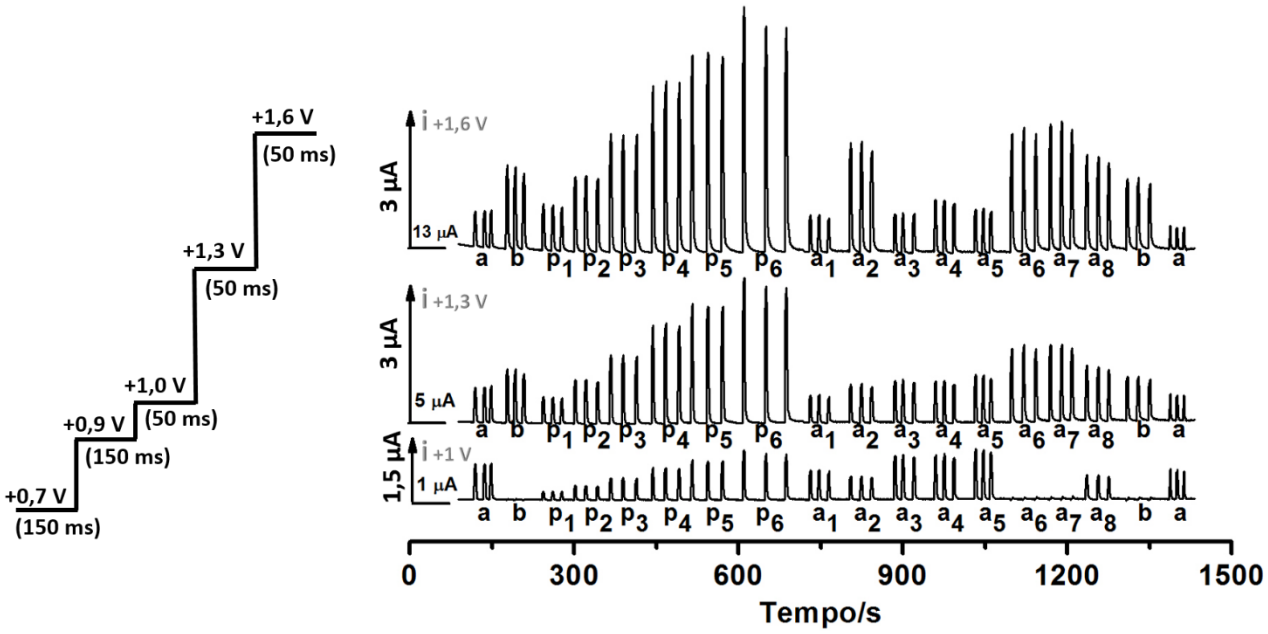
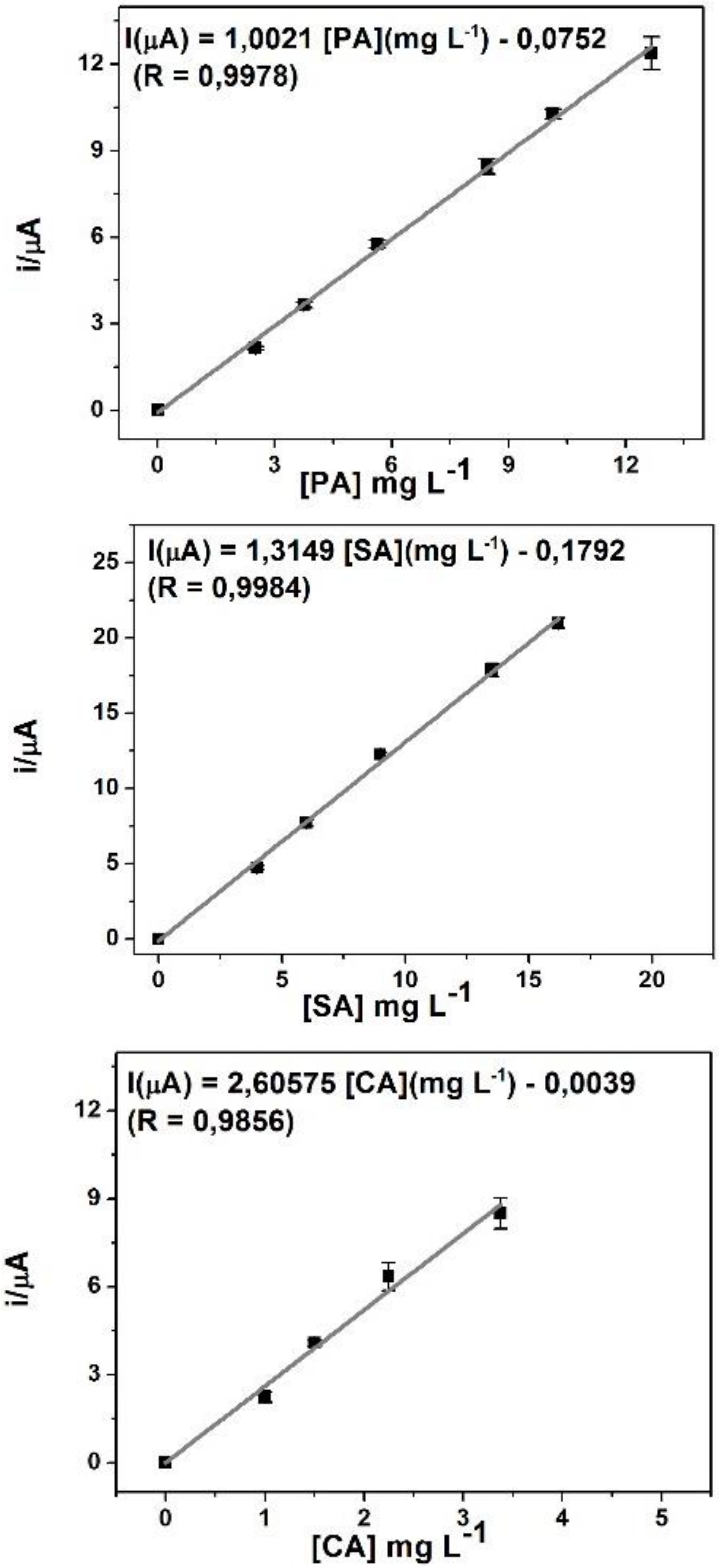


Figura 12 - Curvas de calibração PA, SA e CA (e equações de reta da Fig. 11).



Conforme apresentado na Figura 12. As curvas de calibração obtidas a partir das correntes de oxidação de PA, SA e CA apresentaram boa linearidade e os seguintes parâmetros de confiabilidade analítica, apresenta da Tabela 1:

Tabela 1 – Parâmetros de Confiabilidade Analítica.

	PA	**SA**	**CA**
Intercept	-0,075	-0,179	-0,003
Slope	1,002	1,314	2,605
R	0,998	0,998	0,985
Limite Detecção (mg L^{-1})	0,24	0,23	0,008
Limite Quantificação (mg L^{-1})	0,62	0,45	0,024

Nestas condições, a frequência analítica foi calculada em 145 injeções por hora. Os fatores de correção apresentaram os seguintes valores no início/final da curva de calibração: F_1: 0,98/0,90, F_2: 1,01/0,80, F_3: 1,54/1,38, o que representa decaimentos de 8 %, 20 % e 10 % no decorrer das injeções. Logo, mesmo incluindo estes pulsos de limpeza houve um indício de alteração da superfície do BDD. No entanto esta alteração nos fatores foi menos pronunciada do que anteriormente (curva sem o uso de pulsos de limpeza). Provavelmente, esta adsorção na superfície ocorreu devido ao elevado número de amostras em sequência. As dosagens obtidas de PA, ASA e CA pelo método proposto (BIA-MPA) nos oito medicamentos, bem como os valores rotulados são apresentados na Tabela 2. Conforme apresentado, as dosagens obtidas para os três fármacos foram próximas aos valores rotulados.

No entanto, maiores conclusões serão obtidas após a validação do método proposto com um método de cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 2 - Valores rotulados e obtidos pelo método BIA-MPA para oito medicamentos.

Amostra	Composto	Valor rotulado (mg)	Valor BIA-MPA (mg) ± RSD (%)	Erro (%)
1	PA	500	396 ± 2	-20,8
	CA	65	33 ± 14	-49,2
2	PA	150	150 ± 2	0
	ASA	50	74 ± 9	48
	CA	200	151 ± 2	-24,5
3	PA	750	654 ± 2	-12,8
4	PA	500	447 ± 3	-10,6
	CA	65	28 ± 7	-56,9
5	PA	200	172 ± 2	-14
6	ASA	500	463 ± 2	-7,4
	CA	30	15 ± 14	-50
7	ASA	650	603 ± 2	-7,2
	CA	65	40 ± 8	-38,4
8	PA	250	194 ± 3	-22,4
	ASA	250	187 ± 4	-25,2
	CA	65	65 ± 4	0

Erro (%) = (Valor BIA-MPA – Valor rotulado)/Valor rotulado * 100.

Tabela 3 - Comparação entre o método proposto (BIA-MPA) para a determinação simultânea de PA, ASA e CA (ou combinações entre estes) com outros métodos eletroquímicos.

Técnica Eletroquímica/ ET	Analitos detectados	Limite de detecção / µmol L^{-1}	Frequência Analítica / h^{-1}	Referência
DPV/GCE	PA CA	-	-	[10]
SWV / Nafion® - RuO_2Electrode	PA CA	1,2 2,2	-	[11]
DPV/BDDE	PA CA	0,49 0,035	-	[13]
Ads-DPV / ISSM-CNT-PE	PA ASA CA	0,025 0,084 0,088	-	[12]
SWV/EPPGE	ASA CA	0,01 0,008	-	[24]
BIA-MPA/BDDE	PA CA	1,72 0,72	>60	[17]
FIA-MPA/BDDE	PA CA	0,66 0,87	140	[21]
DPV/BDDE	ASA CA	0,23 0,16	-	[14]
BIA-MPA/BDDE	PA ASA CA	1,58 1,27 0,041	145	Este trabalho*

DPV: Voltametria de Pulso Diferencial
GCE: Eletrodo de Carbono Vítreo
SWV: Voltametria de Onda Quadrada
Nafion® - RuO_2Electrode: Eletrodo de Oxido de Rutênio
Ads-DPV: Voltametria de Pulso Diferencial por Adsorção
ISSM-CNT-PE: Surfactant-ModifiedMultiwalledCarbonNanotube Paste Electrode.
EPPGE: edge plane pyrolyticgraphiteelectrode
BIA-MPA: Análise por Injeção em Batelada com Detecção por Amperometria de múltiplos pulsos
BDDE: Eletrodo de Diamante Dopado com Boro
FIA-MPA: Análise por Injeção em Fluxo com Detecção por Amperometria de múltiplos pulsos

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O eletrodo de diamante dopado (BDD) com boro pré-tratado catodicamente adaptado a um sistema de análise por injeção em batelada com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (BIA-MPA) apresentou estabilidade e sensibilidade adequada para a determinação simultânea de paracetamol (PA), ácido acetilsalicílico (ASA) e cafeína (CA). Para isto, a sequência de pulsos de potencial de detecção de +1,0 V, +1,3 V e +1,6 V (50 ms cada) aplicada juntamente com pulsos de limpeza, forneceu os melhores resultados. Para amostras que contenham os três fármacos (PA, ASA e CA), no pulso de +1,0 V somente PA é detectado, em +1,3 V PA e ácido salicílico (ASA hidrolisado) são detectados e em +1,6 V os três analitos são detectados. Juntamente com simples equações matemáticas foi possível obter as correntes de cada analito, sendo possível quantificá-los simultaneamente.

No entanto para obter as precisões adequadas para os analitos que são detectados indiretamente (ASA e CA), foi necessário otimizar as condições de injeção das amostras na célula BIA, sendo obtidas os menores desvios quando injetou-se 300 µL de solução, em uma velocidade de 113 µL s^{-1} e agitação da solução da célula de 1400 RPM. Nestas condições foi possível determinar simultaneamente a dosagem de PA, ASA e CA em várias formulações farmacêuticas. As dosagens obtidas com o método BIA-MPA para a maioria dos medicamentos foram próximas aos valores rotulados. No entanto estes valores devem ainda ser validados com um método de cromatografia líquida de alta eficiência para maiores conclusões.

Além disso, o sistema apresentou uma alta frequência analítica (145 injeções por hora) quando comparados a outros trabalhos da literatura, com a vantagem de serem detectadas três espécies em cada injeção. Além disso, o sistema BIA-MPA é portátil e de custo bem reduzido quando comparados aos métodos cromatográficos. Os autores esperam que o sistema possa ser aplicado para outras determinações simultâneas de três espécies em amostras farmacêuticas.

5. REFERÊNCIAS

(1) Anvisa, O que devemos saber sobre medicamentos. 2010. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/92aa8c00474586ea9089d43fbc4c6735/Cartilha+BAIXA+revisão+24_08.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 25/11/2014

(2) Disponível em: http://www.abradilan.com.br/noticias_detalhe.asp?noticia=2586>. Acesso em 25/11/2014

(3) Ácido acetilsalicílico: o comprimido 1.001 utilidades. 2006. Disponível em: http://revistavivasaude.uol.com.br/Edicoes/22/artigo14912-1.asp/. Acesso em: 25/11/2014

(4) Remédios, Consulta. Disponível em: http://www.consultaremedios.com.br, Acessado em 25/11/2014

(5) Derry, S.; Moore, R. A. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, 59.

(6) Diener, H. C.; Peil, H.; Aicher, B. *Cephalalgia* 2011, *31*, 1466-1476.

(7) Anneken, K.; Evers, S.; Husstedt, I. W. *European Journal of Neurology* 2009, *17*, 534-E525.

(8) Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Brasília 2010. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home. Acesso em: 25/11/2014

(9) dos Santos, W. T. P.; Gimenes, D. T.; Richter, E. M.; Angnes, L. *Quimica Nova* 2011, *34*, 1753-1761.

(10) Lau, O. W.; Luk, S. F.; Cheung, Y. M. *Analyst* 1989, *114*, 1047-1051.

(11) J.-M. Zen, Z.-S. T.; *Analytica Chimica Acta*, 1997; Vol. 342 175-180.

(12) Sanghavi, B. J.; Srivastava, A. K. *Electrochimica Acta* 2010, *55*, 8638-8648.

(13) Lourenção, B. C. u.; Medeiros, R. A.; Rocha-Filho, R. C.; Mazo, L. H.; Fatibello-Filho, O. *Talanta* 2009, *78*, 748-752.

(14) Faria, E. O.; Lopes, A. C. V.; Souto, D. E. P.; Leite, F. R. F.; Damos, F. S.; Luz, R. D. S.; dos Santos, A. S.; Franco, D. L.; dos Santos, W. T. P. *Electroanalysis* 2012, *24*, 1141-1146.

(15) Lawrence, N. S.; Pagels, M.; Meredith, A.; Jones, T. G. J.; Hall, C. E.; Pickles, C. S. J.; Godfried, H. P.; Banks, C. E.; Compton, R. G.; Jiang, L. *Talanta* 2006, *69*, 829-834.

(16) Sartori, E. R.; Medeiros, R. A.; Rocha, R. C.; Fatibello, O. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2009, *20*, 360-366.

(17) da Silva, R. A. B.; Gimenes, D. T.; Tormin, T. F.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M. *Analytical Methods* 2011, *3*, 2804-2808.

(18) Enache, T. A.; Fatibello, O.; Oliveira-Brett, A. M. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2010, *13*, 569-577.

(19) Pedrotti, J. J., Angnes, L., Gutz, I. G. R.; *Electroanalysis* 1996; Vol. 8, 673.

(20) de Miranda, J. A. T.; Cunha, R. R.; Gimenes, D. T.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M. *Quimica Nova* 2012, *35*, 1459-1463.

(21) Silva, W. C.; Pereira, P. F.; Marra, M. C.; Gimenes, D. T.; Cunha, R. R.; da Silva, R. A. B.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M. *Electroanalysis* 2011, *23*, 2764-2770.

(22) Silva, R. A. B; *Tese de Doutorado*: Uberlândia, 2012.

(23) Wang, J., Taha, Z. *AnalyticalChemistry* 1991, *63, 1053-1056.*

(24) Goyal, R. N.; Rana, A. R. S.; Chasta, H. *Journal of the Electrochemical Society* 2013, *160*, G3014-G3019.