

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE

ESCOLA DE ENGENHARIA

Curso de Química

RELATÓRIO FINAL

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MICROELETRODOS PARA ANÁLISE DE
ÁCIDOS ORGÂNICOS POR INJEÇÃO EM BATELADA E DETECÇÃO
ELETROQUÍMICA**

Jairo J. Pedrotti
Coordenador do projeto

Dezembro – 2015

RESUMO

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento de instrumentação e a aplicação de um procedimento analítico para determinação de ácido ascórbico (AA) em amostras de fármacos e sucos industrializados, empregando análise por injeção em batelada (BIA) e rede de microeletrodos de ouro modificados com plaina. Os microeletrodos foram obtidos de circuitos eletrônicos descartáveis fabricados em encapsulamento SMD (*Surface Mounted Device*). No desenvolvimento do procedimento analítico por BIA diversos parâmetros foram avaliados entre eles a influência do volume injetado, a vazão das injeções, a distância da ponteira em relação à superfície do microeletrodo de Pt e a influência da agitação do eletrólito de suporte. Com a injeção de 100 µL de amostra o procedimento analítico permite efetuar 360 determinações/hora. A faixa linear de trabalho foi de 1,0 a 120 µmol.L⁻¹ e a velocidade de agitação empregada foi de 5.000 rpm. Para assegurar boa seletividade na detecção de AA efetuaram-se determinações do analito de modo diferencial com destruição seletiva da espécie de interesse com a enzima ascorbato oxidase (AO) obtida de tecido vegetal (*Luffa cylindrica*).

Palavras-chave: BIA; ácido ascórbico; amperometria, redes de microeletrodos de platina.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos que possibilitam efetuar um grande número de análises em um curto período de tempo, combinado com a melhoria na precisão das informações analíticas e redução do custo individual de análise é um dos desafios na área de Química Analítica. O uso de reagentes químicos não agressivos ao meio ambiente é também um aspecto importante no desenvolvimento sustentável dos modernos sistemas de análises químicas (HORVÁTH, 2007).

Seguindo a evolução de procedimentos analíticos rápidos iniciados por SKEGGS em 1957 (SKEGGS, 1957), WANG e TAHA (WANG e TAHA, 1991) introduziram no início da década de 1990 a técnica de análise por injeção em batelada, BIA (*Batch Injection Analysis*) que consiste da injeção de um volume de amostra reprodutível (obtida com auxílio de uma micropipeta) sobre um detector imerso em uma solução de volume grande. Um sinal transiente é observado na passagem do analito sobre o sensor. A intensidade do sinal é relacionada com a concentração do analito na amostra. Na comparação com sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) os sistemas de análise em batelada apresentam reprodutibilidade, sensibilidade, consumo de amostra e frequência analítica comparáveis. Como vantagens os sistemas BIA dispensam o uso de bomba peristáltica, do injetor/comutador de amostras e dos tubos poliméricos para a confecção do sistema analítico. Adicionalmente, o tempo de contato da solução amostra com o detector é mais curto (< 10 s) o que contribui para minimizar os problemas de passivação ou diminuição da superfície ativa dos sensores eletroquímicos aplicados em amostras complexas.

Diversos detectores têm sido usados com sistema de análise em batelada. Entretanto, os mais populares são os sistemas BIA com detecção amperométrica e voltamétrica para aplicações em análises clínicas, ambientais e farmacêutica (QUINTINO et al. 2002; QUINTINO e ANGNES, 2004; QUINTINO et al., 2006; BRETT et al., 1996; BRETT et al., 1999). Entre os sensores amperométricos predominam o uso de eletrodos sólidos de tamanho convencional, embora o uso de eletrodos automáticos de gota de mercúrio apresente características atrativas para aplicações em amostras complexas (De DONATO et al. 1999).

O uso de microeletrodos oferece propriedades singulares em relação aos eletrodos convencionais na detecção voltamétrica e amperométrica que inclui: a) elevada velocidade no transporte de massa devido à camada de difusão radial; b) queda ôhmica desprezível, resultante da baixa intensidade de corrente que circula entre os eletrodos; c) elevada relação corrente faradaica/corrente capacitiva; d) baixa sensibilidade a vazão de soluções; e e) facilidade de miniaturização do detector (FLEISCHMANN et al., 1987; CORREIA et al., 1995). Em estudos de especiação química que visam avaliar as diferentes formas que um metal se encontra distribuído em águas naturais, o uso de microeletrodos confere uma vantagem adicional, pois dispensa a

adição de eletrólito de suporte ao meio para a análise voltamétrica, minimizando assim alterações nos equilíbrios químicos envolvidos no sistema em estudo.

Embora os microeletrodos ofereçam propriedades atrativas para detecção eletroquímica, o uso de microsensores em sistemas BIA ainda é escasso.

As vantagens do uso de microeletrodos de fibras de carbono em relação aos eletrodos convencionais em sistemas BIA com detecção voltamétrica foram demonstradas por Fungaro e Brett (Fungaro e Brett, 1999). Estes autores também exploraram redes de microeletrodos de mercúrio para determinação de metais-traços em águas de rio e de efluentes industriais por voltametria de redissolução anódica (BRETT et al., 1999). Mais recente, um procedimento analítico que utiliza um arranjo de 14 microeletrodos de ouro modificados com platina para a determinação de baixas concentrações de peróxido de hidrogênio, H_2O_2 foi descrito (PACHECO et al., 2011). O método de análise em batelada aplicado para determinação de H_2O_2 em águas de chuvas permite efetuar uma análise a cada 8 s e apresenta faixa linear de resposta de 1.0 a 100 $\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ L}^{-1}$ com injeção de 50 μL de solução amostra. A frequência analítica foi estimada em 360 determinações/hora.

Neste relatório descreve-se o desenvolvimento de um procedimento simples, rápido e de elevada seletividade para determinação amperométrica de ácido ascórbico (AA) em produtos farmacêuticos e sucos de frutas industrializados sobre uma rede de microeletrodos de ouro modificados com platina. O procedimento analítico possibilita a determinação de AA no intervalo de concentração de 1,0 a 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com uma frequência analítica de até 360 determinações/hora. Para assegurar boa seletividade na detecção de AA, realizou-se a determinação diferencial do analito com destruição seletiva de AA com enzima ascorbato oxidase obtida do tecido natural da bucha vegetal (*Luffa cylindrica*).

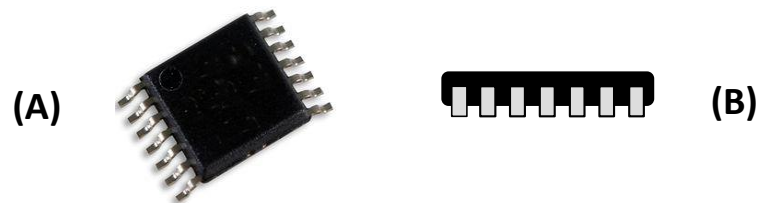
2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Construção de redes de microeletrodos de ouro

Os microeletrodos de ouro foram construídos a partir de circuitos integrados com encapsulamento SMD (Surface Mounted Device) de 14 terminais. As diferentes etapas do processo até a exposição dos pontos de ouro estão ilustradas na Figura 1. Inicialmente, a parte superior de polímero do chip eletrônico foi removida com uso sucessivo das lixas de 600, 1000 e 1200 mesh até que fossem rompidos e expostos os fios de ouro. Ao término de cada etapa, o chip era lavado exaustivamente com água desionizada e imerso em banho de ultrassom por 3 minutos para assegurar a remoção completa dos resíduos do processo de lixamento. Ao final do processo, 28 “pontos” de ouro podem

ser observados, sendo que 14 deles estão na parte externa do chip (Fig.1D). Cada “ponto” de ouro possui contato elétrico individual com os terminais, situados na lateral do chip. Finos fios de cobre foram soldados a esses terminais para estabelecer o contato elétrico com cada um dos microeletrodos de ouro.

Circuito integrado com encapsulamento SMD



Após tratamento mecânico

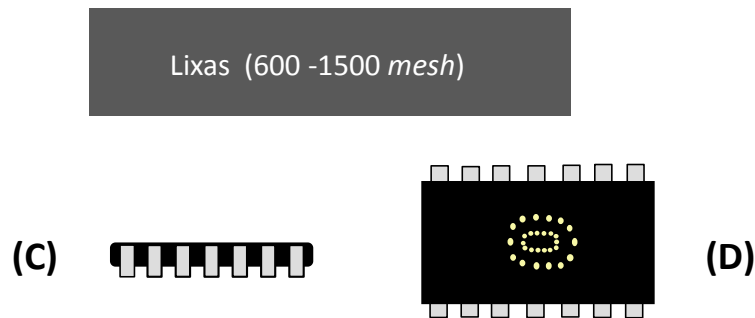


Figura 1. Detalhes da seqüência do processo de obtenção dos microeletrodos de ouro a partir dos circuitos integrados descartáveis. (A) Vista superior e (B) lateral do “chip” antes do processo de lixamento. A remoção da camada polímerica superior (C) com tratamento mecânico provoca o aparecimento dos discos de ouro (D).

A inspeção visual de todo processo mecânico foi acompanhada com uma lupa com aumento visual de 40 vezes. Após esta etapa, os microdiscos de ouro foram polidos com alumina Arotec com granulometrias que variaram de 1,0; 0,5 e 0,03 μm .

O chip foi então posicionado na extremidade inferior de um tubo de poliestireno (8,3 mm de diâmetro interno) e embutido com resina epóxi, conforme mostrado na figura 2. Após a secagem da resina realizou-se novo polimento mecânico com uma suspensão aquosa de alumina de diferentes granulometrias. Na seqüência, colocou-se o microeletrodo (corpo do eletrodo + chip) em banho de ultrassom para limpeza por 60 segundos em uma solução de HNO_3 10% seguido de etapas de lavagem com água desionizada. (PACHECO et al, 2011).

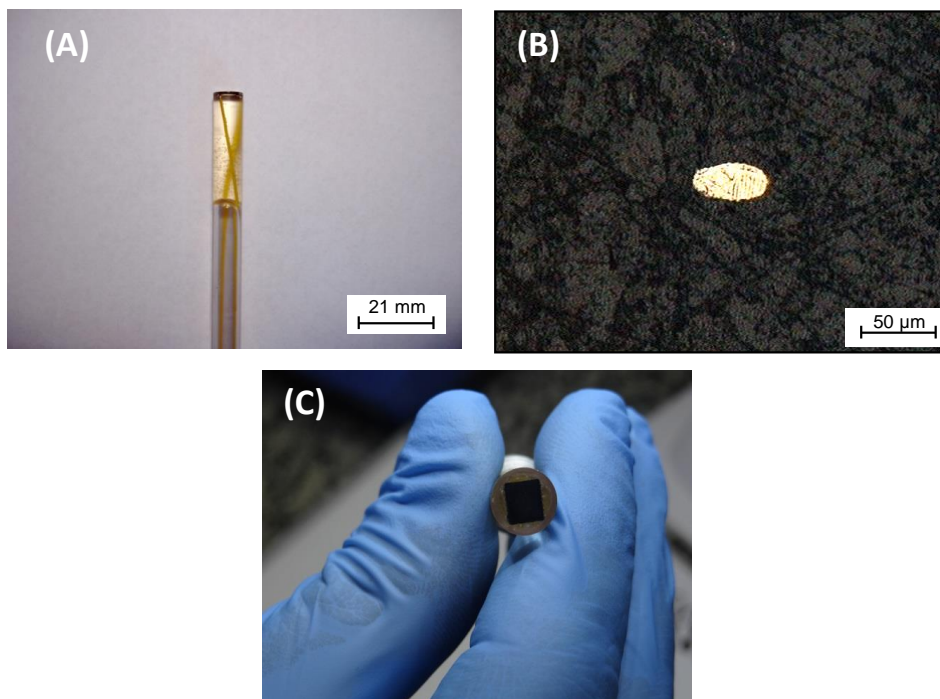


Figura 2. Detalhes da instalação da rede de microeletrodos no tubo de poliestireno (A); vista de um típico microeletrodo de ouro produzido a partir dos chips SMD (B) e a vista frontal do posicionamento do chip usado nas medições eletroquímicas.

2.2. Célula eletroquímica

A célula eletroquímica do tipo “wall-jet” utilizada nestas determinações é apresentada na figura 3. Uma solução tampão de K_2HPO_4/KH_2PO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}=6,9$) foi utilizada como eletrólito de suporte. Os sinais de corrente de oxidação de AA sobre a rede de microeletrodos de Pt nas medições amperométricas foram realizadas no potencial de $+0,5 \text{ V}$ vs. mini eletrodo de referência de Ag/AgCl (PEDROTTI et al., 1996).

2.3 Instrumentação

Todas as medidas voltamétricas e amperométricas foram feitas com potenciostato Metrohm, modelo PGSTAT 12. Para injeção de volume reprodutível de solução utilizou-se micropipeta motorizada Eppendorf Repipetador Multipette Xstream.

2.4 Soluções e reagentes

As soluções foram preparadas com reagentes químicos de grau analítico e sem purificação prévia. O ácido ascórbico, monohidrogenofosfato e dihidrogenofosfato de potássio foram obtidos da Merck.

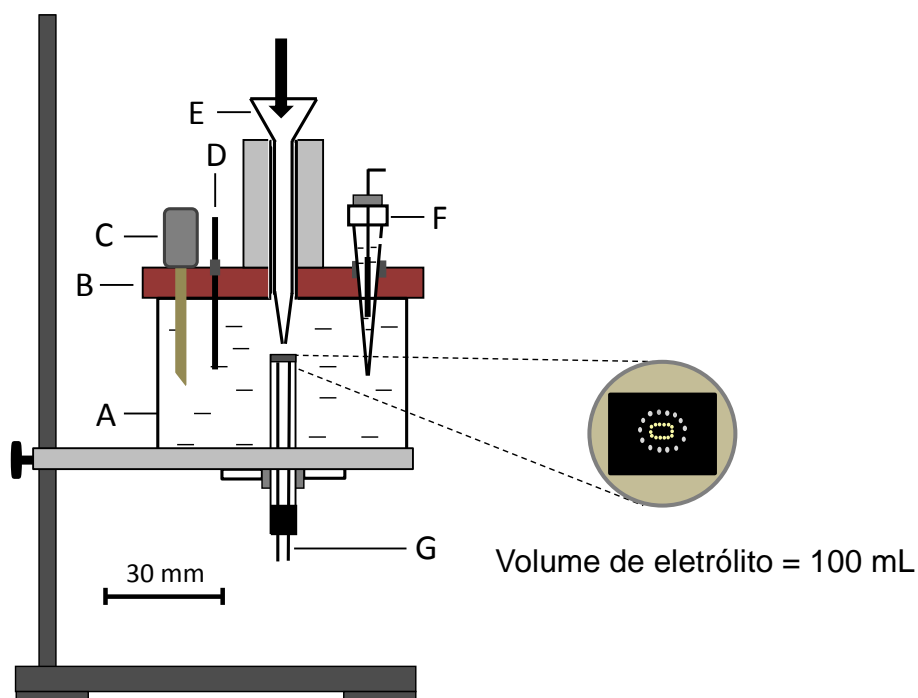


Figura 3. Diagrama esquemático da célula eletroquímica confeccionada para medições com BIA. **A)** frasco de poliestireno; **B)** cabeçote de acrílico da célula; **C)** mini agitador mecânico; **D)** eletrodo auxiliar; **E)** ponteira de injeção da solução padrão ou amostra; **F)** eletrodo de referência Ag/AgCl; **G)** eletrodo de trabalho; O detalhe mostra o posicionamento da rede de microeletrodos em relação a ponteira da micropipeta usada para injeção de solução.

As pastilhas farmacêuticas de diferentes marcas foram adquiridas em farmácias e os sucos industrializados (uva, morango, pêssigo, maracujá, caju, laranja) em supermercado, ambos na região central de São Paulo. A enzima ascorbato oxidase foi obtida do tecido vegetal (*Luffa cylindrica*) (Figura 4) adquirida em lojas especializadas. O tecido vegetal foi armazenado em freezer a -18°C a fim de minimizar sua degradação e consequente perda da atividade enzimática. Antes da realização da análise, o tecido foi retirado da refrigeração para que ocorresse seu descongelamento. Após esse processo, foi cortado em pequenos cubos com o auxílio de um bisturi. Empregou-se na análise somente o mesocarpo (região interna) do tecido vegetal sem a presença da casca. Este material foi pesado, aproximadamente 0,5 g, e colocado em contato com a amostra durante 20 minutos.



Figura 4. Detalhes do tecido da bucha vegetal ((*Luffa cylindrica*) usada como fonte da enzima ascorbato oxidase.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente o perfil de resposta da rede de microeletrodos de Au foi avaliada através de medições voltamétricas de $K_3[Fe(CN)_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$. Esse estudo permitiu avaliar se a superfície dos microeletrodos apresentava o perfil sigmoidal esperado, indicativo da difusão radial, tipo de transporte de massa predominante em microeletrodos.

O afastamento desse perfil demonstra a necessidade de uma maior limpeza da superfície dos microeletrodos. A figura 5 mostra o perfil voltamétrico típico obtido com uma rede de 14 microeletrodos de ouro, indicando um bom comportamento eletroquímico do conjunto de microeletrodos desenvolvidos.

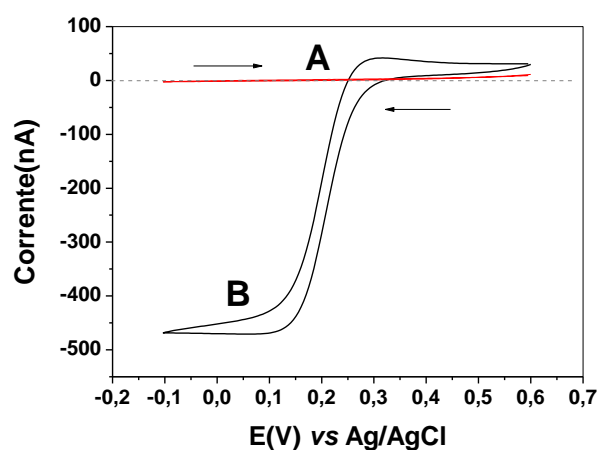


Figura 5. Voltamogramas cíclicos obtidos com rede de 14 microeletrodos de Au: (A) Solução de KCl $0,10 \text{ mol. L}^{-1}$ – eletrólito de suporte; (B) Solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$; Varredura: 20 mV.s^{-1} . As setas indicam o sentido de varredura de potencial.

Para determinação do potencial de trabalho nas medições amperométricas de AA realizou-se estudo por voltametria cíclica com microeletrodos de ouro modificados com Pt empregando uma solução de AA $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de tampão fosfato $0,10 \text{ mol. L}^{-1}$. O voltamograma cíclico de AA mostra que a oxidação eletroquímica do analítico inicia próximo de $0,0 \text{ V}$ e alcança um patamar de corrente a partir de $+0,40 \text{ V}$ e se estende até $+0,70 \text{ V}$. Baseado neste resultado, adotou-se o potencial de $+0,5 \text{ V vs Ag/AgCl}$ para as medições amperométrica de AA que estão descritas nas próximas etapas deste relatório.

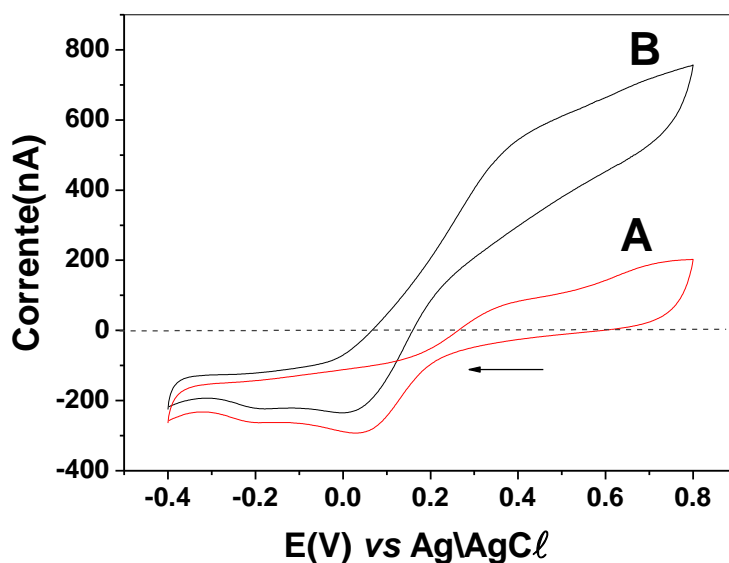


Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos com rede de 14 microeletrodos de ouro modificados com Pt: (A) Solução de tampão fosfato $0,10 \text{ mol. L}^{-1}$; (B) Solução de AA $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de tampão fosfato $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$; Velocidade de varredura: 20 mV.s^{-1} . A seta indica o sentido da varredura de potencial.

3.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS NO SISTEMA BIA

Alguns parâmetros foram estudados na otimização do procedimento analítico para as medições em BIA entre eles: distância da ponteira em relação à superfície dos microeletrodos; a influência do volume injetado; a vazão das injeções e a influência de agitação do eletrólito sobre o sinal analítico.

As respostas do sistema analítico foram avaliadas através dos sinais de corrente de oxidação obtidos com soluções padrões de AA com concentrações de $80 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e a escolha das condições ótimas de trabalho levou em consideração a condição analítica de maior sensibilidade, isto é, as condições que apresentavam sinais de corrente mais elevados, e reprodutibilidade.

A influência da distância da ponteira da micropipeta em relação à superfície da rede de microeletrodos foi avaliada no intervalo de 1,0 a 5,0 mm. O perfil de resposta do sensor amperométrico em função da variação da distância da ponteira da micropipeta, ilustrado na Fig.7, mostra que o sinal de corrente alcança os valores mais elevados entre 2 e 3 mm. Para distância menores de 2 mm, provavelmente a alíquota da amostra não consegue atingir todos os microeletrodos de Pt durante a injeção, enquanto que para distância superiores a 3 mm o aumento da dispersão da amostra deve ser o fator contribuinte para a diminuição do sinal de corrente. Baseados nestes resultados, adotou-se a distância de 2 mm para os próximos experimentos.

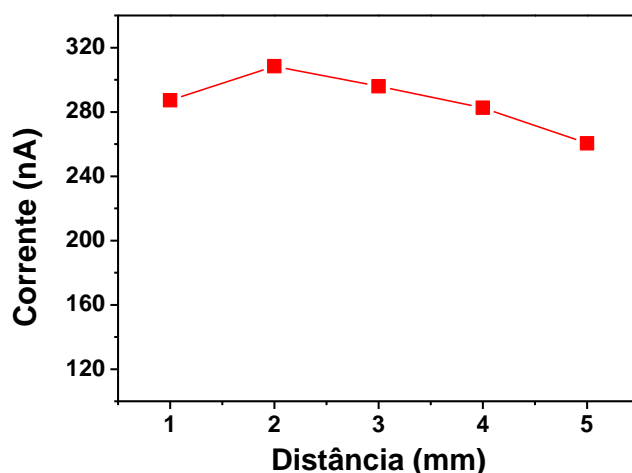


Figura 7. Influência da distância entre a ponta da micropipeta e a superfície dos microeletrodos de Pt sobre a resposta analítica. Concentração de AA: $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

O efeito do volume injetado foi estudado no intervalo de 50 a 100 μL . O perfil típico de resposta dos microsensores de ouro modificados Pt em função do volume injetado, apresentado na Fig.8, mostra que o sinal de corrente se mantém quase constante entre 50 e 70 μL e sofre um aumento com injeção de volume maior.

Considerando que a maior sensibilidade é assegurada entre 90 e 100 μL , adotou-se a injeção de 100 μL para a execução dos próximos experimentos.

A micropipeta motorizada Eppendorf Repipetador Multipette Xstream permite trabalhar com injeção de volumes que varia de 10,5 a 138 $\mu\text{L s}^{-1}$.

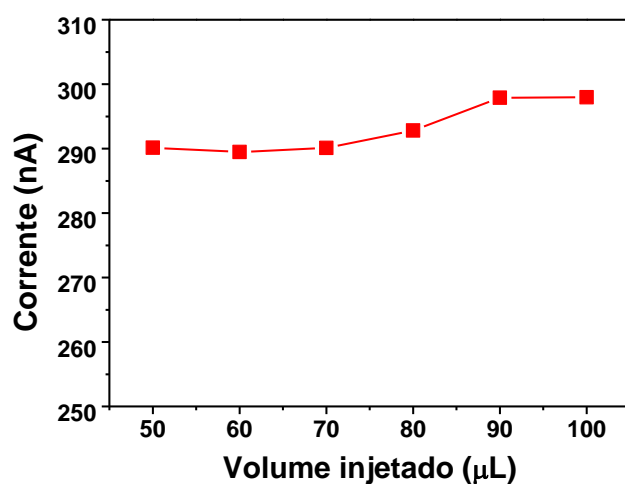


Figura 8. Variação do sinal de corrente em função do volume injetado obtido com injeções sucessivas de 100 µL de solução de AA 80 µmol L⁻¹ sob vazão de 85,3 µL s⁻¹. Potencial do eletrodo de trabalho: +0,5 V vs Ag/AgCl.

O perfil de resposta do sensor amperométrico em função da variação da vazão de injeção de solução está indicado na figura 9.

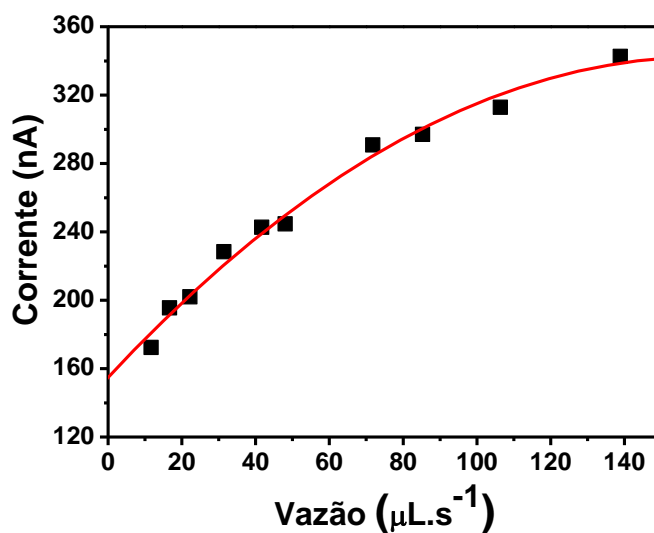


Figura 9. Variação do sinal de corrente em função da vazão de injeção de solução obtido com injeções sucessivas de 100 µL de solução de AA 80 µmol L⁻¹. Potencial do eletrodo de trabalho: +0,5 V vs Ag/AgCl.

Observa-se que o sinal de corrente anódica aumenta com o incremento da vazão o que é esperado, devido a maior eficiência no transporte de massa do analito para a superfície do eletrodo. Para

vazão acima de $85,3 \mu\text{L s}^{-1}$ observou-se, no entanto, que a reprodutibilidade dos sinais diminuiu, provavelmente devido a falta de sincronismo entre a rápida injeção da amostra e a amostragem dos eventos de corrente no conversor de corrente-tensão. Para aplicações praticas, adotou-se a vazão de $85,3 \mu\text{L s}^{-1}$ que assegura boa sensibilidade e melhor reprodutibilidade das medições na comparação com as vazões mais elevadas.

A influência da agitação da solução de eletrólito de suporte sobre o sinal analítico foi avaliada com auxílio de um mini-agitador mecânico confeccionado no laboratório e instalado no cabeçote da célula eletroquímica. Sob controle da tensão aplicada no mini motor, o agitador permite trabalhar com rotação que variam de 1000 a 9000 rpm. O registro dos sinais de corrente em função da agitação indicou que a sensibilidade do sensor não sofre variação significativa ($< 5\%$) quando se compara os sinais de pico obtidos com eletrólito sem agitação e com agitação nas diversas rotações após injeções de solução de AA sob vazão de $85,3 \mu\text{L s}^{-1}$. Entretanto, o processo de lavagem dos sinais de pico se altera significativamente. Sem agitação do eletrólito de suporte, o tempo gasto para uma determinação de AA é de 20 s (Fig. 10A) enquanto que com agitação do eletrólito a 5.000 rpm o tempo médio gasto é de apenas 10 s (Fig. 10B), situação que permite alcançar uma frequência analítica de 360 determinações por hora.

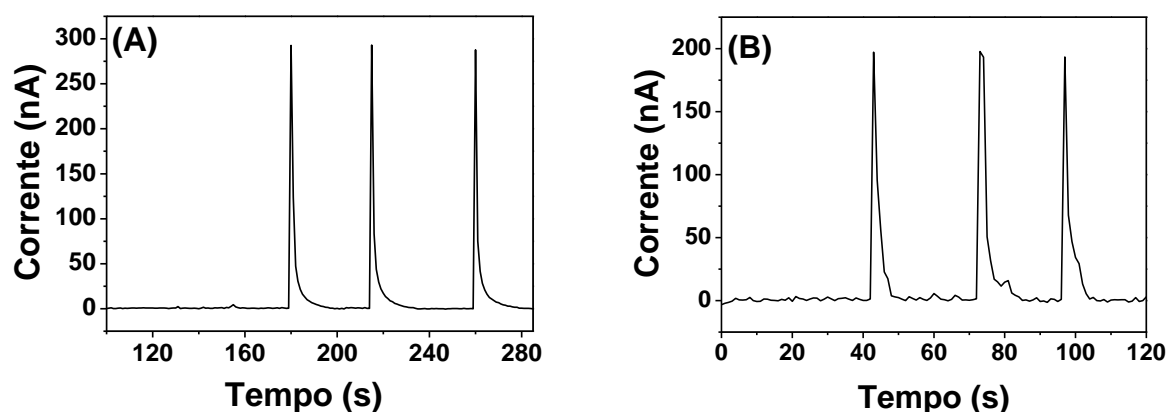


Figura 10. (A) Injeções repetitivas com de $100 \mu\text{L}$ de uma solução de AA $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em meio de solução tampão fosfato sem agitação e (B) com agitação de eletrólito suporte.

Os próximos experimentos foram realizados sob agitação da solução de eletrólito de suporte.

A faixa linear de resposta do sensor foi avaliada no intervalo de $1,0$ a $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 11), condição que permite realizar medidas cuja resposta pode ser relacionada diretamente com a concentração do analito. A coeficiente de correlação dos sinais de corrente em nA (10^{-9} A) com as concentrações de AA apresentou valor de 0,999; com coeficiente angular de $2,32 \text{ nA L. mol}^{-1}$ e coeficiente linear de $16,1 \text{ nA}$.

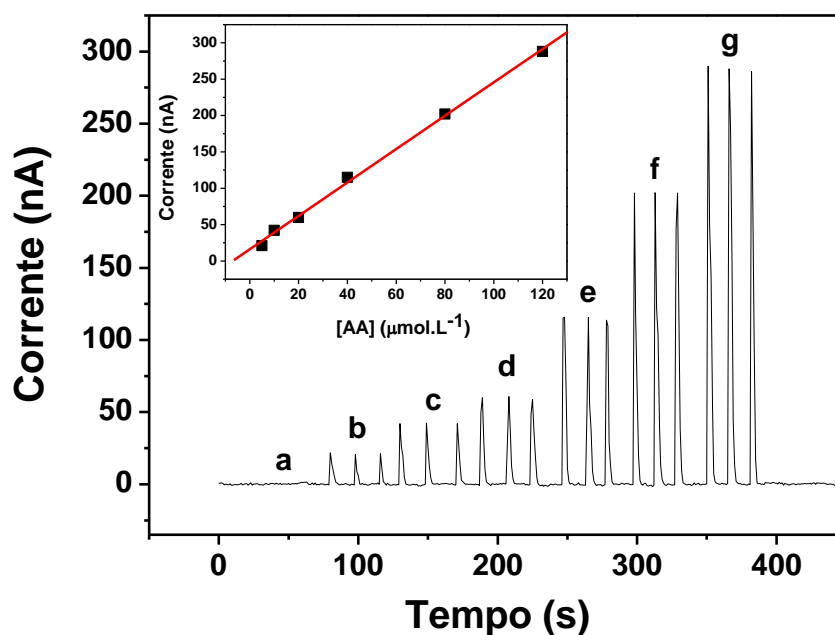
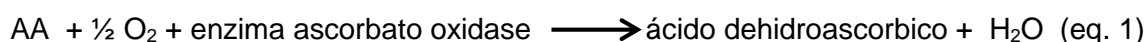


Figura 11. Injeções em triplicata de soluções padrões de AA em diferentes concentrações: **a)** Eletrólito de suporte; **b)** 5 μmol.L⁻¹; **c)** 10 μmol.L⁻¹; **d)** 20 μmol.L⁻¹; **e)** 40 μmol.L⁻¹; **f)** 80 μmol.L⁻¹ e **g)** 120 μmol.L⁻¹ de AA em meio de tampão fosfato 0,10 mol.L⁻¹. No destaque interno tem-se a resposta dos sinais de corrente de pico em função da concentração de AA feitas sob agitação de eletrólito. Eletrodo de trabalho: +0,5 V vs Ag/AgCl.

Para determinar o limite de detecção do método, preparou-se uma curva de calibração no intervalo de concentração de 2,0 a 12 μL (sinais não estão apresentados). Nesta faixa de concentração a lavagem do detector é rápida e se optou por realizar as medições sem agitação do eletrólito de suporte para minimizar o ruído no sinal da corrente residual. A análise por regressão linear dos sinais de corrente em função da concentração de AA é linear o limite de detecção estimado através do sinal mínimo de corrente que se diferencia do desvio padrão do “branco” (3σ) foi de 0,6 μmol L⁻¹

Com o intuito de minimizar a presença de possíveis interferentes nas soluções amostras, as medidas das concentrações do analito foram feitas de modo diferencial, com destruição seletiva do ácido ascórbico através da enzima ascorbato oxidase (equação.1) obtida de tecido vegetal (*Luffa cylindrica*).



A figura 12 mostra sinais de corrente obtidos com uma solução padrão de AA 80 μmol L⁻¹ na ausência (b) e na presença de tecido vegetal (c). Observa-se que o sinal de corrente anódica após o tratamento enzimático é similar ao sinal da corrente residual registrado com adição de eletrólito

de suporte (a) indicando que a degradação do analito é completa na condição experimental adotada. Cabe mencionar que após a oxidação do AA ácido dehidroascórbico, este sofre uma rápida reação de hidratação e forma ácido 2,3-dicetogluconico, que é a espécie não eletroativa e não apresenta sinal analito sobre a rede de microeletrodos de Pt.

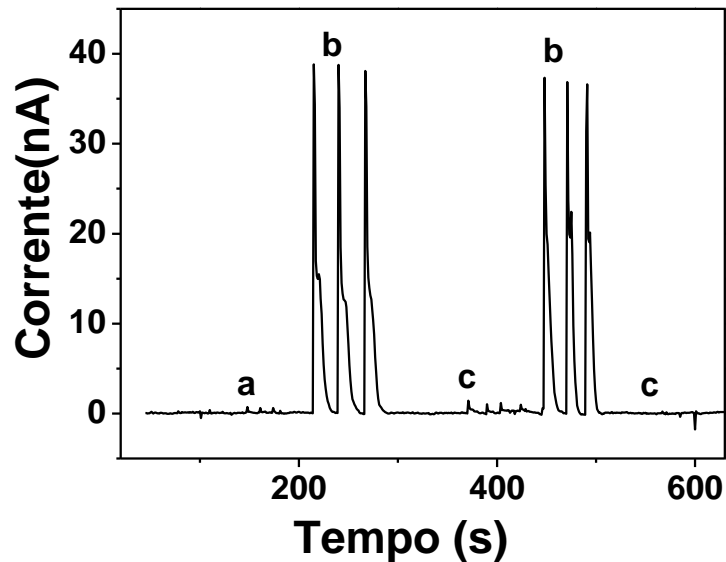


Figura 12. (a) Injeções em triplicata da solução de tampão $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; (b) solução de AA de $80 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e (c) sinal de corrente obtido após tratamento da solução de AA com enzima AO.

Finalizada esta etapa, o procedimento analítico foi aplicado para determinação de ácido ascórbico em amostras de pastilhas farmacêuticas e em sucos industrializados. Os resultados desta etapa do trabalho são descritos a seguir.

3.2 APLICAÇÕES PRÁTICAS

Inicialmente, o procedimento analítico foi aplicado na determinação de AA em pastilhas farmacêuticas. A figura 13 apresenta os sinais de corrente típicos para determinação de AA na pastilha A e a resposta analítica da amostra é comparada com a resposta dos padrões para concentrações equivalentes.

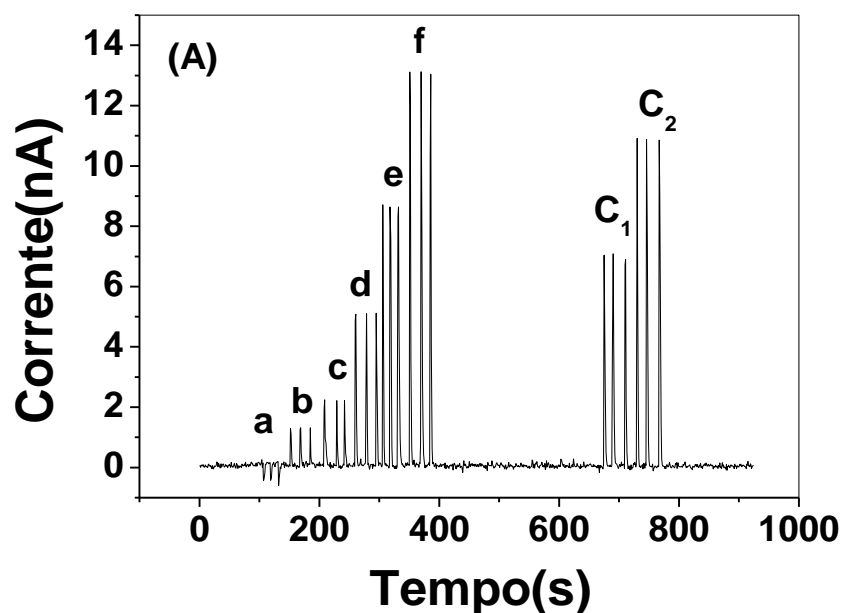


Figura 13. (A) Injeção em triplicata de 100 μL : a) solução tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} soluções padrão de AA com concentrações de: b) 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; c) 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; d) 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; e) 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; f) 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; C1) solução amostra (1) de fármaco A ; C2) solução amostra (2) do fármaco A.

Observa-se que os sinais de corrente obtidos com as soluções amostras tem perfil similar ao dos padrões sugerindo que o efeito de matriz não é significativo. Entretanto, a possível presença de interferentes na amostra que são eletroativos no potencial do eletrodo de trabalho não são diferenciados através das medições amperométrica diretas. Para melhorar a exatidão nas determinações analíticas, a adoção das medições diferenciais com degradação seletiva do analito com tecido vegetal contendo a enzima AO confere melhor seletividade, conforme discutido anteriormente.

A figura 14 mostra que o tratamento de uma solução amostra de um comprimido farmacêutico com enzima AO reduz o sinal de corrente anódica devido a oxidação do AA mas não atinge o valor inicial da linha base, diferente do que foi registrado com soluções padrões de AA (Fig. 12). Os pequenos sinais de corrente de pico observados são resultantes da presença de compostos eletroativos que contribuem no sinal de corrente total e, se não descontados do sinal analítico das amostras, irão introduzir um erro sistemático nas determinações analíticas do AA, reduzindo a exatidão do método. Para fins de quantificação do analito, o sinal de corrente anódica total é subtraído do sinal de corrente de pico das espécies que não são degradadas pelo processo enzimático.

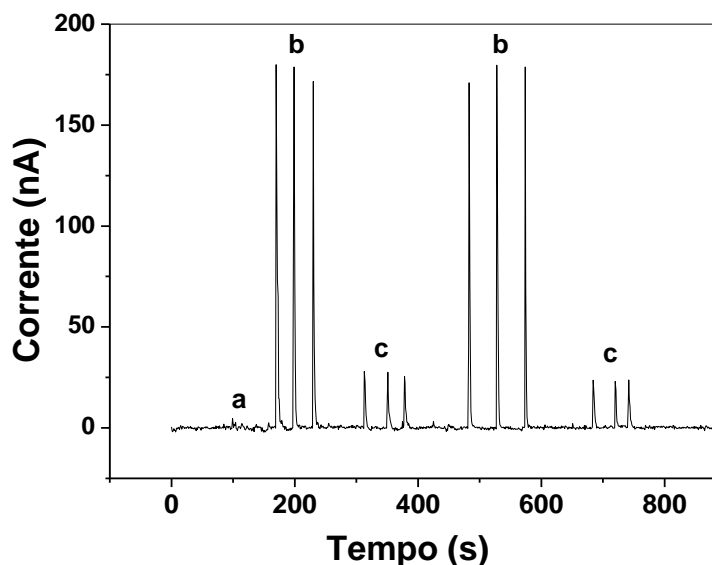


Figura 14. Injeções em triplicata de 100 μL de (a) solução de tampão fosfato 0,10 mol.L⁻¹; (b) solução amostra de fármaco contendo aproximadamente 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AA; (c) sinal de corrente após tratamento da solução amostra com enzima AO.

A tabela 1 indica a concentração de AA informada no rótulo do produto e a concentração determinada experimentalmente empregando o sistema BIA proposto. A fim de assegurar boa exatidão das determinações de AA realizaram-se sempre duas séries de medidas de cada uma das amostras. Observando-se os dados na tabela pode-se perceber que houve uma maior diferença entre os valores teóricos e experimentais de AA na amostra B. Embora haja essa variação no valor de concentração, os desvios padrões nos resultados foram baixos, demonstrando que há boa precisão nas determinações analíticas. Pode-se afirmar que há boa exatidão nas medidas, uma vez que os valores tabelados e os obtidos experimentalmente encontram-se próximos.

A segunda aplicação do sistema envolveu a análise de AA em amostras de sucos industrializados utilizando o método de adição de padrão. Esta ferramenta analítica foi adotada em consequência do efeito de matriz observado nas amostras de sucos, devido à presença de outros componentes em quantidades significativas e da menor concentração de AA nestas amostras em comparação com as amostras de pastilhas farmacêuticos. Para o caso dos fármacos, dois fatores contribuíram para minimizar o efeito de matriz no procedimento analítico de quantificação: a elevada concentração do analítico na amostra e o elevado fator de diluição adotado no preparo das soluções amostras.

Tabela 1. Concentrações de AA na solução amostra (g/100 mL) obtida pela dissolução de massa da pastilha farmacêutica baseado na quantidade informada no rótulo do produto e a concentração de AA determinada experimentalmente empregando o sistema BIA proposto.

Amostras	Conc. de AA indicada	Conc. de AA encontrada
A1	1,00	1,04 ± 0,09
A2	1,00	1,05 ± 0,03
B1	0,5	0,469 ± 0,09
B2	0,5	0,470 ± 0,020
C1	1,00	1,05 ± 0,10
C2	1,00	0,992 ± 0,100

Sinais típicos de correntes registrados com solução amostra de suco de uva durante uma determinação de AA são apresentados na figura 15. Como se observa os sinais de pico são bem definidos e aumentam proporcionalmente com adição crescente da concentração de AA.

Os resultados das determinações de AA nas diversas amostras de sucos industrializados avaliadas estão apresentados na tabela 2.

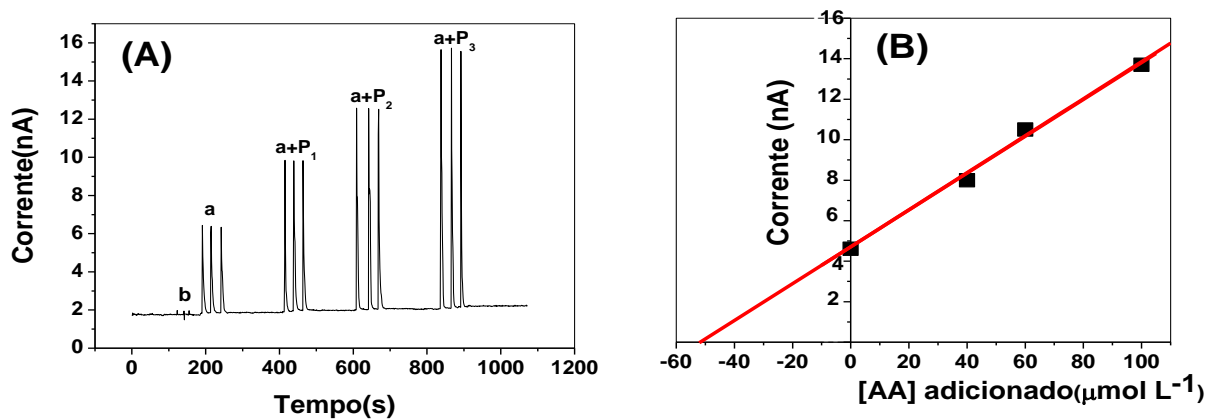


Figura 15. (A) Injeções em triplicata de 100 μL de solução de AA em suco de uva: (b) solução de tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} ; (a) Amostra de suco de uva; solução amostra+padrão₁ de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; solução amostra+Padrão₂ de 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; solução amostra+Padrão₃ de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. (B) Curva de calibração resultante dos sinais de corrente de pico em função da concentração de AA. Potencial do eletrodo de trabalho: +0,5 V vs Ag/AgCl

Tabela 2. Concentrações de AA (mg/200 mL) indicada no rótulo e a encontrada nas determinações analítica empregando sistema BIA proposto.

Amostras de sucos	Concentração de AA indicada	Concentração de AA encontrada
Uva	14,0	17,6 ± 0,2
Morango	28,0	23,4 ± 0,01
Maracujá	30,0	24,5 ± 0,8
Laranja	70,0	72,3 ± 0,3
Pêssego	30,0	20,9 ± 0,3
Caju	95,0	76,7 ± 0,5

As informações na tabela mostram boa concordância entre os valores indicados no rótulo dos produtos comerciais e os valores determinados experimentalmente. A fim de avaliar a exatidão das determinações analíticas nestas amostras, testes de recuperação do analito foram efetuados em amostras: de sucos de uva, morango e de laranja e pêssego. A taxa de recuperação do analito adicionado nestas amostras variou entre 96% e 101%, indicando boa exatidão nas determinações.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os microeletrodos obtidos a partir de *chips* CI eletrônicos são fáceis de serem construídos, não exigem ferramentas especiais em nenhuma etapa no processo, tem baixo custo e são bastante versáteis para adaptação em células eletroquímicas para uso em sistemas estacionários e em fluxo. O emprego de microeletrodos em rede representa um ganho em termo de resposta analítica, pois a combinação de vários microeletrodos individuais aumenta o sinal analítico, uma vez que a resposta do conjunto é a soma das respostas individuais. Aliado a isso, a utilização de microeletrodos modificados confere flexibilidade ao método, porque sua superfície pode ser renovada facilmente, ao menor sinal de queda na sensibilidade, através de polimento mecânico e nova deposição de filme.

A metodologia analítica proposta para determinação de AA em pastilhas farmacêuticas e sucos industrializados representa uma alternativa rápida e altamente seletiva para aplicações em análises de rotina. Devido rápida resposta do detector - o tempo gasto para efetuar uma determinação é da ordem de 10 s, é possível confeccionar uma curva de calibração num intervalo de tempo inferior a 5 minutos, o que representa uma grande vantagem em relação aos procedimentos convencionais

de análise. Os volumes injetados são pequenos, aspecto esse que otimiza o tempo na preparação de padrões e amostras. Esta etapa muitas vezes leva um tempo considerável na análise, diminuindo a frequência analítica. Outro fator interessante é o emprego de soluções aquosas diluídas que são pouco agressivas ao meio-ambiente e à saúde humana. Aliado a isso os pequenos volumes injetados representam uma geração mínima de efluentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRETT, C. M. A.; BRETT, M. O.; TUGULEA, L., *Anal. Chim. Acta*, 322 (1996) 151.

BRETT, C. M. A.; FUNGARO, D. A.; MORGADO, J. M.; GIL, M. H., *J. Electroanal. Chem.* 26 (1999) 468.

BRETT, C. M. A.; INZELT, G.; KERTESZ, V., *Anal. Chim. Acta*, 385 (1999) 119.

CORREIA, A.N.; MASCARO, L.H.; MACHADO, S.A.S.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A., *Quím. Nova*, 18 (1995) 475.

De DONATO, A.; PEDROTTI, J. J.; GUTZ, I. G. R., *Electroanalysis*, 11 (1999) 1124.

GIMENES, L.; GRANADO e SÁ, M.; ZANOTTO, F.; PEDROTTI, J.J., **Avaliação de Cobre em Hemolinfa de Caranguejos Usando Análise em Fluxo com Detecção Voltamétrica sobre Arranjo de Microeletrodos**. XVI Simposio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 340-1, Águas de Lindóia, SP, 2007.

FLEISCHMAN, M.; PONS, S.; ROLISON, D.R.; SCHIMIDT, P.P. (Eds) **Ultramicroelectrodes**, Datatech, Morganton, 1987.

HORVÁTH, I.T., *Chem. Rev.* 107 (2007) 2167.

PACHECO, B.D.; VALÉRIO, J.; ANGNES, L.; PEDROTTI, J.J., *Anal. Chim. Acta*, 696 (2011) 59.

PEDROTTI, J.J.; ANGNES, L.; GUTZ, I.G.R., *Electroanalysis*, 8 (1996) 673.

QUINTINO, M. S. M.; ARAKI, K.; TOMA, H. E.; ANGNES, L., *Electroanalysis* 14 (2002) 1629.

QUINTINO, M. S. M.; ARAKI, K.; TOMA, H. E.; ANGNES, L., *Talanta*, 68 (2006) 1281.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L., *Electroanalysis* 16 (2004) 513.

SKEEGS, L.T., *Am. J. Clin. Pathol.*, 28 (1957) 311.

WANG, J.; TAHA, Z., *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1053.