

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Química

LAISE NAYRA DOS SANTOS PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO EMPREGANDO TÉCNICAS
ELETROQUÍMICAS E ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA**

São Luís
2014

LAISE NAYRA DOS SANTOS PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO EMPREGANDO TÉCNICAS
ELETROQUÍMICAS E ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Química com área de concentração em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka

São Luís
2014

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO EMPREGANDO TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS E ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA

LAISE NAYRA DOS SANTOS PEREIRA

Aprovada em: 18/07/2014

BANCA EXAMINADORA



Prof. Auro Atsushi Tanaka (Orientador)
DEQUI - UFMA



Prof. Mauro Bertotti
IQ-USP



Prof. Flávio Santos Damos
DEQUI - UFMA

Aos meus queridos pais Rita e Edinaldo pelo seu amor, paciência, dedicação e incentivo. Que são merecedores de todo o meu esforço, vocês fazem parte desta conquista. Também aos meus irmãos Larice e Esdras pelo encorajamento e estímulo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha existência, pelo seu imenso amor, por ser meu refúgio, pelos dons adquiridos e por tudo que fez e que ainda fará.

A minha Família, pelo amor e que mesmo de longe sempre estiveram presente ajudando e torcendo pela concretização deste sonho.

Ao professor Dr. Auro Atsushi Tanaka, pela oportunidade que foi me dada, uma experiência ímpar, pela confiança e amizade, meu especial agradecimento pela orientação deste trabalho.

Ao Dr. Lúcio Angnes pelo apoio, orientação e confiança creditada no período de desenvolvimento deste trabalho no Instituto de Química da USP - São Paulo.

Ao Dr. Iranaldo Santos da Silva, pela total dedicação, paciência e pelas valiosas contribuições.

A Dr^{ra}. Quésia Guedes da Silva, em especial pelo apoio e ensinamentos prestados.

Aos alunos e professores do Laboratório de Eletroquímica (LELQ) da UFMG e do Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica (LAIA), do IQ-USP, pela receptividade, colaboração e atenção dispensada.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química da UFMG e a todos os alunos, especialmente os da Turma 2012.2.

Aos amigos Adriana, Alcilene, Antonio Filho, Carlos, David, Dhully, Helson, Leandro, Paulo, Roberto, Railson, Suelma, Steve e Thúlio pelas companhias e amizades construídas,

A FAPEMA pela bolsa concedida.

“Escute os sábios e procure entender o que eles ensinam. Sim, peça sabedoria e grite pedindo entendimento. Procure essas coisas, como se procurasse prata ou um tesouro escondido.”

(Provérbios 2: 2-4)

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para determinação de ácido α -lipóico (ALA) em suplemento dietético utilizando eletrodo de grafite pirolítico (GP) modificado com ftalocianina de cobalto (CoPc) a partir de técnicas eletroquímicas e pela Análise por Injeção em Batelada (BIA). Os voltamogramas cíclicos da oxidação de ALA sobre o eletrodo GP/ CoPc apresentaram um pico irreversível com potencial $\sim +0,85$ V vs. Ag/ AgCl, mostrando um deslocamento do início da corrente de oxidação em cerca de 100 mV para potenciais menos positivos, bem como um aumento significativo na magnitude da corrente de pico, quando comparados ao eletrodo não modificado GP. As curvas analíticas obtidas com as técnicas de voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e cronoamperometria apresentaram boa linearidade e sensibilidade. A técnica de VPD apresentou os melhores valores de limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), $3,4 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e $1,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente. Portanto foi a técnica escolhida para determinação de ALA. Resposta voltamétrica do ALA também foi avaliada no eletrodo GP não modificado e modificado em condições hidrodinâmicas. A modificação do eletrodo GP/ CoPc produziu um aumento de 2,33 vezes comparado com o eletrodo GP. O método analítico foi então proposto usando o eletrodo GP/ CoPc para detecção de ALA por BIA. O método apresentou uma boa faixa linear compreendida entre (1×10^{-6} a 1×10^{-4} mol L⁻¹); valores de LD e LQ de $1,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente, com frequência analítica de 208 injeções/ hora. A quantificação de ALA em suplemento dietético apresentou resultados concordantes com os obtidos pelo método cromatográfico, apresentando um nível de confiança de 95%. Testes de recuperação foram feitos adicionados uma concentração de ALA em amostra de urina sintética, onde os valores de recuperação foram na faixa de 98 a 107%.

Palavras-chave: Ácido α -lipóico. Ftalocianina de cobalto. Técnicas eletroquímicas. Análise por injeção em batelada.

ABSTRACT

This work describes the development of electroanalytical procedures for α -lipoic acid (ALA) determination in dietary supplement using a pyrolytic graphite electrode (PG) modified with cobalt phthalocyanine (CoPc) from electrochemical techniques and by Batch Injection Analysis (BIA). Cyclic voltammograms of ALA oxidation on the PG/CoPc electrode presented an irreversible peak $\sim +0.85$ V vs Ag/AgCl, a value about 100 mV to less positive potential, well as a significant increase in the magnitude of peak current compared to the PG electrode unmodified. The analytical curves obtained with cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV) and chronoamperometry showed good linearity and sensitivity. The DPV technique showed the best values of limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) 3.4×10^{-9} mol L⁻¹ and 1.2×10^{-8} mol L⁻¹, respectively. Therefore was chosen for determination of ALA on technique. Voltammetric response of ALA was also evaluated in PG electrode unmodified and modified in hydrodynamic conditions. The modification of the PG/CoPc electrode produced an increase of 2.33 times compared to the PG electrode. The analytical method was then proposed using the PG/CoPc electrode for detection of ALA by BIA. The method showed a good linear range between (1.0×10^{-6} to 1.0×10^{-4} mol L⁻¹), values of LOD and LOQ of 1.5×10^{-8} mol L⁻¹ and 5.0×10^{-8} mol L⁻¹, respectively, with analytical frequency of 208 injections/ hour. The quantification of ALA in dietary supplement showed concordant results with those obtained by chromatographic method, with a confidence level of 95%. Recovery tests were performed added a concentration of ALA in a sample of synthetic urine, where the recovery values were in the range 98 - 107%.

Keywords: α -Lipoic acid. Cobalt phthalocyanine. Electrochemical techniques. Injection analysis batch.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALA	Ácido α -lipóico
BIA	Análise por Injeção em Batelada
BR	Tampão Britton-Robinson
CoPc	Ftalocianina de cobalto
CRONO	Cronoamperometria
CV	Carbono Vítreo
ECS	Eletrodo de Calomelano Saturado
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
EQM's	Eletrodos Quimicamente Modificados
DMSO	Dimetilsulfóxido
FIA	Análise por Injeção em Fluxo
FTO	Eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor
GP	Grafite pirolítico
GP/CoPc	Eletrodo de grafite pirolítico modificado com ftalocianina de cobalto
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
I_{pa}	Corrente de pico anódico
I_{pc}	Corrente de pico catódico
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MPc	Metaloftalocianina
mV	Milivolts

NCT	Nanotubos de carbono
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
RSD	Desvio padrão relativo
Sd	Desvio padrão
UV/ VIS	Ultravioleta visível
v	Velocidade
V	Volts
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ação dos radicais livres.....	5
Figura 2. Estrutura molecular do ácido α - lipóico	6
Figura 3. Estrutura de uma metaloftalocianina.....	10
Figura 4. Estrutura da ftalocianina de cobalto.....	11
Figura 5. Representação esquemática do experimento de VC: <i>E_i</i> : Potencial inicial, <i>E_f</i> : Potencial final; <i>E_s</i> : Potencial de inversão; EA: Eletrodo auxiliar; ER: Eletrodo referência e ET: Eletrodo de trabalho.....	12
Figura 6. Esquema de aplicação de potencias de potenciais por voltametria de pulso diferencial	13
Figura 7. Experimento cronoamperométrico.....	14
Figura 8. Esquema da célula de BIA: A) Eletrodo de trabalho, B) Eletrodo auxiliar, C) Eletrodo de referência, D) Micropipeta, E) Orifício para preenchimento da tampa, F) Barra de agitação G) Dreno.. ..	15
Figura 9. Célula eletroquímica: (1) Eletrodo de trabalho; (2) Eletrodo de referência; (3) Eletrodo auxiliar; (4) Tampa de Teflon®; (5) Corpo da célula.....	23
Figura 10. Detalhes da célula de BIA empregada neste estudo: (a) Eletrodo auxiliar, (b) Tampa da célula (Teflon), (c) Corpo da célula, (d) Micropipeta motorizada, (e) Eletrodo de referência, (f) Dreno, (g) Eletrodo de trabalho. (volume: 30 mL).	25
Figura 11. Voltamogramas cíclicos em NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, saturada com N ₂ : A) eletrodo CV, B) eletrodo CV/ CoPc., C) eletrodo GP, D) eletrodo GP/ CoPc.....	29
Figura 12. Arranjo cristalino característico dos materiais carbonosos gráfiticos.....	30
Figura 13. Voltamogramas cíclicos em tampão fosfato (pH 7, 0): (A) branco em GP, (B) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA em GP liso e (C) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA em GP/ CoPc, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$	31
Figura 14. Voltamogramas cíclicos de ALA $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS (pH 7, 0) em eletrodo GP/ CoPc em diferentes velocidade de varredura: 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mV s ⁻¹ . (B) Variação linear de <i>I_p</i> vs.	

- $V^{1/2}$. (C) Variação linear de E_p vs. $\log(V)$32
- Figura 15. Representação esquemática da eletroxidação do ALA.....33
- Figura 16. (A) Voltamograma de varredura linear sobre o eletrodo GP/ CoPc em tampão BR em diferentes pH's contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico da variação de I_p e E_p vs. pH.....34
- Figura 17. Voltamogramas cíclicos de ALA $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com eletrodo GP/ CoPc em diferentes tampões: (A) Mcllvaine, (B) Sörensen, (C) BR e (D) PBS. $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$35
- Figura 18. Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo GP/ CoPc em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7, 0) em concentrações crescentes de ALA (faixa: $1,9 \times 10^{-6}$ a $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Inserido o gráfico, I_p vs. [ALA], $R = 0.999$36
- Figura 19. Medidas cronoamperométricas de sucessivas adições de $20 \mu\text{L}$ de ALA ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em PBS pH 7, 0 em eletrodo GP/ CoPc. Potencial aplicado: $+0,9 \text{ V}$ vs. Ag/ AgCl. Inserido o gráfico, I_p vs. [ALA], $R=0.998$38
- Figura 20. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos por sucessivas adições de $20 \mu\text{L}$ de ALA ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Parâmetros: amplitude: 80 mV , tempo de pulso: 200 ms e velocidade de varredura: 25 mV s^{-1} . Inserido o gráfico, I_p vs. [ALA], $R = 0.999$...39
- Figura 21. Figura 21. Voltamograma de pulso diferencial para determinação do ALA em amostras comerciais em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) usando o método de adição de padrão. (a) Amostra, (b - e) quatro adições padrões de ALA: (b) Amostra + 2, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$; (c) Amostra + 3, $87 \mu\text{mol L}^{-1}$; (d) Amostra + 5, $05 \mu\text{mol L}^{-1}$; (e) Amostra + 6, $28 \mu\text{mol L}^{-1}$. Parâmetros: amplitude: 80 mV , tempo de pulso: 200 ms e velocidade de varredura: 25 mV s^{-1} . Inserido o gráfico, I_p vs. [ALA], $R = 0,999$41
- Figura 22. Voltamogramas hidrodinâmico obtidos por BIA. (a) Eletrodo GP sem modificação, (b) Eletrodo GP/ CoPc, ambos na presença de ALA ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições: Eletrólito suporte: PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, volume de injeção: $100 \mu\text{L}$, Potenciais variáveis (vs. Ag/ AgCl).....42

- Figura 23. Amperogramas obtidos por BIA usando eletrodo GP/ CoPc. Cada pico corresponde a uma injeção de 100 μL de ALA. Condições: eletrólito suporte: PBS 0,1 mol L^{-1} , potencial aplicado: + 0,9 V (vs. Ag/ AgCl). 43
- Figura 24. Resultados das injeções consecutivas por BIA.(a) 10 e (b) 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ALA. Condições: eletrólito suporte - PBS 0,1 mol L^{-1} , potencial aplicado: + 0,9 V (vs. Ag/ AgCl).....44
- Figura 25. Gráfico do estudo de reprodutibilidade inter-dias. I_p vs. número de dias (n=10).....45
- Figura 26. Respostas de BIA-amperométrica para análise de ALA em amostra de suplemento dietético. Condições: Potencial de trabalho: + 0,9 V, volume de injeção: 100 μL , eletrólito: PBS 0, 1 mol L^{-1} (pH 7, 0). Inserido: curva de calibração obtida a partir das injeções de (a) 10, (b) 20, (c) 40, (d) 60, (e) 90, (f) 110, (g) 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de soluções padrões de ALA, S: amostra de ALA.....46
- Figura 27. Curva analítica obtida para o ALA empregando HPLC.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de I_p e E_p referentes a diferentes pH's na oxidação de ALA.	35
Tabela 2. Comparação das técnicas eletroquímicas para a determinação do ALA .	40
Tabela 3. Dados de adição e recuperação em amostra de ALA ($n = 4$) obtidos com eletrodo GP/ CoPc.....	41
Tabela 4. Determinação de ALA em amostra e urina sintética dopada com ALA ($n = 3$).....	46
Tabela 5. Efeito dos interferentes na determinação do ALA (1ALA: 10 interferente).	47
Tabela 6. Determinação de ALA em comprimidos de suplemento dietético.....	48
Tabela 7. Teste estatístico.....	49
Tabela 8. Comparação de diferentes sensores para a determinação de ALA	50

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Siglas e Abreviaturas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiv
1 Introdução	4
1.1 Antioxidantes	5
1.2 Ácido α -lipóico	6
1.3 Eletrodos Quimicamente Modificados	8
1.4 Sensores à base das metaftalocianinas	9
1.5 Técnicas Eletroquímicas	11
1.5.1 Voltametria Cíclica	11
1.5.2 Voltametria de Pulso Diferencial	12
1.5.3 Cronoamperometria	13
1.6 Análise por Injeção em Batelada	14
1.7 Determinações eletroquímicas de ácido α -lipóico	16
2 Objetivos	19
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
3 Parte Experimental	21
3.1 Reagentes e Soluções	22
3.2 Instrumentação	23
3.3 Célula eletroquímica e eletrodos	23
3.4 Pré-tratamento e modificação da superfície do eletrodo GP	24
3.5 Técnicas Eletroquímicas	24
3.6 Sistema BIA	24
3.6.1 Construção e montagem da célula de BIA	24
3.6.2 BIA com detecção amperométrica	25
3.7 Cromatografia líquida de alta eficiência	26
3.8 Aplicação em amostras de suplementos dietéticos	26
4 Resultados e Discussão	28

4.1 Perfis voltamétricos dos eletrodos CV e GP modificados com CoPc	29
4.2 Comportamento voltamétrico do ALA sobre o eletrodo GP/ CoPc.....	30
4.3 Efeito da velocidade de varredura de potencial sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de GP/ CoPc	31
4.4 Estudo do pH e do tampões.....	33
4.5 Voltametria cíclica de ALA.....	36
4.6 Análise cronoamperométrica de ALA.....	37
4.7 Voltametria de pulso diferencial de ALA.....	38
4.8 Comparações das técnicas eletroquímicas para determinação de ALA	39
4.9 Determinação de ALA em suplemento dietético por VPD.....	40
4.10 Análise por Injeção em Batelada com detecção amperométrica.....	41
4.10.1 Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade.....	43
4.10.2 Determinação de ALA em suplemento dietético e urina por BIA com detecção amperométrica.....	45
4.11 Validação do método analítico	47
4.11.1 Tratamento estatístico	48
4.12 Comparação das técnicas eletroquímicas com valores reportados na literatura para determinação de ALA.....	49
5 Conclusão	52
Referências	55

Capítulo 1 - Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antioxidantes

Com o aumento das patologias causadas por radicais livres torna-se cada vez mais importante o entendimento sobre os antioxidantes, que são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células [1].

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas) são condições essenciais para o funcionamento normal do organismo. Quando este equilíbrio tende para a produção de radicais livres dizemos que o organismo está em estresse oxidativo, e nessas situações os radicais livres em excesso podem oxidar e danificar a estrutura celular, inibindo a sua função normal e conduzindo a várias doenças [2].

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, ou ser provenientes da dieta alimentar e outras fontes [3] (Figura 1).

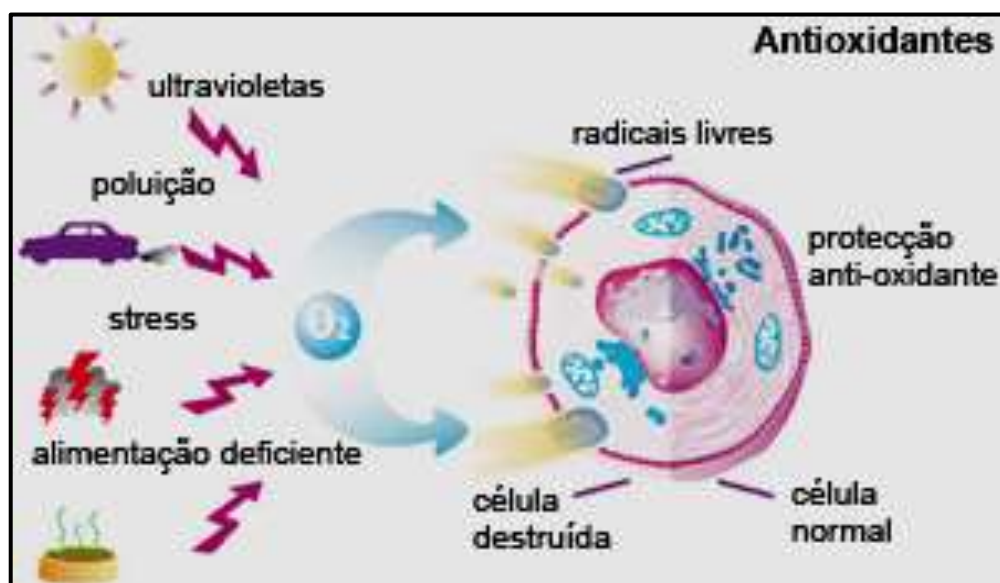


Figura 1. Ação dos radicais livres

Fonte: Oliveira, 2006.

Dentre os inúmeros antioxidantes existentes convém destacar o ácido α -lipóico (ALA), um poderoso antioxidante que vem se destacando nos últimos anos por suas propriedades químicas que atuam no tratamento de demências relacionado ao estresse oxidativo [4-6].

1.2 Ácido α -lipóico

O ácido α -lipóico (1,2-ditiolano-3-pentanóico), também conhecido como ácido tióico é um poderoso antioxidante que tem a propriedade de suprimir radicais livres [7]. Sua estrutura consiste em uma cadeia com 8 átomos de carbonos, com uma carboxila em uma das extremidades como grupo funcional e um anel ditiolano, com início no carbono 6, na outra extremidade. (Figura 2). Devido à presença de um átomo assimétrico de carbono em sua estrutura, o ALA é um composto opticamente ativo, dessa forma a molécula existe como dois enantiômeros: R-(+)- ácido lipóico ou S-(+)-ácido lipóico, como uma mistura racêmica R/S-ácido lipóico. No entanto, somente o R-(+)- ácido lipóico é capaz de participar das reações enzimáticas metabólicas tornando um cofator essencial em sistemas biológicos [8].

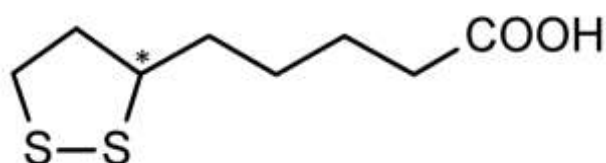


Figura 2. Estrutura molecular do ácido α - lipóico

Em sua forma lipoamida, funciona como um cofator para o complexo multienzimático que catalisa a descarboxilação oxidativa do α -cetoglutarato e α -cetoácidos em processo mitocondrial [9]. A capacidade antioxidante está relacionada ao agrupamento tiol que reagem diretamente com os radicais livres [10-11].

Na literatura, descreve vários possíveis efeitos terapêuticos, por exemplo, na prevenção dos efeitos do envelhecimento, no tratamento de doenças associadas com o estresse oxidativo, tais como: esclerose múltipla, doença de Alzheimer [4-7], também tem sido mostrado para ajudar no tratamento de danos nos nervos em doentes diabéticos, previne a neuropatia diabética e cardiopatia, dentre outras demências [12-15].

O ALA é encontrado em carnes vermelhas, espinafre, brócolis, batata, inhame, cenoura, beterraba, levedura de cerveja etc. [16]. Ele é utilizado em seres humanos pela via tópica, oral ou endovenosa. A via tópica é preferencialmente utilizada em dermatologia, com efeito antienvelhecimento de pele. Apesar do ALA não ter efeito tóxicos, a sua administração não deve exceder a dose recomendada de 200 - 300 mg/ dia para efeito antioxidante e de 400 - 600 mg/ dia para tratamento de diabete. Uma overdose pode causar ansiedade, fadiga e convulsão [17].

O ALA e sua forma reduzida são considerados como antioxidantes universais, pois são ativos em meio aquoso e em meio lipídico [10-13]. Além disso, suas propriedades incluem a capacidade de quelar metais e reter espécies reativas ao oxigênio, regenerar antioxidantes endógenos, além da participação no reparo de sistemas do corpo humano [18-19].

Vários métodos analíticos são descritos na literatura para a determinação de ALA, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-ECD) [20], de detecção de quimioluminescência (CL) [21], cromatografia acoplada à espectrometria de massa (MS) [22], eletroforese capilar [23] e as técnicas eletroquímicas [24-25].

Atualmente, estas técnicas mencionadas são utilizadas como ferramentas analíticas para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas,

principalmente as cromatográficas, pois apresentam elevada exatidão, boa detectabilidade e confiabilidade. Embora, as técnicas cromatográficas preferencialmente sejam utilizadas no controle de qualidade, estas incluem várias desvantagens, tais como: alto custo do equipamento e manutenção, consumo de reagentes orgânicos com elevado grau de pureza e geração significativa de resíduos [26]. Em muitos casos, por exemplo, formulações farmacêuticas contendo apenas um único componente ativo, as técnicas de separação são desnecessárias desde que os excipientes presente na matriz não sejam um interferente na resposta analítica [27].

Assim, as detecções eletroquímicas surgem como métodos promissores, pelo fato de ser menos trabalhosa e apresentam vantagens tais como: simplicidade, redução do tempo de análise, baixo custo e seletividade em análises laboratoriais de rotina e em muitas das vezes em escala industrial [24,27].

1.3 Eletrodos Quimicamente Modificados

O termo Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM's) surgiu em meados dos anos 1970, identificando assim, um conjunto de dispositivos que possuíam espécies quimicamente ativas imobilizadas na sua superfície [28]. A variedade de materiais e possibilidades de combiná-los proporciona um grande campo de atuação destes dispositivos, tendo assim, vários fins e aplicações, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas até a transferência de elétrons em moléculas [29-33].

Em processos eletrocatalíticos onde a oxidação ou redução de uma molécula reagente envolve uma cinética de transferência de elétrons lenta na superfície do eletrodo, a modificação química do eletrodo pode acelerar a troca de

elétrons entre o eletrodo e a espécie envolvida e até mesmo, antecipar o início da reação, reduzindo o sobrepotencial de ativação [34-35].

A habilidade de manipular as propriedades dos EQM's pode levar a uma variedade de efeitos interessantes, dentre os quais se destacam a eletrocatalise, a prevenção de envenenamento da superfície e seletividade dos eletrodos [36].

Vários são os métodos utilizados para a introdução de um agente modificador sobre o eletrodo base, como exemplo, destaca-se a adsorção irreversível que é uma maneira de incorporação simples e rápida de compostos em uma ampla gama de eletrodo base [37], também é um processo de equilíbrio, o que pode levar à ocorrência de dessorção do modificador para o meio durante sua utilização [38].

1.4 Sensores à base das metaftalocianinas (MPc)

As ftalocianinas (do grego *ftalo* = óleo de rocha, *cianina* = azul), são compostos artificiais que foram acidentalmente descobertas no ano de 1907 por Brawn e Tcherniac, como sendo um subproduto na síntese da o-cianobenzamida [39]. Por volta de 1930, Linstead e Robertson, determinaram a estrutura das metaftalocianinas, um sistema altamente conjugado que consistia em 4 unidades de isoindol [40-41]. Esse sistema (Figura 3) possui uma alta densidade eletrônica devido aos seus 18 elétrons π do anel macrocíclico que são responsáveis pelas características espectroscópicas deste composto, o que confere suas propriedades eletrônicas [42].

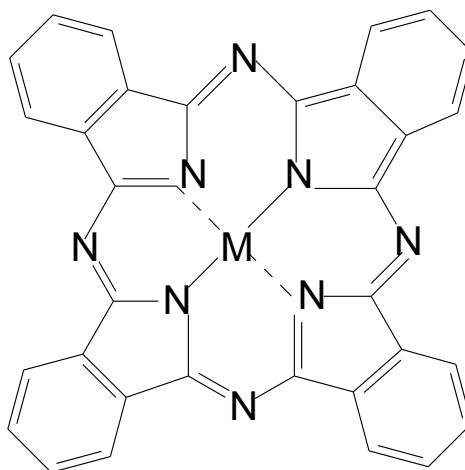


Figura 3. Estrutura de uma metaloftalocianina (MPc)

A utilização das metaloftalocianinas tem sido expandida em muitas áreas como desenvolvimentos de sensores e biossensores químicos, polímeros condutores, também são usados como corantes e tintas. Possui propriedades físicas e químicas particulares, com altas estabilidades térmica e química, não toxicidade, atividade redox bem definida e o caráter semicondutor predominante nessas moléculas [43-45].

As metaloftalocianinas são compostos geralmente estáveis e apresentam estruturas similares às porfirinas de origem natural, que se adsorvem muito fortemente sobre as superfícies de carbono e grafite em níveis de monocamadas [46-47]. A imobilização deste material no eletrodo base exibe atividade eletrocatalítica para uma grande variedade de reações eletroquímicas de interesse prático, como as reações e redução de oxigênio e peróxido de hidrogênio [48], oxidações de mercaptanas [49], hidrazina [50], íons nitrito e óxido nítrico [51]. Estudos realizados com a classe ftalocianina de cobalto (CoPc), (Figura 4) como agente modificante proporciona boa sensibilidade e baixo tempo de resposta [52], devido à atividade catalítica está correlacionada com a densidade de elétrons

localizados no metal central [47] e com o potencial dos pares redox correspondente da molécula [48].

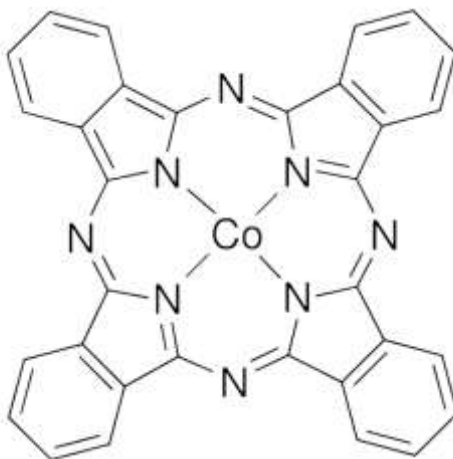


Figura 4. Estrutura da ftalocianina de cobalto

1.5 Técnicas Eletroquímicas

1.5.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica que consiste no registro de uma corrente elétrica, que passa no eletrodo de trabalho, imerso em uma solução do composto de interesse, quando neste é aplicado um potencial que varia continuamente com o tempo a uma velocidade constante. A variação deste potencial conduz à ocorrência de reações de oxidação ou redução das espécies eletroativas presentes na solução. Esta técnica mostra-se particularmente eficiente quando se deseja conhecer a eletroatividade de compostos, investigar reações químicas acopladas e estudar a superfície do eletrodo, fornecendo também informações a respeito da reversibilidade [36].

No uso desta técnica usa-se uma célula eletroquímica, geralmente com 3 eletrodos: trabalho, referência, que permite o monitoramento do potencial do eletrodo de trabalho e o auxiliar que são imersos em uma solução eletrolítica controlados por um potenciostato (Figura 5). O método consiste em aplicar ao eletrodo de trabalho um potencial que varia continuamente com o tempo, levando à ocorrência de reações de oxidação e/ou redução de espécies eletroativas na solução e a produção de corrente capacitiva, resultante do carregamento da dupla camada elétrica [53-54]. Os principais parâmetros de interesse em um voltamograma cíclico são: potencial de pico anódico (E_{pa}), potencial de pico catódico (E_{pc}) e as correntes de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}).

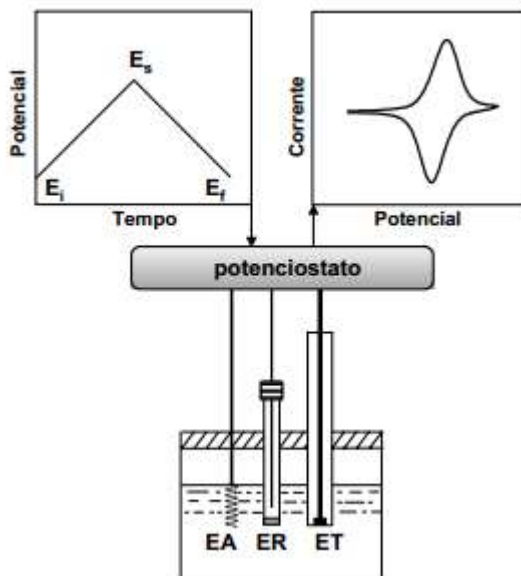


Figura 5. Representação esquemática do experimento de VC: E_i : Potencial inicial; E_f : Potencial final; E_s : Potencial de inversão; EA: Eletrodo auxiliar; ER: Eletrodo referência e ET: eletrodo de trabalho.

1.5.2 Voltametria de Pulso Diferencial

Na voltametria de pulso diferencial (VPD), pulsos de amplitudes fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. A corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (I_1) e outra no final (I_2). (Figura 6). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, a fim de fazer a correção da corrente capacitiva, pois, à medida que se

aplica o pulso, ocorre um acréscimo da contribuição da corrente capacitiva e da corrente faradaica [53,55]. Cabe ressaltar que apenas a corrente faradaica é proporcional à concentração do analito. A diferença das correntes é plotada versus o potencial aplicado. O voltamograma é de forma gaussiana, cuja área do pico é diretamente proporcional à concentração do analito.

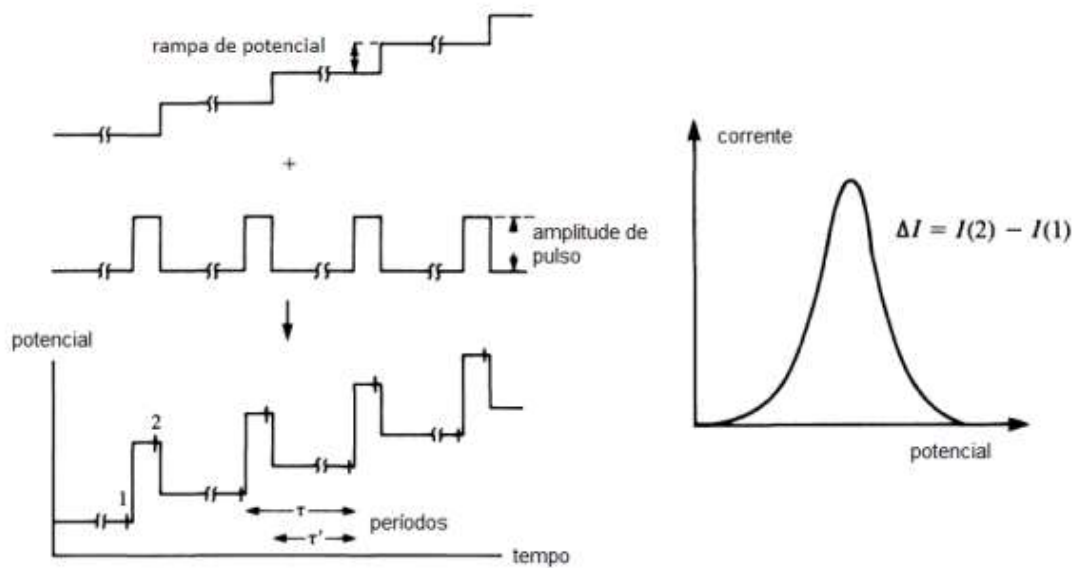


Figura 6. Esquema de aplicação de potenciais por voltametria de pulso diferencial

1.5.3 Cronoamperometria

A cronoamperometria é uma técnica usada em eletrocatalise, com o objetivo de estabelecer se o sistema atinge um estado estacionário, e o valor da corrente para esse estado. Na cronoamperometria, varia-se o potencial do eletrodo de trabalho, potencial onde não ocorre a reação faradaica, até um valor de potencial E , onde na superfície do eletrodo ocorre a reação de transferência de carga das espécies eletroativas. Este potencial E pode ser mantido até o final da experiência, ou no caso de um experimento de cronoamperometria de degrau duplo de potencial,

um valor E pode ser obtido por nova aplicação de um degrau de potencial após ter decorrido um tempo t da aplicação de potencial inicial [53].

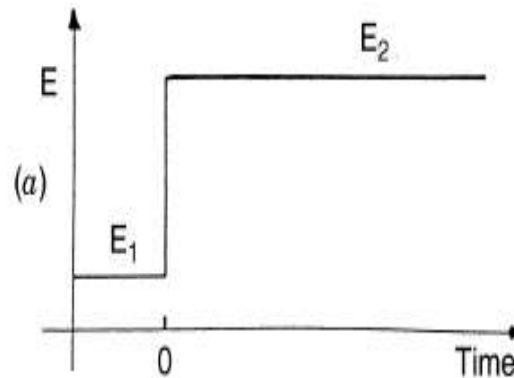


Figura 7. Experimento cronoamperométrico

1.6 Análise por Injeção em Batelada

A demanda crescente por análises rápidas de um grande número de amostras tem resultado no desenvolvimento de sistemas de análise com alta velocidade e boa precisão. Assim, neste campo destaca-se a Análise por Injeção em Batelada (BIA – *Batch Injection Analysis*) que foi apresentada pela primeira vez por Wang e Taha [57]. Esta técnica analítica é baseada na injeção de pequenos volumes do analito na superfície de um detector fixado em uma pequena distância a partir da ponta de uma ponteira [58].

Em BIA, volumes pequenos do analito são injetados, com o auxílio de uma micropipeta. A passagem do analito sobre a superfície do sensor resulta em sinais transientes semelhantes aos obtidos em Análise por Injeção em Fluxo (FIA).

Os métodos analíticos empregando detectores amperométricos acoplados a sistemas BIA apresentam tais características: simplicidade, rapidez, eficiência, seletividade, baixo custo e baixo consumo de reagente, alta frequência analítica, sendo de grande interesse em laboratório de controle de qualidade [59]. Em

comparação aos métodos analíticos que empregam o sistema FIA, os métodos que empregam BIA têm como vantagens adicionais a eliminação de problemas típicos relacionados às válvulas e bombas do sistema FIA, a eliminação a solução transportadora de reagente e a possibilidade do desenvolvimento de métodos analíticos com características portáteis [60].

Os conceitos BIA podem ser explicados como apresentado na Figura 8. Tal sistema consiste em uma célula eletroquímica construída em acrílico. O eletrodo de trabalho (A) é invertido de sua posição usual, sendo fixado através de um orifício aberto na base da célula. Uma micropipeta (B) é acomodada em outro orifício localizado na tampa da célula, em oposição ao eletrodo de trabalho. Nas duas outras aberturas feitas na tampa são ajustados os eletrodos de referência (C) e auxiliar (D). Um quarto orifício (E) é usado para a introdução do eletrólito suporte, mantido sob agitação (F). Um dreno (G) adaptado próximo à base da célula [61].

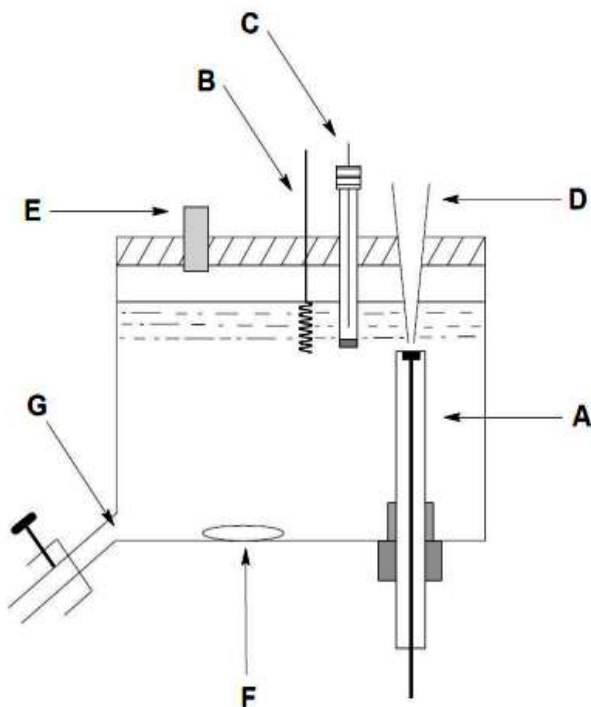


Figura 8. Esquema da célula de BIA [57]: A) Eletrodo de trabalho, B) Eletrodo auxiliar, C) Eletrodo de referência, D) Micropipeta, E) Orifício para preenchimento da tampa, F) Barra de agitação G) Dreno.

Quando a amostra é injetada, forma uma zona que dispersa a caminho do detector, com transporte reprodutível e dispersão controlada em tempo e espaço [54]. A resposta tem forma de pico transiente, seguindo de uma rápida de sinal até a linha de base. A magnitude do sinal é proporcional à concentração do analito.

Dois fatores contribuem para o sucesso desta técnica que são o princípio hidrodinâmico da superfície *wall-jet* e a alta diluição da amostra. As primeiras células possuía capacidade para grandes volumes (250 - 700 mL) assegurando desta forma, alta diluição das amostras injetadas em microlitros [58]. Isto é vantajoso, porque evita desperdício de reagente. Dentre os parâmetros que influenciam a resposta BIA destaca a distância entre eletrodo-ponteira. Segundo a literatura, para distâncias muito curtas, a corrente é pequena, recomenda-se uma distância de aproximadamente 2 mm. Acima deste valor, o sinal de corrente volta a diminuir [62]. Tal fenômeno pode ser explicado de forma semelhante à hidrodinâmica *wall-jet*: efeitos retornos, que são atribuídos a emprego de distâncias pequenas, em distâncias grandes, ocorre um aumento da dispersão da zona de amostra.

1.7 Determinações eletroquímicas de ácido α -lipóico

Poucos trabalhos têm sido publicados na literatura sobre a determinação de ALA utilizando técnicas eletroquímicas. As primeiras quantificações voltamétricas foram realizadas indiretamente com eletrodo de mercúrio e pasta de carbono. No primeiro estudo [63], a onda catalítica de hidrogênio gerada na presença de cobalto (II) foi relacionada com a concentração de ALA. Em outra, a oxidação do cobre reduzido na presença de ALA foi relacionada com a sua concentração [64]. Eletrodo de pasta de carbono contendo complexo Ni(II)-ciclohexabutirato também foi explorado para quantificação de ALA [65]. Os três estudos envolveu uma etapa de

pré-concentração e os limites de detecções em todos os três estudos foram situados na região de nanomolar. A determinação direta do ALA em carbono vítreo foi relatado por Ziyatdinova *et al.* [66], que determinou ALA utilizando eletrodo de carbono vítreo (CV) em solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, com a técnica de voltametria de varredura linear. Um pico anódico irreversível bem definido foi observado em $0,72 \text{ V vs. ECS}$, a faixa linear obtida foi de $1,15 \times 10^{-5}$ a $1,73 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de detecção (LD) foi de $5,75 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O método proposto não foi aplicado em amostras reais.

Brett e colaboradores [27], empregaram eletrodo de carbono vítreo na determinação de ALA em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,9, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. O eletrodo CV apresentou uma faixa de resposta linear variando entre $1,0 \times 10^{-6}$ a $7,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0,9997$), LD de $1,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de quantificação (LQ) de $6,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Estudos com eletrodos de carbono modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas [67], foram também realizados para determinação de ALA, os experimentos foram realizados em uma solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de voltametria de varredura linear com velocidade de 25 mV s^{-1} . A faixa linear foi de $2,6 \times 10^{-5}$ a $1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e o LD foi de $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Miranda e colaboradores [24] utilizaram um eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) para a determinação de ALA em amostra farmacêutica e em suplemento dietético. A técnica empregada foi a de voltametria de onda quadrada, o eletrólito foi H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0. Sob as condições otimizadas uma faixa de resposta linear de $5,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi obtida com o LD de $3,68 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Em todos estes estudos, os limites de detecção foram situados em região de 10^{-5} a $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Estes valores de LD estão longe dos obtidos quanto aos

eletrodos de mercúrio e de pasta de carbono modificado com um complexo de Ni que foram exploradas na região de 10^{-9} mol L⁻¹ [63-65].

Várias aplicações são descritas sobre a combinação de BIA com outras técnicas, demonstrando a sua potencialidade para o uso da Química Analítica [61]. Até o presente momento, na literatura não há nenhum trabalho relacionado à determinação de ALA empregando técnica BIA. Haja vista que, BIA acoplada a amperometria apresenta ser muito atraente para uso de sensores que podem ser adaptados a uma variedade de reações químicas.

No presente estudo, o eletrodo de grafite pirolítico modificado com ftalocianina de cobalto foi explorado para a quantificação direta de ALA em suplemento dietético usando técnicas eletroquímicas e análise em injeção em batelada.

Capítulo 2 - Objetivos

2 Objetivos

2.1 Geral

- Desenvolver uma metodologia para quantificação de ácido α -lipóico empregando técnicas eletroquímicas e análise por injeção em batelada.

2.2 Específicos

- Estudo das respostas eletroquímicas do eletrodo de GP liso e modificado na ausência e presença de ALA;
- Estudo das melhores condições analíticas e parâmetros experimentais utilizando as técnicas eletroquímicas: voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e cronoamperometria na determinação de ALA;
- Aplicação da melhor técnica na determinação de ALA em suplemento dietético;
- Desenvolvimento de uma cela de BIA com detecção amperométrica, para acomodar o eletrodo GP/ GoPc e montagem do sistema;
- Realização do estudo das propriedades redox e verificação da resposta por voltametria hidrodinâmica do eletrodo GP e GP/ CoPc na presença de ALA;
- Aplicação em amostras reais em suplemento dietético e em urina sintética pelo sistema BIA;
- Validação do método proposto pela técnica de HPLC, segundo as recomendações da Farmacopeia dos Estados Unidos.

Capítulo 3 – Parte Experimental

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade > 18 MΩ cm), utilizando um sistema Human Up® 900 com lâmpada UV de comprimento de onda de 185/ 245 nm. Os reagentes utilizados estão descritos de acordo com os procedimentos a seguir.

Nos testes de eletroatividade do ALA, foram usadas as seguintes soluções: a) Tampão de fosfato (PBS) (pH 7, 0), preparada pela mistura da solução de fosfato de sódio monobásico (0, 1 mol L⁻¹) com sais de di-hidrogenofosfato de sódio (0, 1 mol L⁻¹), b) Tampão Britton-Robinson (BR), formados pela mistura da solução de ácido acético (0, 1 mol L⁻¹), ácido fosfórico (0, 1 mol L⁻¹) e ácido bórico (0, 1 mol L⁻¹), seguidos pela adição de alíquotas de solução de NaOH 2, 0 mol L⁻¹ para ajustar o pH de modo a obter valores de pH de 2, 0, 3, 0, 5, 0, 7, 0, 8, 0, 10, 0 e 12, 0; c) Tampão McIlvaine (pH 7, 0), preparado pela mistura de 0, 1 mol L⁻¹ di-hidrogenofosfato de sódio e ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹; d) Tampão Sørensen 0, 1 mol L⁻¹ (pH 7, 0), obtido pela mistura da solução di-hidrogenofosfato de sódio (0, 066 mol L⁻¹) com uma solução de di-hidrogenofosfato de potássio (0, 066 mol L⁻¹). Todos os sais utilizados para preparar estas soluções tampão foram adquiridos da Merck. Os tampões foram preparados de acordo com os procedimentos descritos na literatura [68].

As soluções de ALA 1×10^{-3} mol L⁻¹ (Sigma - Aldrich) foram preparadas em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). A solução de ftalocianina de cobalto (CoPc) 1×10^{-4} mol L⁻¹ (Sigma - Aldrich) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck).

3.2 Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato micro Autolab-tipo II (Eco Chemie) acoplado a um microcomputador dotado de uma interface GPES (General Purpose Electrochemical System). Para ajustes do pH's das soluções tampão foi utilizado um medidor de pH Analyser 300. Um sistema de banho ultrassom da Unique® USC-1400 foi utilizado para remoção de possíveis partículas provenientes do processo de polimento que ficam impregnadas na superfície do eletrodo.

3.3 Célula eletroquímica e eletrodos

O sistema utilizado foi constituído por uma célula eletroquímica convencional com três eletrodos (Figura 9). O eletrodo GP/ CoPc, com área geométrica de 0, 2 cm² foi utilizado como eletrodo de trabalho. Os eletrodos de referência e auxiliar foram Ag/ AgCl e platina, respectivamente.

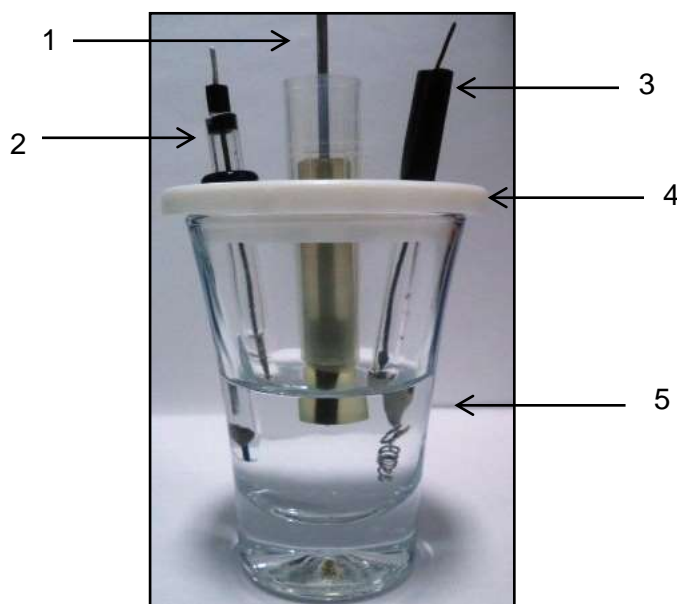


Figura 9. Célula eletroquímica: (1) Eletrodo de trabalho; (2) Eletrodo de referência; (3) Eletrodo auxiliar; (4) Tampa de Teflon®; (5) Corpo da célula.

3.4 Pré-tratamento e modificação da superfície do eletrodo GP

Antes da modificação, o eletrodo GP foi submetido a um polimento manual em lixa de carbeto de silício de granulação 2000. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água deionizada, e, posteriormente, sonificado no banho ultrassom por dois minutos, para remover as impurezas da superfície do eletrodo. O eletrodo GP foi modificado pelo método de adsorção irreversível [52], ficando imerso em uma solução CoPc-DMSO, em agitação durante 20 minutos. Em seguida, o eletrodo modificado foi removido da solução, lavado com água deionizada e imerso na solução eletrolítica, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

3.5 Técnicas Eletroquímicas

Para a escolha da melhor técnica eletroanalítica foram otimizados os parâmetros experimentais e operacionais das medidas realizadas para as técnicas de VC, VPD e cronoamperometria. Em seguida, as curvas analíticas foram obtidas e comparadas os resultados, a técnica que apresentou melhor sensibilidade foi utilizada para os estudos posteriores.

3.6 Sistema BIA

3.6.1 Construção e montagem da célula de BIA

A célula de fluxo foi construída com Plexiglass e a tampa de Teflon, com volume interno de 30 mL (Figura 10). A base da célula foi constituída de um orifício de 7,0 mm de diâmetro, onde foi posicionado o eletrodo de trabalho, sendo firmemente fixado, a fim de evitar vazamentos. Na tampa foram feitos orifícios para eletrodos de referência e auxiliar. Também foi perfurado de maneira a obter um orifício com forma cônica, para acomodar a ponteira da micropipeta. No corpo da

célula foi feito um orifício lateral numa altura apropriada, por onde era drenado o excesso do eletrólito. O volume do eletrólito suporte foi de 30 mL.

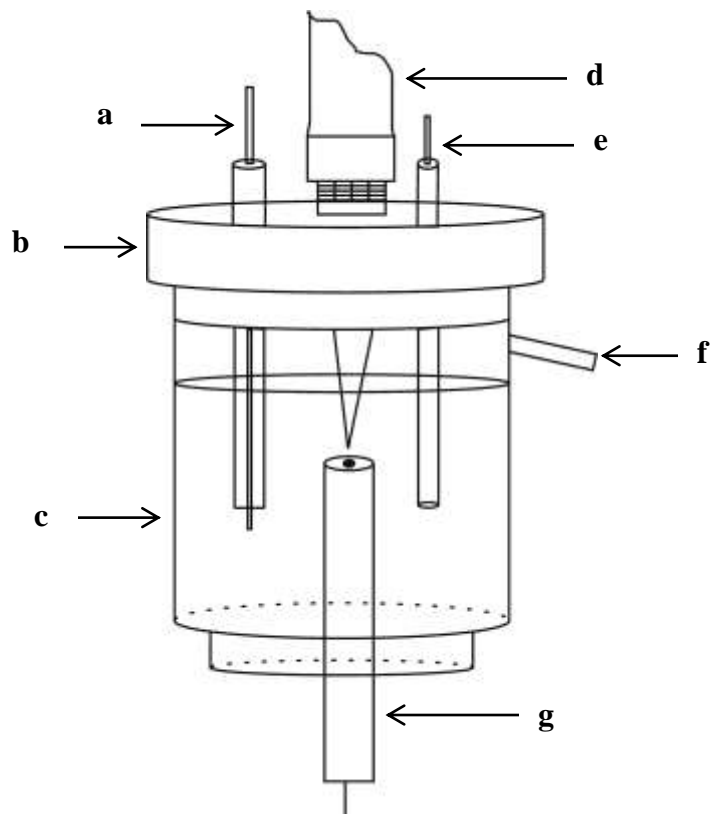


Figura 10. Detalhes da célula de BIA empregada neste estudo: (a) Eletrodo auxiliar, (b) Tampa da célula (Teflon), (c) Corpo da célula, (d) Micropipeta motorizada, (e) Eletrodo de referência, (f) Dreno, (g) Eletrodo de trabalho. (volume: 30 mL).

Uma micropipeta eletrônica EDP Plus EP-100 da Rainin Instrument foi utilizada para fazer as injeções. Esta pipeta permite efetuar injeções de volumes que variam entre 10 e 100 μL .

3.6.2 BIA com detecção amperométrica

Com o eletrodo de trabalho previamente modificado, o sistema foi montado e um potencial constante apropriado, aplicado. O eletrodo assim permanecia, durante um determinado período de tempo, suficiente para obtenção de uma corrente de valor muito baixo e praticamente constante. A seguir, os picos

relacionados à resposta analítica eram registrados, após efetuar injeções de soluções padrões e de amostra de ALA, em várias concentrações.

As condições experimentais empregados por BIA para sensor estudado foram: potencial aplicado +0,9 V, distância do eletrodo para ponteira de 2,0 mm, volume de injeção de 100 μL e vazão de 75 $\mu\text{L s}^{-1}$.

3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A técnica mais comumente utilizada para a determinação do ALA é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Assim sendo, medidas cromatográficas foram realizadas usando a metodologia U. S. Pharmacopeia [69]. Foi usado um cromatógrafo líquido da Shimadzu Corporation (Japão), modelo LC-6A com detector UV/ VIS de 220 nm, interfaceado ao software LabView.

A coluna C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μm) foi utilizada. A fase móvel foi preparada por uma mistura filtrada e degaseificada de ácido fosfórico 0,025 mol L⁻¹ e acetonitrila (62 : 38), vazão de 1,0 mL/ min, volume da injeção de 50 μL . A solução padrão foi realizada dissolvendo uma quantidade de ALA em acetonitrila. E diluída, quantitativamente, em acetonitrila para se obter uma solução com uma concentração de 0,05 mg / mL.

Uma curva de calibração foi construída utilizando a solução padrão antes de analisar a amostra farmacêutica e urina. Os dados obtidos com este método foram utilizados para comparar os dados obtidos com as análises voltamétricas e BIA amperométrica.

3.8 Aplicação em amostras de suplementos alimentares

As amostras de ALA foram obtidas a partir de comprimidos comerciais contendo 300 mg de ALA (MRN - Metabolic Response Modifiers®, EUA). Na

preparação da amostra, foram macerados 3 comprimidos até a obtenção de um pó fino e diluído em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7, 0) e filtrado com papel filtro qualitativo (porosidade 3 micras).

As curvas analíticas para determinação de ALA em amostra farmacêutica e urina sintética foram obtidas pelo método de adição de padrão. Para realização das curvas de recuperações, uma quantidade conhecida de ALA foi adicionada ao eletrólito suporte, e a seguir, a concentração de ALA foi determinada pelo método de adição de padrão. As curvas analíticas de BIA foram construídas a partir de uma série de injeções com alíquotas de 100 µL de solução padrão de ALA. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

Com o objetivo de avaliar o desempenho do sistema em análise de fluidos biológicos foi empregada uma urina sintética adicionada do analito. Optou-se por trabalhar com urina sintética em virtude de sua fácil preparação e inexistência de riscos de contaminação do sistema, do laboratório e do analista. Sua preparação foi de acordo com Laube *et al.* [70]. Assim, 0, 73 g de NaCl, 0, 40 g de KCl, 0, 28 g de CaCl₂.2H₂O, 0, 56 g de Na₂SO₄, 0, 35 g de KH₂PO₄, 0, 25 g de NH₄Cl e 6, 25 g de uréia foram adicionados em um balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com água. A amostra de urina sintética foi utilizada imediatamente após a sua preparação e dopada com 60 µmol L⁻¹ de ALA.

Nos ensaios cromatográficos, a solução padrão de ALA foi preparada conforme a Farmacopeia Americana [69], por uma mistura de acetonitrila e água (1:1) a fim de se obter uma solução com concentração conhecida de 1, 0 mg/ mL. Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 50 mL, diluindo até obter uma solução a cerca de 0, 02 mg/ mL de ALA.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfis voltamétricos dos eletrodos CV e GP modificados com CoPc

Este estudo tem por objetivo avaliar o comportamento dos perfis dos eletrodos CV e GP modificados com CoPc por método de adsorção irreversível. As propriedades adsortivas e redox dos eletrodos CV e GP foram analisadas através da modificação do eletrodo com a solução de CoPc ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

A Figura 11 mostra voltamogramas cíclicos obtidos por eletrodos sem modificações de CV (A) e GP (C). Após as modificações dos mesmos, o eletrodo CV/ CoPc (B) não apresentou nenhum par de pico redox diferentemente do comportamento do eletrodo GP/ CoPc (D) que apresentou um par de pico bem definido no potencial +0,60 V.

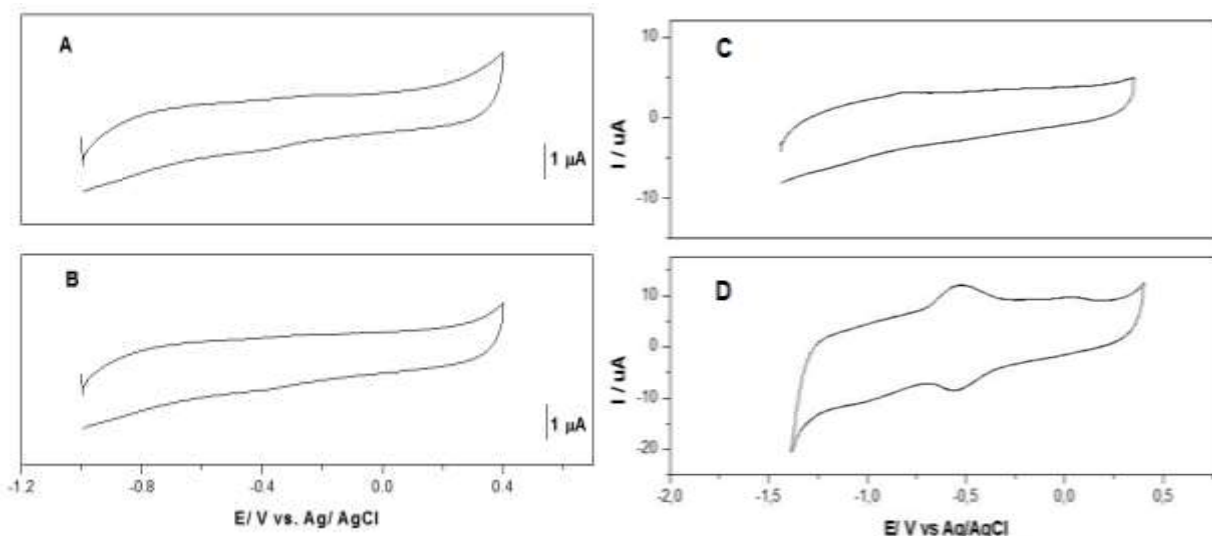


Figura 11. Voltamogramas cíclicos em NaOH 0,1 mol L⁻¹, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, saturada com N₂: A) Eletrodo CV, B) Eletrodo CV/ CoPc:, C) Eletrodo GP, D) Eletrodo GP/ CoPc.

Esses picos intensos são atribuídos à presença do centro metálico e está associado com processo redox envolvendo CoPc (II) Pc / Co (I) [43-45]. A possível explicação da ausência do pico no eletrodo CV/ CoPc pode estar em sua forma

monolítica [71]. Haja vista que, os carbonos poliméricos, com estrutura básica similar à do grafite (Figura 12), podem apresentar-se como adsorventes poderosos, com uma grande superfície interna (carvão ativado) ou impermeável, na forma de carbono vítreo monolítico.

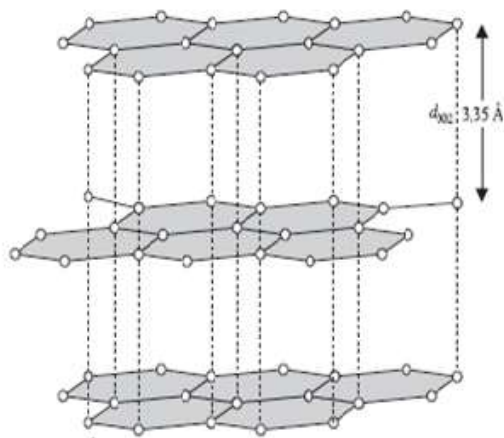


Figura 12 - Arranjo cristalino característico dos materiais carbonosos gráfiticos.

4.2 Comportamento voltamétrico do ALA sobre o eletrodo GP/ CoPc

Estudos preliminares envolvendo o comportamento voltamétrico de ALA foram realizados em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7, 0) e a uma velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} . A Figura 13 mostra voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato (A) e na presença de ALA ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em eletrodo GP (B) e eletrodo GP/ CoPc na presença de ALA ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) (C). No eletrodo GP, somente na presença de PBS, nenhum sinal voltamétrico foi registrado na faixa de +0,45 a +1,0 V (vs. Ag/AgCl), (Figura 13A). Após a adição de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA em PBS (pH = 7,0), o eletrodo não modificado GP, apresentou um pico anódico em +0,83 V (Figura 13B). A melhor resposta foi obtida com eletrodo GP modificado com CoPc, como pode ser visto na Figura 13C. Comparando com o eletrodo GP, o eletrodo modificado apresenta maior corrente de pico (1,83 vezes) e também inicia o processo de oxidação do ALA antes cerca de 100 mV. Enquanto isso, o pico máximo de corrente aparece quase no mesmo potencial (+0,84 V), como o que foi registrado com

eletrodo GP. Estes resultados sugerem que CoPc apresenta propriedades eletrocatalíticas no processo oxidativo deste composto. O processo de oxidação de ALA é caracterizado como um processo irreversível, conforme a literatura [27, 63, 66].

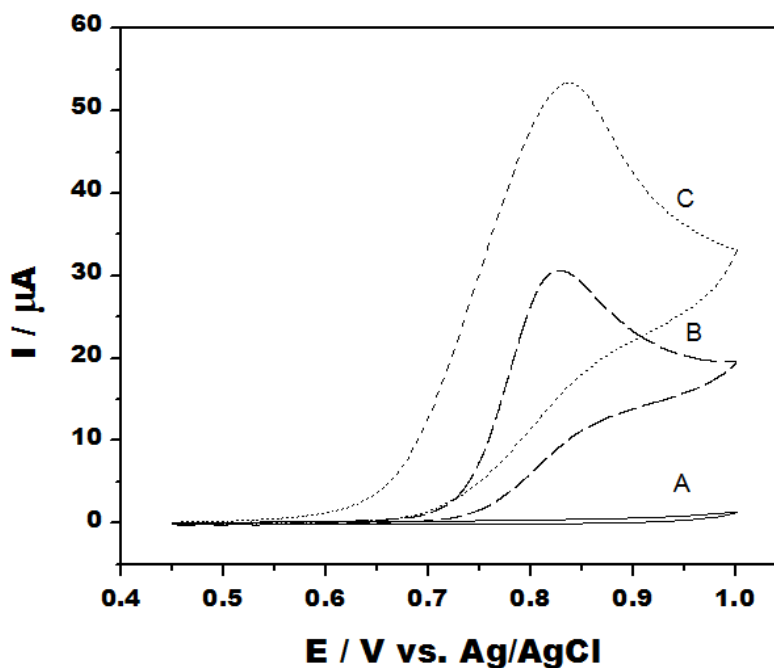


Figura 13. Voltamogramas cíclicos em tampão fosfato (pH 7, 0): (A) branco em GP, (B) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA em GP liso e (C) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA em GP/CoPc, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

4.3 Efeito da velocidade de varredura de potencial sobre a resposta voltamétrica do eletrodo GP/CoPc

Os voltamogramas cíclicos foram registrados em diferentes velocidades de varredura, variando de 10 a 200 mV s^{-1} (Figura. 14A), mostraram que as intensidades de corrente do pico anódico variam de forma linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 14B), o que é característico de um processo irreversível controlado por difusão.

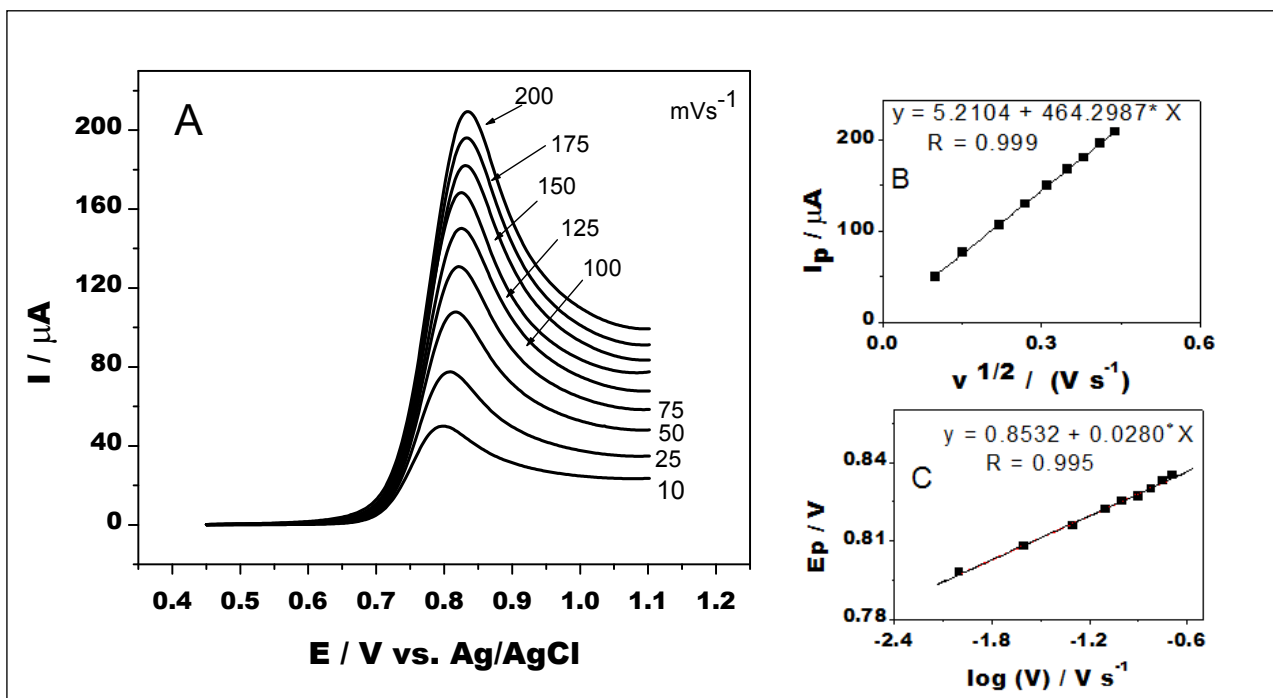


Figura 14. Voltamogramas cíclicos de ALA $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS (pH 7, 0) em eletrodo GP/ CoPc em diferentes velocidade de varredura: 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mV s^{-1} . (B) Variação linear de I_p vs. $V^{1/2}$. (C) Variação linear de E_p vs. $\log(V)$.

Assim, a dependência da corrente de pico com $v^{1/2}$ pode ser expressa pela seguinte equação [36].

$$I_p = 2.99 \times 10^5 n(\alpha n_0)^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad (1)$$

Onde C_0 é a concentração do analito (mol cm^{-3}), D_0 representa o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), o valor do coeficiente de difusão do ALA em solução aquosa é de $1,1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [27]. A é a área geométrica do eletrodo (cm^2), n o número total de elétrons envolvidos no processo de oxidação de ALA, n_0 refere-se ao número de elétrons envolvidos na etapa determinante da velocidade e α o coeficiente de transferência de elétrons, que pode ser determinada pela dependência linear do pico de potencial E_p com o logaritmo da velocidade de varredura do potencial, de acordo com: [43]

$$E_p = k + \left[\frac{0.03}{\alpha n_0} \right] \log v^{[10]} \quad (2)$$

Onde K é uma constante. A partir das equações 1 e 2 e das inclinações extraídas das figuras 14B e 14C, o valor de $n \approx 2$ foi calculado, o que indica provavelmente que a eletroxidação de ALA conduz à formação do ácido β -lipóico como o principal produto da reação (Esquema 2), como já foi sugerido na literatura [22, 66].

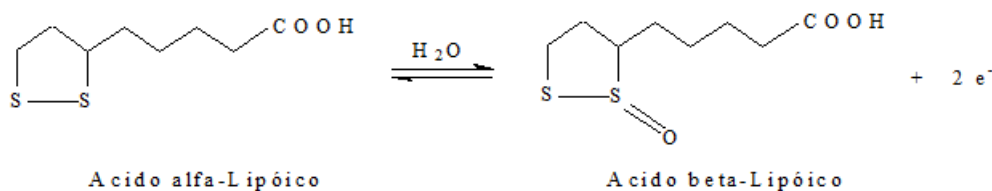


Figura 15. Representação esquemática da eletroxidação do ALA

4.4 Estudo do pH e do tampões

O valor do pH no eletrólito de suporte pode afetar a resposta eletroquímica para ALA e, assim, influenciar a sua quantificação. Assim, o estudo de pH foi realizado usando tampão Britton-Robinson (BR) como eletrólito suporte, com valores de pH's variando de 2,0 a 12,0 (Figura 16).

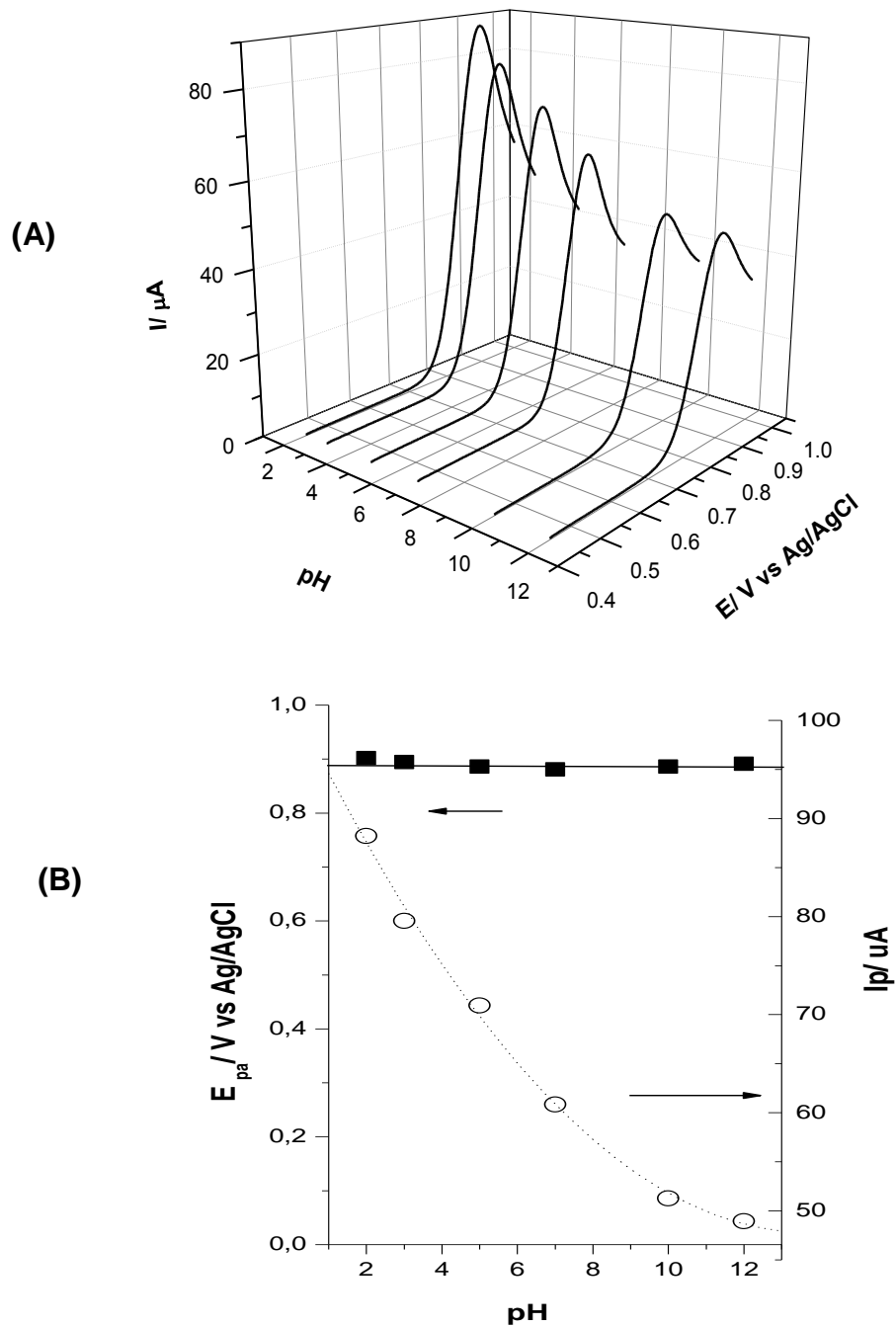


Figura 16. (A) Voltamograma de varredura linear sobre o eletrodo GP/ CoPc em tampão BR em diferentes pH's contendo $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ALA. $v = 50$ mV s⁻¹ (B) Gráfico da variação de I_p e E_p vs. pH.

Embora tenha sido observado um aumento do sinal na região ácida, o pH 7,0 foi adotada neste estudo uma vez que tal valor é próximo ao pH fisiológico, sendo importante este valor de pH em aplicações de amostras de interesse

farmacológico. Além disso, foi realizado o estudo dos tampões, respostas voltamétricas foram registradas em diferentes tampões em 0, 1 mol L⁻¹ (pH 7, 0): Mcllvaine, Sörensen, BR e PBS (Figura 17) indicaram que a melhor resposta do eletrodo GP/ CoPc para oxidação de ALA foi o PBS, este foi escolhido para dar prosseguimento aos novos experimentos.

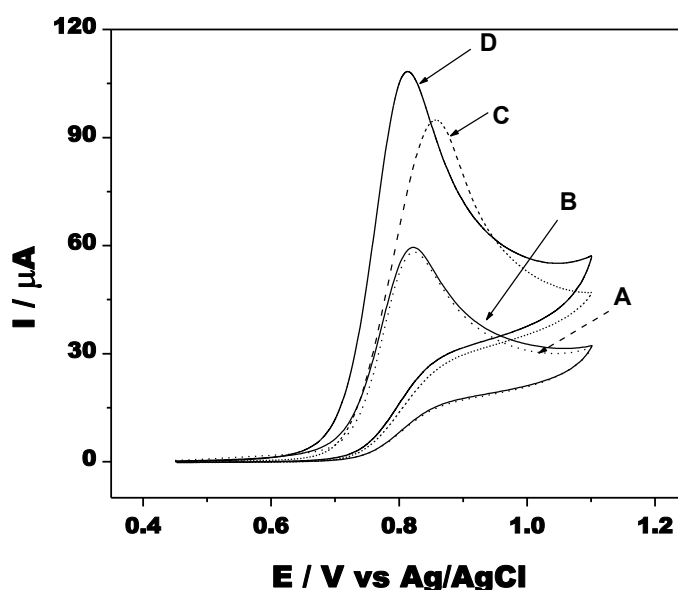


Figura 17. Voltamogramas cíclicos de ALA 1×10^{-3} mol L⁻¹ com eletrodo GP/ CoPc em diferentes tampões: (A) Mcllvaine, (B) Sörensen, (C) BR e (D) PBS. $v = 50$ mV s⁻¹

No gráfico da variação do pico de corrente com pH, (Figura 16B) mostra que a máxima corrente de pico é meio ácido e que a corrente de pico diminui com o aumento do pH, sendo concordante com a literatura [27]. Na tabela 1, mostra os valores de corrente referentes aos pH's.

Tabela 1. Valores de i_p e E_p referentes a diferentes pH's na oxidação de ALA.

pH	$i_p / \mu A$	E_p (V)
2, 0	88, 22	0, 90
3, 0	79, 57	0, 89
5, 0	70, 92	0, 88
7, 0	60, 83	0, 88
10, 0	51, 27	0, 88
12, 0	48, 93	0, 89

4.5 Voltametria Cíclica de ALA

Após estabelecer as condições analíticas otimizadas para a detecção voltamétrica de ALA com o eletrodo GP/ CoPc, voltamogramas cíclicos foram registrados. A Figura 18 mostra sinais a partir das condições: adições consecutivas de 20 μL de ALA ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em 10,0 mL de PBS (pH 7,0) e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em eletrodo GP/ CoPc. O sinal obtido para cada concentração de ALA foi muito estável e reprodutível. A dependência linear entre a corrente de pico e a concentração de ALA apresentou uma faixa de $1,9 \times 10^{-6}$ a $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, tal como pode ser visto na figura inserida (Figura 18). A regressão linear foi dada pela equação ($I_p / \mu\text{A}$): $0,38 + 7,6 \times 10^3 [\text{ALA}] \text{ mol L}^{-1}$, com coeficiente de regressão linear foi de 0,999 e o desvio padrão relativo (RSD) foi de 2,8%.

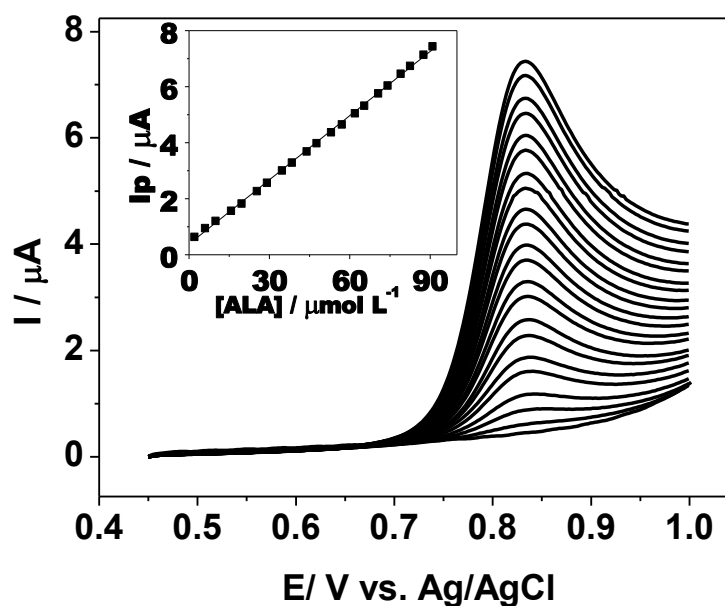


Figura 18. Voltamogramas registrados com eletrodo GP/ CoPc em PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) para concentrações crescentes de ALA (faixa: $1,9 \times 10^{-6}$ a $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Inserido o gráfico, I_p vs. $[\text{ALA}]$, $R = 0.999$.

Para o cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), utilizou-se o desvio padrão da média aritmética de 10 voltamogramas do branco. A partir destes valores, calculou-se o LD e LQ de acordo com as Equações 4 e 5 [72]:

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

$$LQ = \frac{10xSd}{b} \quad (4)$$

Onde Sd é a estimativa do desvio padrão da resposta e b o valor do coeficiente angular da curva analítica. Os valores de LD e LQ obtidos foram $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e de $5,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

4.6 Análise cronoamperométrica de ALA

Os estudos cronoamperométricos foram realizados no potencial aplicado em + 0,9 V (vs. Ag/ AgCl) com base nos resultados obtidos com os estudos de voltametria cíclica. A corrente foi continuamente monitorada e injeções de 20 μL de ALA ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em PBS (pH 7, 0) foram realizadas em intervalos de 30 s sob agitação. A Figura 19 mostra a resposta cronoamperométrica bem definida para eletrodo GP/ CoPc para determinação de ALA.

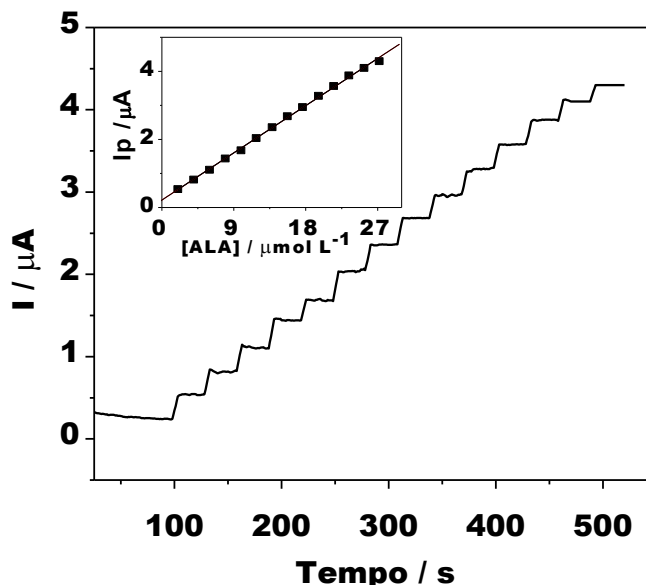


Figura 19. Medidas cronoamperométricas de sucessivas adições de 20 μL de ALA ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em PBS pH 7, 0 em eletrodo GP/ CoPc. Potencial aplicado: +0,9 V vs. Ag/ AgCl. Inserido o gráfico, I_p vs. [ALA], $R = 0.998$.

Os sinais de corrente são proporcionais à faixa de concentração de ALA ($1,9 \times 10^{-6}$ a $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), a regressão linear dada pela equação ($I_{pa}/ \mu\text{A}$): $0,22 + 1,54 \times 10^5 [\text{ALA}] \text{ mol L}^{-1}$, com coeficiente de regressão linear foi de 0,998 e RSD de 2,6%, foram obtidos (inscrito na Figura 19). Além disso, o método cronoamperométrica produziu valores de LD e LQ de $9,8 \times 10^{-8}$ e $3,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

4.7 Voltametria de Pulso Diferencial de ALA

A voltametria de pulso diferencial (VPD) também foi explorada para a determinação de ALA usando eletrodo GP/ CoPc. Para tal estudo foi usado como parâmetros: amplitude de pulso: 80 mV, velocidade: 25 mV s^{-1} e tempo de pulso: 200 ms.

A Figura 20 apresenta uma série de voltamogramas de pulso diferencial obtidos por concentrações crescentes de ALA. Para o intervalo de concentrações

situadas entre $4,99 \times 10^{-7}$ e $1,96 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de ALA, uma boa linearidade foi obtida, (inscrito na Figura 20), com equação ($I_{pa} / \mu A$): $1,35 + 2,04 \times 10^5 [ALA]$ mol L⁻¹ com coeficiente de correlação $R = 0,999$ e $RSD = 2,1\%$. Sob estas condições, os valores de LD e LQ foram calculados a $3,4 \times 10^{-9}$ e $1,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente.

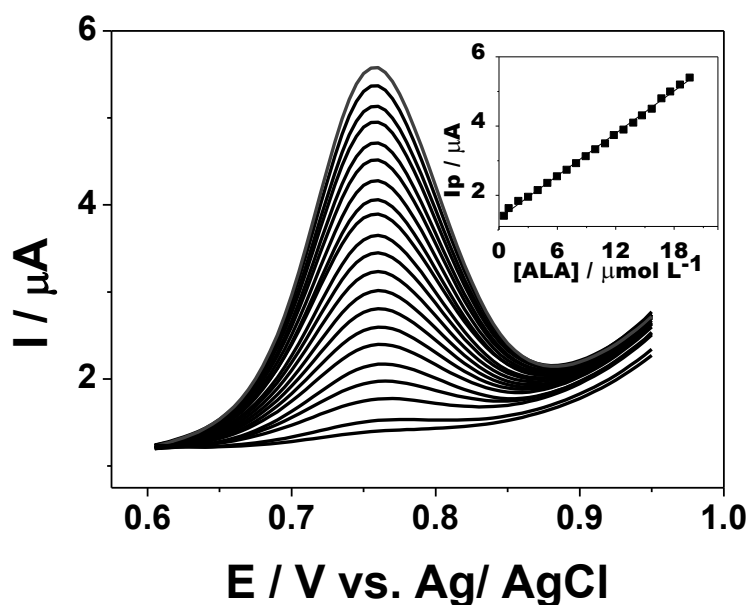


Figura 20. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos por sucessivas adições de 20 μL de ALA (1×10^{-3} mol L⁻¹) em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Parâmetros: amplitude: 80 mV, tempo de pulso: 200 ms e velocidade de varredura: 25 mV s⁻¹. Inserido o gráfico, I_p vs. [ALA], $R = 0,999$.

4.8 Comparações das técnicas eletroquímicas para a determinação de ALA

Após os estudos das técnicas eletroquímicas e das construções das curvas analíticas para a determinação do ALA por VC, VPD e cronoamperometria foram realizada comparação entre os resultados obtidos (Tabela 2). De acordo com a tabela, as técnicas aplicadas obtiveram valores de sensibilidade da mesma ordem de grandeza, no entanto a técnica de VPD foi a que apresentou os melhores valores para LD e LQ.

Tabela 2. Comparação das técnicas eletroquímicas para a determinação do ALA.

Parâmetros	VC	CRON	VPD
Equação da reta (Ipa/ μ A)	$0,38 + 7,6 \times 10^{-3}$ [ALA]	$0,22 + 1,54 \times 10^{-5}$ [ALA]	$1,35 + 2,04 \times 10^{-5}$ [ALA]
LD (mol L ⁻¹)	$1,7 \times 10^{-7}$	$9,8 \times 10^{-8}$	$3,4 \times 10^{-9}$
LQ (mol L ⁻¹)	$5,9 \times 10^{-7}$	$3,2 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-8}$
Faixa de concentração (mol L ⁻¹)	$1,9 \times 10^{-6}$ a $9,0 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-6}$ a $2,5 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-7}$ a $1,9 \times 10^{-5}$

VC: voltametria cíclica, CRON: cronoamperometria e VPD: voltametria de pulso diferencial.

4.9 Determinação de ALA em suplemento dietético por VPD

O sensor foi aplicado para a determinação de ALA usando a técnica de VPD em amostras comerciais de suplemento dietético, por apresentar uma melhor resposta analítica em frente das demais técnicas. As concentrações de ALA foram determinadas usando o método de adição de padrão. Todas as medidas foram feitas em triplicata. Comprimidos comerciais de ALA (MRN ®, EUA) contendo 300 mg foram utilizados como amostras reais. Os resultados são apresentados na Figura 21.

A regressão linear das respostas foi dada pela equação: (Ipa/ μ A): $9,72 + 4,38 \mu\text{mol L}^{-1}$ [ALA], com coeficiente de correlação de 0,999. A Tabela 3 resume os resultados da determinação de ALA em soluções padrões. Os resultados foram verificados pelo método de adição e recuperação. As percentagens de recuperação foram calculadas comparando a concentração obtida a partir das concentrações de amostras reais com as adicionadas.

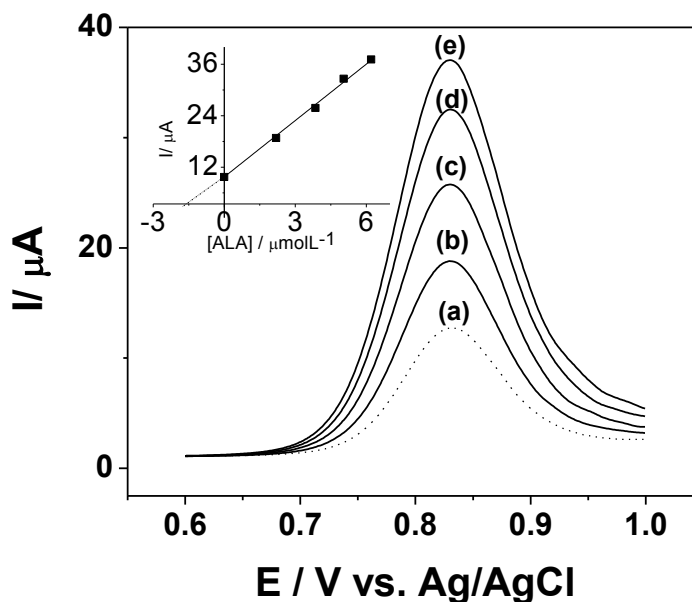


Figura 21. Voltamograma de pulso diferencial para determinação do ALA em amostras comerciais em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) usando o método de adição de padrão. (a) Amostra, (b - e) quatro adições padrões de ALA: (b) Amostra + 2, 20 μmol L⁻¹; (c) Amostra + 3, 87 μmol L⁻¹; (d) Amostra + 5, 05 μmol L⁻¹; (e) Amostra + 6, 28 μmol L⁻¹. Parâmetros: amplitude: 80 mV, tempo de pulso: 200 ms e velocidade de varredura: 25 mV s⁻¹. Inserido o gráfico, I_p vs. [ALA], R = 0,999.

Tabela 3. Dados de adição e recuperação em amostra de ALA (n = 4) obtidos com eletrodo GP/ CoPc

Amostra	Adicionado μmol L ⁻¹	Encontrado μmol L ⁻¹	Recuperação %
Ácido α- Lipóico	1, 33	1, 40	105, 2
	2, 00	1, 98	99, 0
	3, 30	3, 29	99, 6
	5, 00	5, 01	100, 2
	6, 60	6, 80	103, 0

4. 10 Análise por Injeção em Batelada com detecção amperométrica

Conforme já mencionado anteriormente, o trabalho experimental é dedicado na determinação de ALA por técnicas eletroquímicas, associando também ao sistema BIA com detecção amperométrica (condição não estacionária), com vista

às aplicações analíticas. Nos testes com BIA foi usado como eletrólito suporte, PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7, 0).

Na Figura 22 mostra o voltamograma hidrodinâmico obtido pelo eletrodo GP sem modificação (Figura 22a) e eletrodo GP modificado com CoPc (Figura 22b) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS (pH 7,0) com adições de ALA ($100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Apresenta uma faixa de potencial no intervalo de 0,0 a +1,05 V, que abrange a oxidação eletroquímica de ALA e de possíveis interferentes que podem ser encontrados em formulações farmacêuticas. As respectivas correntes de pico de cada potencial foram monitoradas durante 10 injeções de $100 \text{ } \mu\text{L}$ de ALA através da micropipeta. Em seguida, foi calculado o desvio padrão das medidas.

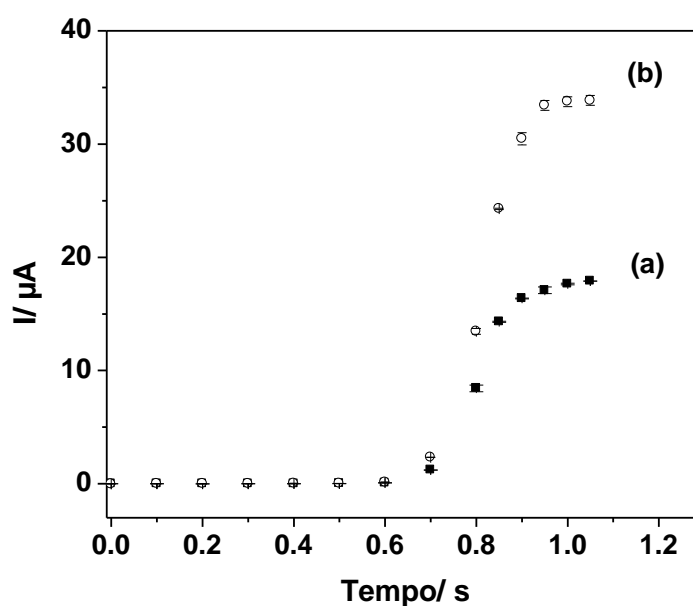


Figura 22. Voltamograma hidrodinâmico obtido por BIA. (a) Eletrodo GP sem modificação, (b) Eletrodo GP modificado com CoPc, ambos na presença de ALA ($100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições: eletrólito suporte: PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, volume de injeção: $100 \text{ } \mu\text{L}$, potenciais variáveis (vs. Ag/AgCl).

Como pode ser observado, ALA é oxidado a partir de + 0,8 V e chega a valor próximo de +1,0 V, o que difere pouco da voltametria cíclica (sistema estacionário), onde a corrente máxima para oxidação do ALA foi atingida em + 0,84

V. Devido as possíveis oxidações de interferentes próximos de potencial + 1, 0 V, foi selecionado o potencial de +0, 9 V do eletrodo GP/ CoPc para determinação de ALA.

4.10.1 Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade

O estudo da repetibilidade (Figura 23) foi realizado com 40 injeções sucessivas de 100 μL de ALA ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), as injeções foram feitas com uma frequência analítica de 208 injeções/ hora, com desvio padrão relativo estimado em 0, 46% ($n = 40$), observado assim uma boa repetibilidade das correntes, além de uma boa estabilidade em períodos longos. Valores tão baixos de RSD foram obtidos em trabalhos anteriores empregando BIA, devido à elevada precisão da injeção obtida devido o uso da pipeta eletrônica [73-74].

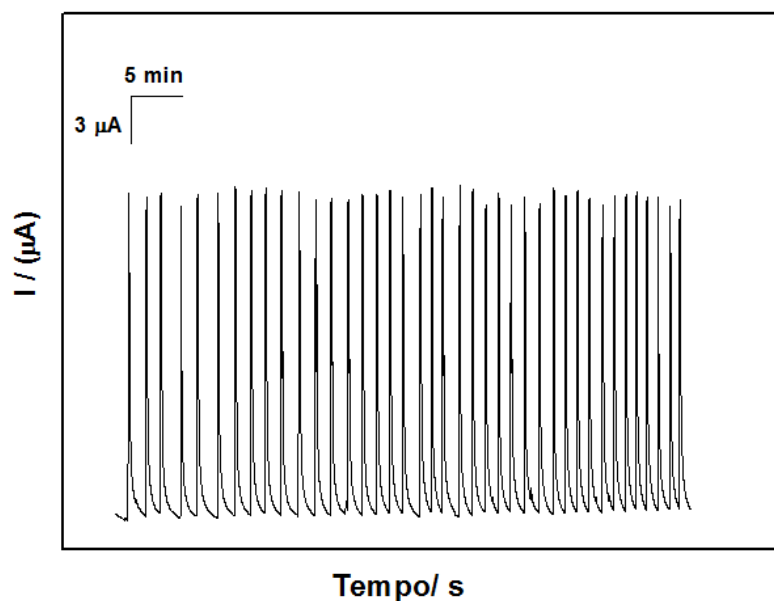


Figura 23. Amperogramas obtidos por BIA usando eletrodo GP/ CoPc. Cada pico corresponde a uma injeção de 100 μL de ALA. Condições - eletrólito suporte: PBS 0, 1 mol L^{-1} , potencial aplicado: + 0, 9 V (vs. Ag/ AgCl).

Na Figura 24 mostra repetições com alternadas injeções de concentrações de ALA: 10 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 7, 0), verificou-se mais uma vez uma boa repetibilidade e a não evidência do efeito de memória, uma

vez que o conjunto de análises sucessivas apresentou sinais equivalentes para as concentrações estudadas, apresentando RDS de 0, 516% e 0, 431% para 10 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ALA, respectivamente.

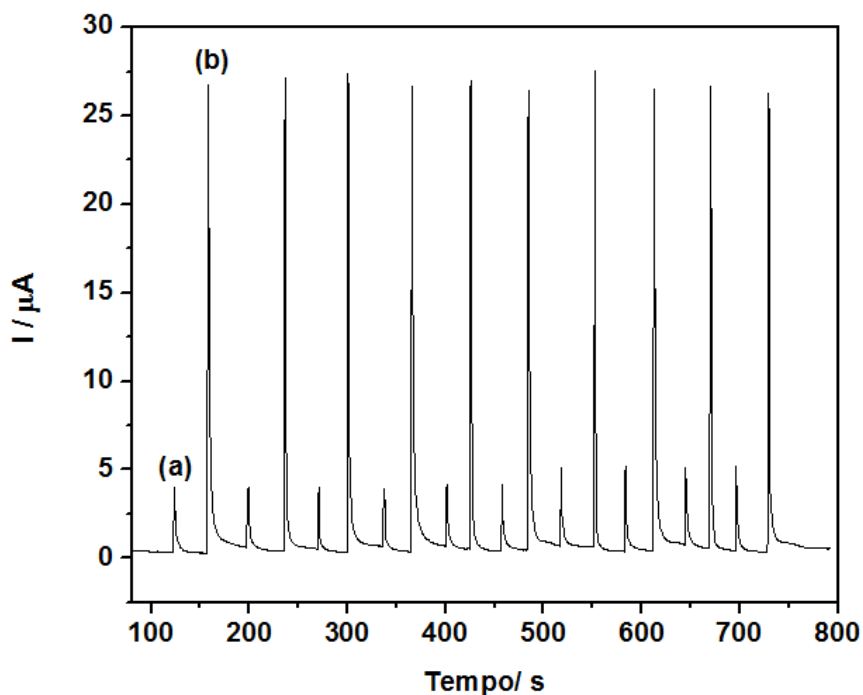


Figura 24. Resultados das injeções consecutivas por BIA. (a) 10 e (b) 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ALA. Condições: eletrólito suporte: PBS 0,1 mol L^{-1} , potencial aplicado: + 0, 9 V (vs. Ag/ AgCl).

O estudo de reprodutibilidade do eletrodo GP foi realizado em triplicata (Figura 25), empregando soluções padrões de ALA 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 7, 0), fazendo modificação no eletrodo GP em inter-dias (10 dias), apresentou RSD = 1, 59%.

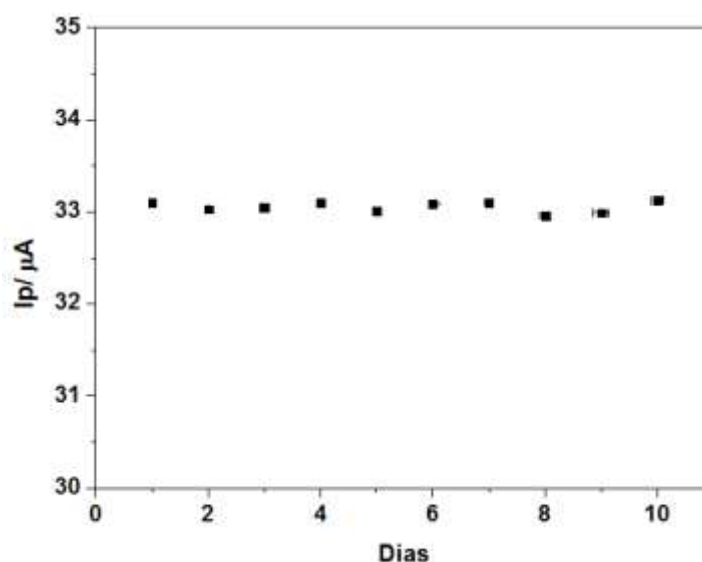


Figura 25. Gráfico do estudo de reprodutibilidade inter-dias. Ip vs. número de dias (n = 10).

4.10.2 Determinação de ALA em suplemento dietético e urina por BIA com detecção amperométrica

O método desenvolvido para análise rápida de ALA foi testado em amostra de suplemento dietético e em urina sintética. A Figura 26 exibe uma série de injeções de soluções padrões de diferentes concentrações de ALA ($0,1$ a $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). O sensor proposto mostrou uma ampla faixa linear de resposta de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com a seguinte equação de reta: $I_p (\mu\text{A}) = 1,366 + 0,432 C (\mu\text{mol L}^{-1})$ e coeficiente de correlação igual a $0,999$. Os valores de LD e LQ foram estimados de $1,52 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,07 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. A ampla faixa linear do método amperométrico e a elevada sensibilidade permitem que amostras com variadas concentrações de ALA possam ser analisadas sem prévias diluições ou pré-concentrações.

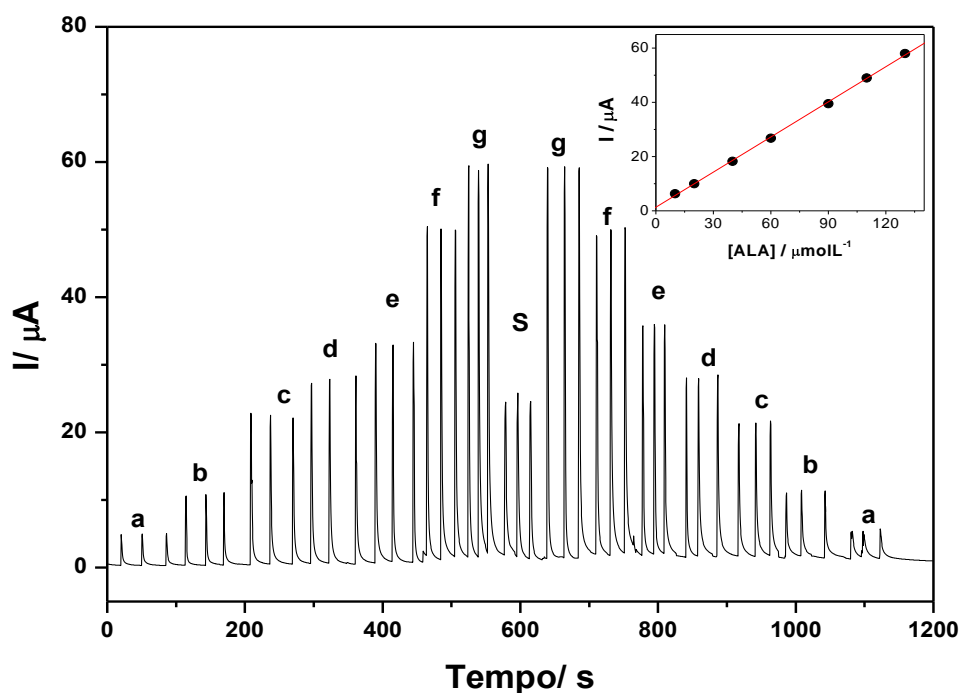


Figura 26. Respostas de BIA-amperométrica para análise de ALA em amostra de suplemento dietético. Condições: Potencial de trabalho: + 0,9 V, volume de injeção: 100 μL , eletrólito: PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 7, 0). Inserido: curva de calibração obtida a partir das injeções de (a) 10, (b) 20, (c) 40, (d) 60, (e) 90, (f) 110, (g) 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de soluções padrões de ALA, S: amostra de ALA.

A exatidão do método foi avaliada a partir de testes de adição e recuperação em urina sintética. Neste teste, três concentrações diferentes de ALA foram adicionadas as duas amostras, suplemento dietético e urina sintética fortificada com ALA. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Determinação de ALA em amostra de suplemento dietético e em urina sintética dopada com ALA (n = 3).

Amostras	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Ácido α -lipóico	5,0	5,1	100,2
	10,0	9,8	98,0
	20,0	20,2	101,0
Urina sintética	3,8	3,9	102,6
	9,1	9,1	100,0
	15,0	14,9	99,3

Os valores percentuais de recuperação variaram entre 98,0 e 102,6 % sugerindo assim, ausência de interferência da matriz no procedimento em BIA. Estudos das possíveis espécies interferentes também foram realizados com alguns possíveis interferentes como ácido ascórbico, ácido úrico, cisteína, glicose e glutamina. A influência destes compostos foi verificada comparando-se as correntes de pico obtidas com uma solução de ALA com as correntes obtidas com as soluções de ALA aditivadas com os compostos interferentes acima mencionados. Os resultados estão presentes na Tabela 5.

Tabela 5. Efeito dos interferentes na determinação de ALA (1 ALA: 10 interferente)

Espécie interferente	Resposta relativa (%)
L-(+)-Ácido ascórbico	102,2
Ácido úrico	98,9
L-(+)- Cisteína	107,0
D-(-)-Glicose	99,9
L-(+)- Glutamina	101,4

Das substâncias investigadas na interferência para a determinação de ALA com exceção do cisteína que causa uma interferência na ordem de 7% quando presente em concentrações igual ou 10 vezes superior à de ALA, respectivamente.

4.11 Validação do método analítico

A técnica HPLC foi utilizada para fazer uma comparação com os resultados obtidos na determinação de ALA em suplemento dietético por VPD e BIA utilizando o eletrodo GP/ CoPc. (Figura 27). A curva analítica obtida por HPLC para o ALA no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ também apresentou comportamento linear de acordo com a equação: $A \text{ (mUA)} = -3,4 + 2,7$

$\times 10^3$ [ALA] mol L⁻¹. Os LD e LQ obtidos foram $3,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $1,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente.

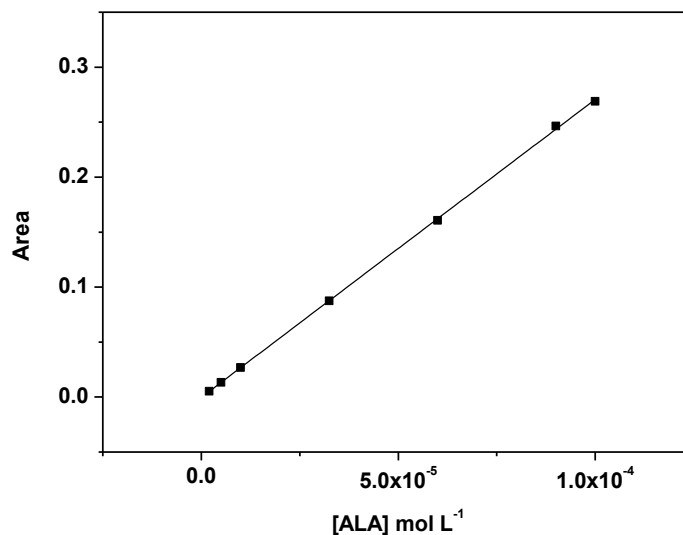


Figura 27. Curva analítica obtida para o ALA empregando HPLC.

Na Tabela 6 encontram-se os resultados obtidos para a determinação de ALA no suplemento dietético analisado com as técnicas: VPD, BIA e HPLC. Observa-se que os resultados obtidos pelo método proposto empregando GP/ CoPc estão em concordância com os resultados obtidos pelo método de referência empregado, HPLC.

Tabela 6. Determinação de ALA em comprimidos de suplemento alimentar.

Amostra	Valor rotulado / mg	VPD / mg	BIA / mg	HPLC / mg
ALA	300	303,34 (±1)	303,23 (±2)	303,07 (±2)

4.11.1 Tratamento estatístico

A comparação entre os dois métodos aplicados foi realizada através do teste t de Student, utilizando delineamento para amostras equivalentes ou pareadas. Este procedimento foi realizado, visando à avaliação de diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas nos métodos.

Neste sentido, os dados da Tabela 6, permitiram construir a Tabela 7 o teste de significância estatística (teste t). A partir do ganho médio e do erro padrão, para a diferença entre as médias [75], o T_{cal} (t calculado) foi de 4,17. Este valor é menor que o T_{tab} (t tabelado) 4,30, indicando que as médias não são significativamente diferentes, para nível de significância estatística inferior a um ponto percentual ($ns < 5\%$) e grau de confiança de 95%.

Tabela 7. Teste estatístico

Teste aplicado	Graus de liberdade	Ganho médio	Erro padrão	T_{cal}	T_{tab}^* (95%)
T student pareado	2	0, 33	0, 12	4, 17	4, 30

A análise dos resultados obtidos na determinação de ALA por VPD, BIA e HPLC não apresentaram diferenças significativas e estão dentro de um erro relativo aceitável, esta conclusão é perfeitamente coerente com o teste estatístico empregado.

4.12 Comparações das técnicas eletroquímicas com valores reportados na literatura para determinação de ALA

Os resultados obtidos para a determinação de ALA pelo método proposto foram comparados com dados reportados na literatura para diversos eletrodos e são apresentados na Tabela 8. Estes dados indicam um melhor desempenho do eletrodo

GP/ CoPc em relação aos resultados encontrados na literatura utilizando as técnicas voltamétricas como método de determinação eletroanalítica de ALA em soluções aquosas.

Tabela 8. Comparação de diferentes sensores para a determinação de ALA.

Eletrodo	Eletrólito	Técnica	Faixa linear (mol L⁻¹)	LD (mol L⁻¹)	LQ (mol L⁻¹)	Ref.
FTO	H ₂ SO ₄	VC, VOQ	5, 0 × 10 ⁻⁶ a 5, 0 × 10 ⁻⁴	3, 7 × 10 ⁻⁶	1, 2 × 10 ⁻⁵	[24]
CV	PBS	VOQ	1, 0 × 10 ⁻⁶ a 1, 5 × 10 ⁻⁴	1, 8 × 10 ⁻⁶	6, 1 × 10 ⁻⁶	[65]
CV/NTC	H ₂ SO ₄	VC	2, 6 × 10 ⁻⁵ a 1, 8 × 10 ⁻⁴	1, 9 × 10 ⁻⁵	-	[66]
CV	H ₂ SO ₄	VPD	1, 1 × 10 ⁻⁵ a 1, 7 × 10 ⁻⁴	5, 7 × 10 ⁻⁶	-	[27]
GP/CoPc	PBS	VC	1, 9 × 10 ⁻⁶ a 9, 0 × 10 ⁻⁴	1, 7 × 10 ⁻⁷	5, 9 × 10 ⁻⁷	Este trabalho
GP/CoPc	PBS	CRONO	1, 9 × 10 ⁻⁶ a 2, 5 × 10 ⁻⁵	9, 8 × 10 ⁻⁸	3, 2 × 10 ⁻⁷	Este trabalho
GP/CoPc	PBS	VPD	4, 9 × 10 ⁻⁷ a 1, 9 × 10 ⁻⁵	3, 4 × 10 ⁻⁹	1, 2 × 10 ⁻⁸	Este trabalho
GP/CoPc	PBS	BIA	1, 9 × 10 ⁻⁶ a 1, 0 × 10 ⁻⁴	1, 5 × 10 ⁻⁸	5, 1 × 10 ⁻⁸	Este trabalho

CV: Carbono vítreo, GP: Grafite pirolítico, FTO: Óxido de estanho dopado com flúor, NTC: Nanotubos de carbono, VC: Voltametria cíclica, VPD: Voltametria de pulso diferencial, VOQ: Voltametria de onda quadrada, CRONO: Cronoamperometria, BIA: Análise por Injeção em Batelada.

O estudo demonstra que o eletrodo de GP/ CoPc apresenta um excelente desempenho para determinação do ALA. Em estudos anteriores com os eletrodos CV, FTO e CV modificado com NTC foram exploradas e observou-se que o melhor limite de detecção foi observado para o eletrodo CV.

No presente estudo, os valores de LD e LQ são cerca de 500 vezes menor do que os obtidos em estudos anteriores, demonstrando um desempenho diferenciado do eletrodo GP/ CoPc.

Capítulo 5 – Conclusão

5 CONCLUSÃO

Os estudos voltamétricos realizados permitiram concluir que o eletrodo GP/ CoPc apresentou um pico de oxidação irreversível com potencial próximo a +0,85 V vs. Ag/ AgCl. Além disso, o eletrodo mostrou um deslocamento do início da corrente de oxidação em cerca de 100 mV para potenciais menos positivos, bem como um aumento significativo na magnitude da corrente de pico. A utilização deste eletrodo em condições hidrodinâmicas também apresentou desempenho muito satisfatório.

Os resultados indicaram um comportamento linear utilizando as técnicas eletroquímicas de VC, VPD e cronoamperometria. No entanto a técnica de VPD foi a que apresentou os melhores valores de LD e LQ, portanto foi à técnica utilizada para aplicação da amostra. Quanta ao eletrodo GP/ CoPc acoplado ao sistema BIA, convém destacar que sua utilização como sensor proporciona inúmeras vantagens incluindo simplicidade, ampla faixa de linear de trabalho, baixo LD e LQ.

Para efeito de comparação de métodos, os resultados obtidos por HPLC foram concordantes com os resultados obtidos pelo método proposto ao nível de confiança de 95%. Quando comparados com resultados publicados na literatura para a determinação do ALA, verificou-se que o método proposto nesse trabalho, obteve menores valores de LD e LQ. Haja vista que o método proposto apresenta vantagens sobre o método padrão (HPLC) como, por exemplo, rapidez, alta frequência analítica, baixo custo, menor tempo de análise e menor consumo de reagentes gastos em todo o procedimento analítico. Podendo ser facilmente empregado em determinações no campo, pois o sistema BIA, assim como alguns micropotenciostatos disponíveis comercialmente têm características portáteis.

Os resultados demonstraram uma potencialidade na determinação de ALA com eletrodo GP/ CoPc tanto para as técnicas eletroquímicas estudadas quanto BIA com detecção amperométrica.

Referências

REFERÊNCIAS

- [1] SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1315-1321,1995.
- [2] FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. N. Stress oxidativo, antioxidants e fitoquímicos. **Bioanálise**. v. 4. p. 32-39, 2007.
- [3] FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras**. v. 43, p.61 - 68,1997.
- [4] MACZUREK, A.; HAGER, K.; KENKLIES, M.; SHARMAN, M.; MARTINS, R.; ENGEL, J.; CARLSON, C. D; MUNCH, G. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 60, p.1463-1470, 2008.
- [5] HOLMQUIST, L.; STUCHBURY,G.; BERBAUM, K.; MUSCAT, S. YOUNG, HAGER, K.; ENGEL, J.; MUNCH, G. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. **Pharmacology & Therapeutics**. v 113, p.154-164, 2007.
- [6] HENRIKSEN, E. J.; DIAMOND-STANIC, M. K.; MARCHIONNE, E. M. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 51, p.993-999, 2011.
- [7] SHAY, K. P.; MOREAU, R. F.; SMITH, E. J.; SMITH, A. R.; HAGEN, T. M. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. **Biochimica Et. Biophysica Acta-General Subjects**. v.1790, p.1149-1160, 2009.
- [8] CARLSON, D. A.; SMITH, A. R.; FISCHER, S. J.; YOUNG, K. L, PACKER, L. The plasma pharmacokinetics of R-(+) lipoic acid administered as sodium R-(+)-lipoateto Healthy Human. **Alternative Medicine Reviews**. v.12, p.343-351, 2007.

[9] MARTINS, V. D.; MANFREDINI, V.; PERALBA, M. C. R.; BENFATO, M. S. **Clinical Nutrition** 2009, 28, 192-197.

[10] ZHANG, S. J.; GE, Q. F.; GUO, D. W.; HU, W. X.; LIU, H. Z. Synthesis and anticancer evaluation of α -lipoic acid derivatives. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3078-3083, 2010.

[11] GONZALEZ, O. P.; GONZALEZ, R. E. C. Therapeutic perspectives on the combination of α -lipoic acid and vitamin E. **Nutrition Research**. v. 26, p. 1-5, 2006.

[12] LEE, T, Dugoua, J. Nutritional supplements and their effect on glucose control. **Current Diabetes Reports**. v.11, p.142-148, 2011.

[13] HAGEN, T. M.; INGERSOLL, R. T.; LYKKESFELDT, J.; LIU, J.; WEHR, C. M.; VINARSKY, V.; BARTHOLOMEW, J. C .; AMES, A. B. (R)- α -Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. **FASEB Journal**, v. 13, p. 411- 418, 1999.

[14] HAGER, K.; MARAHRENS, A.; KENKLIES, M.; RIEDERER, P.; MÜNCH, G. Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer type dementia. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 32, p. 275-282, 2001.

[15] MORINI, M.; ROCCATAGLIATA, L.; DELL'EVA, R.; PEDEMONTE, E.; FURLAN, R.; MINGHELLI, S.; GIUNTI, D.; PFEFFER, U.; MARCHESE, M.; NOONAN, D. Alpha-lipoic acid is effective in prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 148, p. 146-15, 2004.

[16] MORIKAWA, T.; YASUNO, R.; WADA, H. Do mammalian cells synthesize lipoic acid. identification of a mouse cDNA encoding α -lipoic acid synthase located in mitochondria. **FEBS Letters**, v. 498, p. 16-21, 2001.

[17] SARNO, M. C.; DELFINO, M.R. Cuantificación de ácido α -lipoico em comprimidos por coulombimetria. **Facena**, v. 20, p. 23-29, 2004.

- [18] BIEWENGA, G. P.; HAENEN, G. R. M.; BAST, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. **General Pharmacology**, v. 29, p. 315-331, 1997.
- [19] BILSKA, A.; WLODEK, L. Lipoic acid- the drug of the future? **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 570-577, 2005.
- [20] KHAN, A.; KHAN, M. I.; IQBAL, Z.; AHMAD, L.; SHAH, Y.; WATSON, D. G. Determination of lipoic acid in human plasma by HPLC-ECD using liquid-liquid and solid-phase extraction: Method development, validation and optimization of experimental parameters. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. v. 878, p.2782-2788, 2010.
- [21] WOŁYNIEC, E.; KARPÍŃSKA, J.; ŁOSIEWSKA, S.; TURKOWICZ, M.; KLIMCZUK, J.; KOJŁO, A. Determination of lipoic acid by flow-injection and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 96, p. 223-229, 2012.
- [22] CHEN, J.; JIANG, W. M.; CAI, J.; TAO, W.X.; GAO, X. L.; JIANG, X. H. Quantification of lipoic acid in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. v. 824, p.249-257, 2005.
- [23] SITTON, A.; SCHMID, M. G.; GUBITZ, M. G.; ABOUL-ENEIN, H. W. Determination of lipoic acid in dietary supplement preparations by capillary electrophoresis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v. 61, p.119-124, 2004.
- [24] MIRANDA, M. P.; FAUNDEZ, M.; ARMIJO, F. Use of fluorine-doped tin oxide electrodes for lipoic acid determination in dietary supplements. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 668, p. 1-6, 2012.

- [25] FERNANDEZ-BOBES, C. FERNANDEZ-ABEDUL, M. T.; COSTA-GARCIA, A. Anodic stripping of heavy metals using a hanging mercury drop electrode in a flow system. **Electroanalysis**, v.10, p.701-706, 1998.
- [26] RIBANI, M. BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MEL, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, n. 5, p. 771-780, 2004.
- [27] BRETT, A. M.; CORDUNEANU, O.; GARNETT, M. Anodic oxidation of α -lipoic acid at a glassy carbon. Electrode and its determination in dietary supplements. **Analytical Letters**, v. 40, p. 1763-1778, 2007.
- [28] PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalítica. **Quim. Nova**, n.25, p. 1012-1021, 2002.
- [29] DAMOS, F. S.; SOTOMAYOR, M. D. T.; KUBOTA, L. T.; TANAKA, S. M. C. N.; TANAKA, A. A. Iron (III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin as a biomimetic catalyst of horseradish peroxidase on the electrode surface: an amperometric sensor for phenolic compound determinations. **Analyst**, v. 128, p. 255-259, 2003.
- [30] SOUZA, M. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletrocatalise: uma breve abordagem. **Quim. Nova**, v. 20, p. 191-198, 1997.
- [31] BARROS, S. B. A.; RAHIM, A.; TANAKA, A. A.; ARENAS, L. T.; LANDERS, R.; GUSHIKEM, Y. In situ immobilization of nickel(II) phthalocyanine on mesoporous SiO_2/C carbon ceramic matrices prepared by the sol gel method: use in the simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and dopamine. **Electrochimica Acta**, v. 87, p. 140-147, 2013.
- [32] ZHANG, J.; TSE, Y.; PIETRO, W. J.; LEVER, A. B. P. Electrocatalytic activity of - tetramethyltetra-3-4-pyridoporphyrazinocobalt (II) adsorbed on a graphite electrode towards the oxidation of hydrazine and hydroxylamine. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 406, p. 203-211, 1996.

- [33] OLIVEIRA, A. X.; SILVA, S. M.; LEITE, F. R. F.; KUBOTA, LAURO, T.; DAMOS, F. S.; SILVA, R. C. L. R. Highly sensitive and selective basal plane pyrolytic graphite electrode modified with 1,4-naphthoquinone/MWCNT for simultaneous determination of dopamine, ascorbate and urate. **Electroanalysis**, v. 25, p. 723-731, 2013.
- [34] O`SHEA, T. J.; LUNTE, S. M. Chemically modified microelectrodes for capillary electrophoresis/electrochemistry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 66, p. 307-311, 1994.
- [35] NAHUZ, M. S. S.; REIS, A. P.; ARAUJO, M.F.A.; TANAKA, A.A. Influências das orientações “basal” e “edge” e do pré-tratamento superficial nas propriedades eletroquímicas de eletrodos de grafite pirolítico modificados com ftalocianina de cobalto. **Cadernos de Pesquisa – UFMA**, São Luís, v. 11, Jan./Jun. 2000.
- [36] BARD, A. J. FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods**. Jonhs Wiley & Sons, Inc. New York, 1980.
- [37] ZHENG, Q.; FAN, C.; ZHEN, C.; ZHI-YOU, Z.; SHI-GANG, S. Irreversible adsorption of Sn adatoms on basal planes of Pt single crystal and its impact on electrooxidation of ethanol. **Electrochimica Acta**.v.53, p.6081–6088, 2008.
- [38] PATIL, R. H.; HEGDE, R. N.; NANDIBEWOOR, S. T. Electro-oxidation and determination of antihistamine drug, cetirizine dihydrochloride at glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubos. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 83, p.133–138, 2011.
- [39] BRAUN, A. E.; TCHERNIAC, J. Phtalocyanines: Synthesis. **Ann. Ber.** v.40. p.2709, 1907.
- [40] LINSTED, R. P. ROBERTSON, J. M. The stereochemistry of metallic phtalocyanine. **J. Chem. Soc.** v.3. p.1195, 1936.

[41] LUZ, R. D. S.; MOREIRA, A. B.; DAMOS, F. S.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Cobalt tetrasulphonated phthalocyanine immobilized on poly-L-lysine film onto glassy carbon electrode as amperometric sensor for cysteine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.42, p.184-191, 2006.

[42] SOUSA, A. L.; SANTOS, W. J.R.; LUZ, R. C.S.; DAMOS, F.S.; KUBOTA, L. T.; TANAKA, A. A.; TANAKA, S. M. N. Amperometric sensor for nitrite based on copper tetrasulphonated phthalocyanine immobilized with poly-L-lysine film. **Talanta**. v.75, p.333-338, 2008.

[43] FATIBELLO, O.; CONCEICAO, C. C.; FARIA, R. C.; TANAKA, A. A. Electrocatalytic oxidation and voltammetric determination of hydrazine in industrial boiler feed water using a cobalt phthalocyanine-modified electrode. **Analytical Letters**, v. 41, p. 1010-1021, 2008.

[44] ZUO, X.; ZHANG, H.; LI, N. An electrochemical biosensor for determination of ascorbic acid by cobalt (II) phthalocyanine-multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v.161, p.1074–1079, 2012.

[45] MORAES, F. M.; GOLINELLI, D. L. C.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S. Determination of epinephrine in urine using multi-walled carbon nanotube modified with cobalt phthalocyanine in a paraffin composite electrode. **Sensors and Actuators B:Chemical**. v.148,p.492-497, 2010.

[46] BARROS, W. R. P.; REIS, R. M.; ROCHA, R. S.; LANZA, M. R. V. Electro-Fenton degradation of the food dye amaranth using a gas diffusion electrode modified with cobalt (II) phthalocyanine. **Electrochem. Acta**. v.104, p.12-18, 2013.

[47] ZAGAL, J. H.; GRIVEAU, S.; SILVA, J. F.; NYOKONG, T.;BEDIQUI, F. Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reaction. **Coordination Chem. Reviews**. v. 254, p.2755-2791, 2010.

[48] MASHAZI, P. N.; OZOEMENA, I. K.; NYOKONG, T.; Tetracarboxylic acid cobalt phthalocyanine SAM on gold: Potential applications as amperometric sensor for H₂O₂ and fabrication of glucose biosensor. **Electrochimica Acta** v. 52 p. 177-186. 2006.

[49] PAIM, LEONARDO L.; HAMMER, PETER; STRADIOTTO, NELSON R. Electrochemical Behavior of a Glassy Carbon Electrode Chemically Modified with Nickel Pentacyanonitrosylferrate in Presence of Sulfur Compounds. **Electroanalysis**, v. 23, p. 1488-1496, 2011.

[50] DANTAS, M. F. L.; REIS, A. P. R.; TANAKA, S. M. C. N.; ZAGAL, J. H.; CHEN, Y.Y.; TANAKA, A. A. Electrocatalytic oxidation of hydrazine in alkaline media promoted by iron tetrapyrroline adsorbed on graphite surface.. **J. Braz. Chem. Soc.** v.19, p.720-726, 2008.

[51] RODRIGUES, N. P.; COFRÉ, R.; ZAGAL, J. H.; BEDIQUI, F. Electrocatalytic activity of cobalt phthalocyanine CoPc adsorbed on a graphite electrode for the oxidation of reduced L-glutathione (GSH) and the reduction of its disulfide (GSSG) at physiological pH. **Bioelectrochemistry**. v.70; p.147-154, 2007.

[52] DA SILVA, I. S.; ARAUJO, M. F. H. A.; FERREIRA, A.; VARELA, JR., J. D. J.; TANAKA, S. M. C. N.; TANAKA, A. A.; ANGNES, L. Quantification of N-acetylcysteine in pharmaceuticals using cobalt phthalocyanine modified graphite electrodes. **Talanta** v. 83, p.1701-1706, 2011.

[53] BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações. **Oxford University Press**. Coimbra, 1996.

[54] QUINTINO, M. S. S. Desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos associados a Batch Injection Analysis (BIA) para aplicações analíticas. **Tese de doutorado em Química Analítica** - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

[55] SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quím. Nova.** v.26, p.81-89, 2003.

[56] PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Rev. Virtual Quim.** v.5, p.516-537, 2013.

[57] WANG, J.; TAHA, Z. Batch Injection Analysis. **Anal. Chem.** v.63, p.1053-1056, 1991.

[58] WANG, J. Batch Injection - from FIA to BIA. **Microchem. J.** v.45, p.219, 1992.

[59] QUINTINO, M. S. M.; ARAKI, K.; TOMA, H. E.; AGNES, L. Batch Injection Analysis utilizing modified electrodes with tetrathenated porphyrin films for acetaminophen quantification. **Electroanalysis.** v.14, p.1629-1634, 2002.

[60] CUNHA, R. R.; TORMIN, T. F.; RICHTER, E. M.; MUNOZ. Determinação rápida de hidroquinona usando Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção amperométrico. **Quím. Nova.** V.36, p.663-668, 2013.

[61] QUINTINO, M. S. M.; AGNES, L. Batch Injection Analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis.** v.16,p.513-523, 2004.

[62] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric and voltammetric detection in batch injection analysis. **Anal. Chem,** v.66, p.3145-3150, 1994.

[63] TANAKA, S.; YOSHIDA, H. Adsorptive voltammetry of lipoic acid and lipoamide, based on use of a catalytic hydrogen wave. **Talanta.** v.35, p.837-840, 1988.

[64] KANG, T. F.; SHI, Y. Y. Determination of lipoic acid using semi-differential cathodic stripping voltammetry in the presence of copper (II). **Analyst.** v.119, p.1067-1070, 1994.

- [65] SUGAWARA, K.; TANAKA, S.; HASEBE, K.; TAGA, M. Electroanalysis of lipoic acid using a carbon paste electrode modified with nickel [II]-cyclohexylbutyrate. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v.347, p.393-398, 1993.
- [66] ZIYATDINOVA, G. K.; BUDNIKOV, G. K.; POGOREL'TSEV, V. I. Electrochemical Determination of Lipoic Acid, **Journal of Analytical Chemistry**, v. 59, p. 288-290, 2004.
- [67] ZIYATDINOVA, G. K.; GRIGOR'EVA, L. V.; BUDNIKOV, G. K. Electrochemical Determination of Unithiol and Lipoic Acid at Electrodes Modified with Carbon Nanotubes, **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, p. 185-188, 2009.
- [68] MORITA, T; ASSUNÇÃO, R. M. V. Manual de soluções, reagentes e solventes. Edgar Blucher Ltda., São Paulo (SP), p. 273-277, 1972.
- [69] THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP 29). The National Formulary (NF 24). **The United States Pharmacopeia Convention**. Inc. Official monographs, Rockville: USP, 2009.
- [70] LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, p. 367–374, 2001.
- [71] FERRARI, P. E.; REZENDE, M. C. Carbono polimérico: processamento e aplicação. **Polímeros** v.8,p. 22-30, 1998.
- [72] CURIE, L. A. Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods Including Detection and Quantification Capabilities. (IUPAC Recommendation 1995), *Pure and Applied Chemistry*, v. 67, p. 1699-1723, 1995.

[73] SILVA, R. A. B.; MONTES, R. H.; MUNOZ, R. A.A.; RICHTER, E. M. Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection. **Food Chem.** v.133, p.200-204, 2012.

[74] TORMIN, T. F.; MUNOZ, R. A.A.; CUNHA, R. R.; RICHTER, E. M. .Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. **Talanta**.v.99, p.527-531, 2012.

[75] VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. 2. ed., São Paulo: Editora Atlas S. A., 1989.