

2015

Dissertação de Mestrado

Universidade Federal de
Santa Catarina

Programa de
Pós-Graduação em
Química

[http://
ppgqmc.posgrad.ufsc.br](http://ppgqmc.posgrad.ufsc.br)

Campus Universitário
Trindade

Florianópolis- SC

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Química,
Departamento de Química,
do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da
Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito para obtenção do
Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Almir Spinelli, Dr.

Florianópolis, 2015

Determinação eletroanalítica da vitamina B₂ (riboflavina) em formulações farmacêuticas utilizando o
eletrodo de filme de bismuto
Éder da Silva e Sá

Determinação Eletroanalítica da
Vitamina B₂ (Riboflavina)
em Formulações Farmacêuticas
Utilizando o Eletrodo de
Filme de Bismuto

Éder da Silva e Sá

Este trabalho foi
desenvolvido no
Grupo de Estudos de
Processos
Eletroquímicos e
Eletroanalíticos
(GEPEEA),
laboratório 310 do
DQ- UFSC.

Orientador:

Prof. Almir Spinelli, Dr.



Universidade Federal de Santa Catarina
Programa de Pós-Graduação em
Química

Éder da Silva e Sá

**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DA VITAMINA B₂
(RIBOFLAVINA) EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS
UTILIZANDO ELETRODO DE FILME DE BISMUTO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

**Florianópolis
2015**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sá, Éder da Silva e
Determinação eletroanalítica da vitamina B2 (riboflavina)
em formulações farmacêuticas utilizando o eletrodo de filme
de Bismuto / Éder da Silva e Sá ; orientador, Almir
Spinelli - Florianópolis, SC, 2015.
120 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

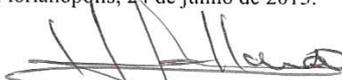
1. Química. 2. Eletrodo de filme de bismuto. 3. Vitamina
B2. 4. Eletroanalítica. 5. Fármacos. I. Spinelli, Almir.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

Éder da Silva e Sá

**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DA VITAMINA B₂
(RIBOFLAVINA) EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS
UTILIZANDO ELETRODO DE FILME DE BISMUTO**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do Título de Mestre em Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 24 de junho de 2015.



Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo, Dr.
Coordenador do Programa

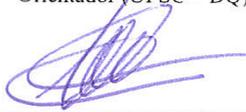
Banca Examinadora:



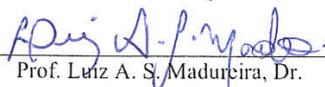
Prof. Almir Spinelli, Dr.
Orientador (UFSC – DQ)



Prof.ª Daniela Brondani, Dr.ª
UFSC – Campus Blumenau



Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.
UFSC – DQ



Prof. Luiz A. S. Madureira, Dr.
UFSC – DQ

Este trabalho foi desenvolvido no Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos (GEPEEA), laboratório 310 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Prof. Dr. Almir Spinelli.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Almir Spinelli, pela confiança em mim depositada, pela paciência, pelos ensinamentos que contribuíram para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Aos colegas e amigos do Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos (GEPEEA): Cacah (in memoriam), Camila, Edinho, Fernando, Gabriel, Giles, Iolana, Jamille, Jonas, Keliana, Lara, Paulo, Rodolfo e Schay, pela convivência, auxílio, ajuda e principalmente pelas trocas e discussões na realização deste trabalho.

Aos meus afilhados Bernardo e Rebeca, que me ensinaram a amar, a viver o presente e a acreditar no futuro.

À Josilaine Aparecida Mozer, por fazer parte da minha vida, por me apoiar e incentivar sempre para finalizar este trabalho e pelos momentos de alegria, tristeza, preocupações e felicidades compartilhados.

Aos meus pais Rosa e Olisses (in memoriam), aos meus familiares e aos meus amigos: pelo amor, apoio, carinho, sorrisos, nos meus bons e maus momentos. Também agradeço a eles por participarem das minhas conquistas e da construção dos meus sonhos, em especial, a finalizar essa etapa.

Aos Professores Almir Spinelli, Daniela Brondani, Gustavo Amadeu Micke, Iolanda da Cruz Vieira e Luiz Augusto dos Santos Madureira, por aceitarem compor a banca examinadora.

Ao Dr. Ismael Casagrande Bellettini, pela ajuda nos experimentos de fluorescência.

A todos os professores do Departamento de Química, que contribuíram de alguma forma para a minha formação, construção e desenvolvimento dos conhecimentos em química.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSC, pela oportunidade de ter acesso a uma formação acadêmica com qualidade.

Muito Obrigado!

TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O MESTRADO

- Artigo publicado em revista científica:

SÁ, Éder S., SILVA, Paulo S. da, JOST, Cristiane L., SPINELLI, Almir. Electrochemical sensor based on bismuth-film electrode for voltammetric studies on vitamin B₂ (riboflavin). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 209, p. 423–430, 2015.

- Resumos publicados em congressos:

1 – SÁ, E. S.; SPINELLI, A.; KREFT, G. L.; LIMA, C. A. Estudo da aplicabilidade do eletrodo de filme de bismuto para a determinação simultânea de vitaminas do complexo B. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis, SC. Livro de Resumos, 2011.

2 – SÁ, E. S.; SPINELLI, A.; KREFT, G. L.; de SOUZA, F. S. Estudo eletroquímico da riboflavina sobre eletrodo de filme de bismuto. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis, SC. Livro de Resumos, 2011.

3 – LIMA, C. A.; SANTOS, K. D.; SÁ, E. S.; SPINELLI, A. Estudo eletroquímico do hormônio progesterona sobre o eletrodo de filme de bismuto. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis, SC. Livro de Resumos, 2011.

4 – KREFT, G. L.; SÁ, E. S.; BRAGA, O. C.; SPINELLI, A. Desenvolvimento de método eletroanalítico para determinação de vitamina B12 em eletrodo de filme de bismuto. In: XVIII Encontro de Química da Região Sul, 2010, Curitiba, PR: Anais de XVIII SBQ SUL, 2010.

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para determinação da vitamina B₂ (riboflavina) em fármacos usando o eletrodo do filme de bismuto (BiFE), tendo como substrato o eletrodo de cobre. O BiFE foi confeccionado no modo *ex situ*, em solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ e Bi(III) 20,0 mmol L⁻¹, por cronoamperometria. Os parâmetros de deposição do BiFE foram otimizados em função da resposta eletroquímica da vitamina B₂, sendo selecionados o potencial de deposição de -0,15 V por 210 s. A determinação da vitamina B₂ sobre o BiFE forneceu a maior intensidade de corrente em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ em pH 4,0, como eletrólito de suporte, e com os parâmetros experimentais adotados para a voltametria de onda quadrada como: frequência de aplicação dos pulsos de 30 Hz, a amplitude de aplicação dos pulsos de potencial de 70 mV e o incremento de potencial de 5 mV. Foi utilizada uma etapa de pré-concentração, aplicando um potencial de -1,0 V, com um tempo de 300 s para melhorar a sensibilidade e o perfil voltamétrico. O estudo por voltametria cíclica (CV) demonstrou que a vitamina B₂ é submetida a uma transferência de elétrons quase-reversível controlada por adsorção. Os potenciais de pico observados são dependentes do pH. A reação envolve o mesmo número de prótons e elétrons. A curva de calibração fornecida pela voltametria de redissolução adsorptiva no modo onda quadrada (SWAdSV) respondeu de forma linear em duas faixas: a primeira, em uma região linear entre as concentrações 0,3 a 0,8 μmol L⁻¹ (20,70 μA L mol⁻¹, $r = 0,9925$) e a segunda, entre as concentrações 1,0 a 9,0 μmol L⁻¹ (3,57 μA L mol⁻¹, $r^2 = 9928$). Os valores encontrados para limite de detecção e quantificação para a primeira inclinação foram 0,1 μmol L⁻¹ e 0,3 μmol L⁻¹, respectivamente. O método foi aplicado com eficiência na determinação de vitamina B₂ com recuperação de 97,0 a 107,0% para os medicamentos EMS do Complexo B® - solução oral, xarope e comprimidos. Em comparação ao método oficial baseado na Farmacopeia Brasileira, a fluorimetria, o método desenvolvido rendeu resultados de excelente precisão e exatidão. O método mostrou-se seletivo e eficiente na determinação da vitamina B₂.

Palavras-chaves: Eletrodo de filme de bismuto. Vitamina B₂. Eletroanalítica. Fármacos.

ABSTRACT

Riboflavin (or vitamin B₂) was successfully studied by voltammetric techniques and determined in oral, syrup and tablet samples using an ex situ plated bismuth-film electrode (BiFE). Cyclic voltammetry demonstrated that in acetate buffer (pH 4.0) vitamin B₂ undergoes an adsorption-controlled quasi-reversible electron transfer reaction. The peak potentials observed were pH-dependent, involving the same numbers of protons and electrons. The calibration curve provided by square-wave adsorptive stripping voltammetry (SWAdSV) exhibited two slopes: the first ranged from 0.3 to 0.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ vitamin B₂ and the second from 1.0 to 9.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. In the case of the first slope, the limit of detection was 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and the limit of quantification was 0.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Also, for the measurements, excellent selectivity, repeatability and stability were attained. Fluorescence was employed as the comparative technique and the outstanding performance of the BiFE-SWAdSV for riboflavin determination was verified.

Keywords: Bismuth film electrode. Riboflavin. Electroanalysis. Pharmaceuticals.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|---|
| <p>Figura 1– (A) Componentes de uma célula eletroquímica voltamétrica: célula de vidro, tampa, o eletrodo de referência (RE), o eletrodo auxiliar (AE) e o eletrodo de trabalho (WE); (B) representa a célula eletroquímica (EC).....</p> <p>Figura 2 – Estrutura química da riboflavina (vitamina B2). Em destaque, a cadeia ribitol e o sistema de anéis isoaloxazina, que apresenta o sistema π conjugado.....</p> <p>Figura 3 – Estrutura química das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), da riboflavina (vitamina B₂).....</p> <p>Figura 4 – Processo redox do sistema de anéis isoaloxazina na estrutura da riboflavina mostrando as formas: reduzida, oxidada e semiquinona.....</p> <p>Figura 5 – Esquema de possíveis espécies de vitamina B₂ nos processos de transferência de elétrons e adição de prótons.</p> <p>Figura 6 – Confecção do eletrodo de cobre (A) Resina epóxi e fio de cobre; (B) Polimento de uma das extremidades do eletrodo; (C) A superfície de cobre tem que ficar sem ranhuras, lisa e circularmente uniforme; (D) Superfície não uniforme.</p> <p>Figura 7 – Esquema demonstrativo do modo <i>ex situ</i> (A) Confecção do filme de bismuto; (B) Estudo ou determinação da vitamina B₂ com BiFE.....</p> <p>Figura 8 – Imagem do eletrodo de trabalho (A) comercial de cobre (B) BiFE.</p> <p>Figura 9 – Voltamograma cíclico para Bi(III) 20,0 mmol L⁻¹ em HCl 1,0 mol L⁻¹ sobre CuE, $v=100$ mV s⁻¹.....</p> <p>Figura 10 – Influência dos parâmetros de preparação <i>ex situ</i> do BiFE na i_{pa} da vitamina B₂: (A) potencial de deposição, $t_d = 90$ s, (B) tempo de deposição, $E_d = -0,15$ V na intensidade de corrente da vitamina B₂ 100 μmol L⁻¹ em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) por voltametria cíclica $v = 100$ mV s⁻¹.</p> <p>Figura 11 – Voltamogramas cíclicos completos para: (a) CuE, (b) BiFE, (c) BiFE na presença de vitamina B₂ 100 μmol L⁻¹, todos em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0), $v= 100$ mV s⁻¹.....</p> <p>Figura 12 – Voltamogramas cíclicos do substrato de cobre (CuE), isento do filme de bismuto, imerso em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) (a) sem a presença de vitamina B₂ e (b) com a presença de vitamina B₂ 100 μmol L⁻¹....</p> <p>Figura 13 – (A) Voltamogramas cíclicos para vitamina B₂ 100 μmol L⁻¹ em BiFE imerso em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) v (a) 10 mV s⁻¹, (b) 20 mV s⁻¹, (c) 30 mV s⁻¹, (d) 40 mV s⁻¹, (e) 50 mV s⁻¹, (f) 75 mV s⁻¹, (g) 100 mV s⁻¹, (h) 125 mV s⁻¹, (i) 150 mV s⁻¹, (j) 175 mV s⁻¹, (k) 200 mV s⁻¹, (l) 225 mV s⁻¹, (m) 250 mV s⁻¹, (n) 300 mV s⁻¹, (o) 350 mV s⁻¹, e (p) 400 mV s⁻¹; (B) Gráfico do log i_p vs. log v.....</p> | <p>28</p> <p>49</p> <p>50</p> <p>51</p> <p>52</p> <p>61</p> <p>62</p> <p>62</p> <p>65</p> <p>68</p> <p>70</p> <p>71</p> <p>73</p> |
|--|---|

Figura 14 – Influência dos parâmetros de pré-concentração: (A) potencial de pré-concentração, $t_{pc} = 90$ s, (B) tempo de pré-concentração, $E_{pc} = -1,0$ V, na intensidade de corrente anódica da vitamina B₂ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) por voltametria cíclica ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$), utilizando o BiFE.

Figura 15 – Estudo do pH: (A) voltamogramas cíclicos; (B) potencial e; (C) intensidade de corrente em função do pH para o BiFE na presença de vitamina B₂ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por voltametria cíclica, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 300$ s, pH (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 6,0; (d) 8,0; (e) 10,0; (f) 12,0.

Figura 16 – Voltamogramas cíclicos para vitamina B₂ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em BiFE imerso em soluções $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de (a) tampão fosfato (pH 4,0), (b) tampão B-R (pH 4,0), (c) tampão acetato (pH 4,0), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 300$ s.

Figura 17 – Voltamogramas de (a) pulso diferencial (b) onda quadrada para a vitamina B₂ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em BiFE em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 300$ s.

Figura 18 – Voltamogramas de onda quadrada para vitamina B₂ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$: (a) sem pré-concentração e (b) com pré-concentração $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 300$ s em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0), $f = 30$ Hz, $a = 70$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV, utilizando o BiFE.

Figura 19 – Dependência da Δi com (A) frequência ($a = 70$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV), (B) amplitude de pulso ($f = 30$ Hz e $\Delta E_s = 5$ mV) e (C) incremento de potencial ($f = 30$ Hz e $a = 70$ mV) para um BiFE imerso em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) contendo vitamina B₂ $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Dados obtidos por voltametria de onda quadrada.

Figura 20 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para a vitamina B₂ em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) em BiFE: (a) $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (h) $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (i) $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (j) $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (k) $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, ($f = 30$ Hz, $a = 70$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV); (B) Dependência de Δi em função da concentração da vitamina B₂ (curva de calibração). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 300$ s.

Figura 21 – (A) Voltamogramas de redissolução adsorptiva de onda quadrada para o eletrodo de BiFE (a) tampão acetate pH4 e adições de (b) $100 \mu\text{L}$ de amostra A e adições de $10 \mu\text{L}$ (c – f) até $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de solução padrão de vitamina B₂. (B) Gráfico das adições de padrão na amostra A. $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 300$ s; $\Delta E_s = 5$ mV, $a = 70$ mV e $f = 30$ Hz.

| | |
|---|----|
| Figura 22 – Espectro de fluorescência para: (a) tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) e (b) uma solução de vitamina B ₂ $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). | 93 |
| Figura 23 – Espectros de fluorescência (a) $0,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $0,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $0,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (h) $7,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (i) $9,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e (j) $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e curva de calibração da emissão (523 nm) em função da concentração da vitamina B ₂ para os dados já mencionados. | 94 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Parâmetros analíticos utilizados na determinação de íons inorgânicos usando o BiFE | 39 |
| Tabela 2 – Otimização dos parâmetros experimentais por SWV para análise de vitamina B ₂ | 81 |
| Tabela 3 – Parâmetros obtidos da curva de calibração para a determinação de vitamina B ₂ | 86 |
| Tabela 4 – Dados do estudo da repetibilidade do método proposto. | 86 |
| Tabela 5 – Dados do estudo da adição de padrão. | 90 |
| Tabela 6 – Resultados obtidos para a quantificação de vitamina B ₂ nas amostras pelo método proposto..... | 90 |
| Tabela 7 – Estudo da recuperação pelo método da adição de padrão das amostras. | 92 |
| Tabela 8 – Resultados obtidos para a quantificação de vitamina B ₂ em amostras diversas usando o método comparativo. | 95 |
| Tabela 9 – Tratamento estatístico da determinação de vitamina B ₂ em fármacos. | 96 |
| Tabela 10 – Faixa Linear e Limite de detecção (LOD) para a vitamina B ₂ | 98 |

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

- v – Velocidade de variação de potencial
 ΔE_s – Incremento de potencial
 Δi – Corrente resultante
 a – Amplitude de pulso
add – (do inglês *added*) – adicionada
AC – (do inglês *alternating current*) – Corrente alternada
AdCSV – (do inglês *adsorptive cathodic stripping voltammetry*) – Voltametria adsortiva de redissolução catódica
AdSV – (do inglês *adsorptive stripping voltammetry*) – Voltametria adsortiva de redissolução
AE – (do inglês *auxiliary electrode*) – Eletrodo auxiliar
Ag/AgCl – Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASV – (do inglês *anodic stripping voltammetry*) – Voltametria de redissolução anódica
BiE – (do inglês *bismuth electrode*) – Eletrodo de bismuto
BiFE – (do inglês *bismuth film electrode*) – Eletrodo de filme de bismuto
BDDE – (do inglês *Boron-doped diamond electrode*) – Eletrodo de diamante dopado com boro
CF – (do inglês *carbon fiber*) – Fibra de carbono
CPE – (do inglês *carbon-paste electrode*) – Eletrodo de pasta de carbono
CSV – (do inglês *catodic stripping voltammetry*) – Voltametria de redissolução catódica
CuE – (do inglês *cooper electrode*) – Eletrodo de cobre
CV – (do inglês *cyclic voltammetry*) – Voltametria cíclica
CVD – (do inglês *chemical vapor deposition*) – Deposição química por vapor
DC (do inglês *direct current*) – Corrente direta
DME – (do inglês *dropping mercury electrode*) – Eletrodo gotejante de mercúrio
DP – Desvio padrão
DPAdSV – (do inglês *diferencial pulse adsorptive stripping voltammetry*) – voltametria de redissolução adsortiva por pulso diferencial
DPV – (do inglês *differential pulse voltammetry*) – Voltametria de pulso diferencial
E – Potencial
EC – (do inglês *electrochemical cell*) – Célula eletroquímica
 E_d – Potencial de deposição
 E_p – Potencial de pico
 E_{pc} – Potencial de pré-concentração
 E_{po} – Potencial de pico de oxidação

E_{pr} – Potencial de pico de redução
 E_{r1} – Erro relativo entre o método proposto ou comparativo e os valores rotulados
 E_{r2} – Erro relativo entre o método proposto e o método comparativo
 f – Frequência
FAD – (do inglês *flavin adenine dinucleotide*) – flavina adenina dinucleotídeo
FMN – (do inglês *flavin mononucleotide*) – flavina mononucleotídeo
GCE – (do inglês *glassy carbon electrode*) – Eletrodo de carbono vítreo
HFCVD – (do inglês *hot filament chemical vapor deposition*) – Deposição química de vapor com filamento quente
HGCE – (do inglês *hot glassy carbon electrode*) – Eletrodo de carbono grafite aquecido
HMDE – (do inglês *hanging mercury drop electrode*) – Eletrodo de mercúrio de gota pendente
 i – Corrente
IDR – Ingestão Diária Recomendada
 i_{pa} – Corrente de pico anódica
 i_{pc} – Corrente de pico catódica
LOD – (do inglês *limit of detection*) – Limite de detecção
LOQ – (do inglês *limit of quantification*) – Limite de quantificação
MFE – (do inglês *mercury film electrode*) – Eletrodo de filme de mercúrio
MW – CVD – (do inglês *microwave chemical vapor deposition*) – Deposição química de vapor por micro-ondas
rec – (do inglês *recovery*) – recuperação
RE – (do inglês *reference electrode*) – Eletrodo de referência
RSD – (do inglês *relative standard deviation*) – Desvio padrão relativo
SD – (do inglês *standard deviation*) – Desvio padrão
ss – (do inglês *spiked sample*) – amostra fortificada
ssn – (do inglês *not spiked sample*) – amostra fortificada
SMDE – (do inglês *static mercury drop electrode*) – Eletrodo de mercúrio de gota estática
SV – (do inglês *stripping voltammetry*) – Voltametria de redissolução
SWAdSV – (do inglês *square wave anodic stripping voltammetry*) – voltametria de redissolução adsorptiva por onda quadrada
SWASV – (do inglês *square wave adsorptive stripping voltammetry*) – voltametria de redissolução anódica por onda quadrada
SWV – (do inglês *square wave voltammetry*) – Voltametria de onda quadrada
 t_d – Tempo de deposição
 t_{pc} – Tempo de pré-concentração
WE – (do inglês *working electrode*) – Eletrodo de trabalho

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 23 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 27 |
| 2.1 CÉLULA ELETROQUÍMICA | 27 |
| 2.2 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS | 29 |
| 2.3 ELETRODOS DE TRABALHO..... | 32 |
| 2.4 ELETRODOS DE FILME DE BISMUTO | 33 |
| 2.4.1 Preparação do BiFE | 34 |
| 2.4.1.1 Eletrodeposição <i>in situ</i> do BiFE | 36 |
| 2.4.1.2 Eletrodeposição <i>ex situ</i> do BiFE | 37 |
| 2.4.1.3 Eletrodeposição com um precursor de bismuto | 37 |
| 2.4.2 Emprego do BiFE na determinação de íons inorgânicos e substâncias orgânicas | 38 |
| 2.4.3 Emprego do BiFE com substrato de cobre | 43 |
| 2.5 VITAMINAS..... | 45 |
| 2.5.1 Vitamina B₂ | 46 |
| 2.5.2 Determinação de vitamina B₂ por métodos analíticos | 52 |
| 2.5.3 Estudos eletroquímicos e determinações eletroanalíticas de vitamina B₂ | 53 |
| 3 OBJETIVOS | 55 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 55 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 55 |
| 3.2.1 Deposição <i>ex situ</i> do filme de bismuto em substrato de cobre metálico e estudo do comportamento eletroquímico da vitamina B₂ | 55 |
| 3.2.2 Desenvolvimento e aplicação da metodologia | 55 |
| 4 PARTE EXPERIMENTAL | 57 |
| 4.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS | 57 |
| 4.1.1 Reagentes | 57 |
| 4.1.2 Soluções | 57 |
| 4.1.3 Amostras | 58 |
| 4.2 EQUIPAMENTOS..... | 58 |
| 4.2.1 Experimentos voltamétricos | 58 |
| 4.2.2 Experimentos de fluorimetria | 59 |
| 4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 59 |
| 4.3.1 Experimentos voltamétricos | 59 |
| 4.3.1.1 Obtenção do eletrodo de filme de bismuto..... | 59 |
| 4.3.1.2 Estudos eletroquímicos e desenvolvimento da metodologia eletroanalítica | 63 |
| 4.3.1.3 Determinação da vitamina B ₂ nas amostras | 63 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.2 Experimentos de fluorescência..... | 64 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 65 |
| 5.1 PREPARO DO BIFE E ATIVIDADE ELETROCATALÍTICA PARA A VITAMINA B ₂ | 65 |
| 5.2 ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DA VITAMINA B ₂ UTILIZANDO VOLTAMETRIA CÍCLICA | 69 |
| 5.3 INFLUÊNCIA DO PH E SELEÇÃO DO ELETRÓLITO DE SUPORTE | 76 |
| 5.4 SELEÇÃO DA TÉCNICA VOLTAMÉTRICA E OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS..... | 79 |
| 5.5 METODOLOGIA ELETROANALÍTICA USANDO BIFE- SWADSV..... | 83 |
| 5.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B ₂ EM FÁRMACOS | 87 |
| 5.7 DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B ₂ NAS AMOSTRAS ATRAVÉS DO MÉTODO COMPARATIVO E TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS..... | 92 |
| 5.8 COMPARAÇÃO COM OUTROS ELETRODOS | 97 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS | 99 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 101 |

1 INTRODUÇÃO

As vitaminas são um conjunto pequeno de moléculas orgânicas, requeridas pelo corpo humano, em quantidades mínimas, com a finalidade realizar funções celulares específicas, essenciais para o normal funcionamento de processos fisiológicos, importantes para a preservação da saúde (COMBS, 2008).

A maioria das vitaminas não pode ser sintetizada pelos animais, ou o são em quantidades insuficientes para desempenhar seu papel, sendo necessária sua inclusão na dieta alimentar, ou até mesmo o uso de medicamentos. A relação entre o aparecimento de sinais clínicos no ser humano e a falta de determinadas substâncias na alimentação conduziu, primeiramente, à noção de vitamina e de avitaminose (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). Ao estudar os sintomas do beribéri, Casimir Funk observou que a degeneração dos sistemas digestivo e nervoso estava relacionada com a deficiência de um composto no organismo, indicando que essa patologia é uma doença derivada de uma alimentação pobre. Em 1911, ao concluir que a patologia é resultado de uma deficiência nutricional da tiamina (vitamina B₁), na época conhecida como fator antiberibérico, foi criado o termo “*vitamin*”, como uma amina essencial para a vida ou “*vita*”. Todos os demais compostos, cujo excesso ou deficiência estavam associados a uma patologia foram designados como vitaminas. Entretanto, nem todas as vitaminas são classificadas como aminas (PHILIPPSBORN, 2007).

As vitaminas não são definidas como compostos com um grupo funcional definido. A solubilidade das vitaminas, em diferentes partes do corpo humano, está diretamente relacionada com suas respectivas estruturas químicas. As vitaminas B e C são solúveis em água (hidrossolúveis) e as vitaminas A, D, E e K são solúveis nos tecidos adiposos (lipossolúveis). Por serem solúveis em água, as vitaminas B e C não são armazenadas no organismo e, portanto, devem ser ingeridas diariamente através da alimentação. Ao contrário, as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) são armazenadas nos tecidos, permanecendo no organismo mesmo após um longo período sem serem ingeridas. Mesmo sendo armazenadas no organismo, as vitaminas lipossolúveis devem ser ingeridas na alimentação (PAIXÃO; STAMFORD, 2004).

No Brasil, têm aumentado a oferta e o consumo de produtos à base de vitaminas e minerais, em função da grande variedade de usos terapêuticos e do estímulo na publicidade veiculada nos meios de comunicação, aliado ao lucrativo mercado desses produtos (CARVALHO; ARAUJO, 2008).

Segundo relatos de médicos e nutricionistas, tem aumentado, na prática clínica diária, a prescrição de complemento desses produtos, por meio de suplementos alimentares ou fármacos, para manutenção ou reabilitação da saúde, principalmente, em grupos especiais (idosos, gravidez, infância e recuperação clínica de doenças agudas ou crônicas).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as diferenças nas dosagens oferecidas ao consumidor em cada produto são o parâmetro para sua classificação como suplementos alimentares ou como medicamento. As vitaminas e minerais são considerados medicamentos quando cumprem o esquema posológico acima de 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). Há uma relevância na criação e manutenção de um sistema que permita que os produtos cheguem ao consumidor com qualidade e segurança. No caso da química analítica, é importante que sejam desenvolvidos métodos simples e eficientes para a determinação do princípio ativo nesses suplementos ou medicamentos, a fim de controlar a quantidade exata que está sendo ingerida.

Retornando às vitaminas, no grupo das vitaminas hidrossolúveis, entre o complexo B, encontra-se a vitamina B₂ ou Riboflavina, necessária por originar muitas das flavinas que se encontram ligadas a diversas enzimas. Estes compostos tornam-se precursores de importantes coenzimas participantes da cadeia transportadora de elétrons, como a flavina adenina dinucleotídeo e flavina mononucleotídeo (RIVLIN; PINTO, 2001). Por apresentar transferência de elétrons, foi levantada a hipótese da sua determinação por técnicas voltamétricas.

Na literatura, encontram-se vários métodos voltamétricos para a determinação de vitamina B₂, sendo a primeira determinação realizada em 1975, por Wang utilizando eletrodo gotejante de mercúrio (WANG et al., 1985). Esses eletrodos, durante décadas, apresentaram como vantagem um desempenho significativo, principalmente, na detecção de metais. Porém, a natureza tóxica dos sais de mercúrio (cátions monovalentes do mercúrio) foi um fator que limitou a utilização de eletrodos desse metal, os quais chegaram a ser evitados em diversos países.

Recentemente, vários trabalhos envolvendo o uso de eletrodos modificados em voltametria foram publicados, com o principal objetivo de substituir o mercúrio. Zhang et al. (2010) utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com poli(3-metiltiofeno) como um sensor para determinar a vitamina B₂.

Nesse contexto, eletrodos de filme de bismuto foram introduzidos na década de 2000 (WANG; LU, 2000; HUTTON et al., 2001). Desde então, esses eletrodos tornaram-se atrativos para análises eletroquímicas, porque têm um desempenho similar aos eletrodos de mercúrio. Além disso, eles são ambientalmente amigáveis, visto que a toxicidade do bismuto e de seus sais é insignificante.

Por essas propriedades, eletrodos de filme de bismuto e outros eletrodos de bismuto têm sido usados para a quantificação de compostos metálicos e compostos orgânicos em uma diversa variedade de matrizes. Prior, Lenehan e Walker (2007) relatam, em suas referências, estudos com aplicações analíticas centrados na detecção de metais pesados incluindo zinco, cádmio, chumbo, tálio, índio, cobre, níquel, cobalto, cromo, ferro, molibdênio, manganês, urânio, estanho, vanádio e alumínio, em uma grande variedade de matrizes, incluindo amostras de água potável, produtos alimentícios, solo, metalúrgicas, extratos de plantas, cabelo, urina, suor e saliva. A investigação para estudos e análises em compostos orgânicos tem aumentado, iniciando com a determinação de nitrofenóis, de substâncias farmacêuticas, de pesticidas e de vários compostos de relevância biológica.

A combinação do uso de um eletrodo metálico como substrato do filme de bismuto pode ser um fator positivo na determinação de vitamina B₂. A vitamina B₁₂ (cianocobalamina), uma vitamina do complexo B, foi determinada através do eletrodo do filme de bismuto, tendo como substrato o eletrodo de cobre (KREFT; DE BRAGA; SPINELLI, 2012). Entretanto, o uso desse eletrodo para a determinação da vitamina B₂ ainda não foi demonstrado.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo utilizar um eletrodo de filme de bismuto, usando como o substrato o cobre, para a determinação voltamétrica da vitamina B₂ (riboflavina) em fármacos. Além de verificar os melhores parâmetros a serem utilizados na modificação da superfície do eletrodo e no estudo do comportamento eletroquímico da vitamina B₂.

APRESENTAÇÃO

Neste capítulo, faremos um panorama sobre voltametria, célula eletroquímica, técnicas eletroanalíticas e eletrodos de trabalho. Entre os eletrodos de trabalho, serão expostos os métodos de preparação e as propriedades do eletrodo de filme de bismuto (BiFE, do inglês *bismuth film electrode*). Além disso, serão apresentados os trabalhos realizados empregando BiFE na determinação de íons inorgânicos e substâncias orgânicas. Em seguida, serão relatados os trabalhos produzidos com o emprego do BiFE tendo como substrato o eletrodo de cobre. Na sequência, haverá um pequeno histórico sobre as vitaminas, concentrando as informações sobre a vitamina B₂ (riboflavina), destacando a sua importância em processos redox. Continuando, será citada a revisão de trabalhos referentes aos métodos analíticos utilizados na determinação de vitamina B₂, entre eles, serão destacadas as determinações eletroanalíticas. Após esse panorama, nas próximas seções, serão apresentados os resultados e discussão da associação do BiFE-SWAdSV para a determinação da vitamina B₂.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÉLULA ELETROQUÍMICA

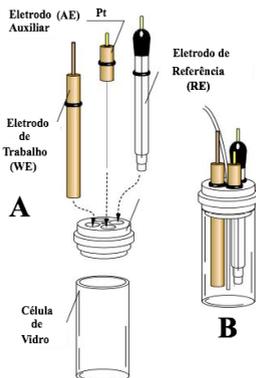
A voltametria compreende um grupo de métodos eletroanalíticos, nos quais a informação sobre o analito é obtida por meio de medidas de corrente, em função do potencial aplicado. Essa técnica eletroanalítica é baseada nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho (WE, do inglês *working electrode*) e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. A magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons, durante um processo de oxirredução, pode ser relacionada com a quantidade do analito presente na interface do eletrodo e, conseqüentemente, na solução presente na célula eletroquímica (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

As medidas eletroquímicas são realizadas em uma célula eletroquímica (EC, do inglês *electrochemical cell*) associada a um componente eletrônico (potenciostato/galvanostato) para controlar a corrente e potencial. O sistema utilizado para EC para as técnicas voltamétricas, neste trabalho, foi constituído por três eletrodos: o WE, cuja medida do potencial e da corrente é sensível à concentração da substância eletroativa; o eletrodo de referência (RE, do inglês *reference*

electrode), pelo qual não passa nenhuma corrente e o potencial permanece constante e o eletrodo auxiliar (AE, do inglês *auxiliary electrode*), que serve para completar o circuito elétrico sendo o eletrodo onde a corrente pode fluir (HARVEY, 2000).

A Figura 1A apresenta todas as partes de uma EC voltamétrica: célula de vidro, tampa, RE, AE e WE. Na célula de vidro é encaixada uma tampa polimérica com o objetivo de dar suporte aos eletrodos (fixar) e proteger a solução acondicionada. Os três eletrodos são encaixados no suporte que está anexado à célula de vidro, sempre nas mesmas posições e altura: o eletrodo de referência (RE), o eletrodo auxiliar (AE) e o eletrodo de trabalho (WE). A célula eletroquímica completa está indicada na Figura 1B.

Figura 1– (A) Componentes de uma célula eletroquímica voltamétrica: célula de vidro, tampa, o eletrodo de referência (RE), o eletrodo auxiliar (AE) e o eletrodo de trabalho (WE); (B) representando a célula eletroquímica (EC).



Fonte: Adaptado da página da BASi©¹.

¹ Disponível em: < <http://www.basinc.com/products/ec.html> > Acesso em abr. 2015.

2.2 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

As técnicas eletroanalíticas empregam as propriedades elétricas mensuráveis, tais como corrente, potencial e carga, resultantes de reações de oxirredução de um analito quando este é submetido a um estímulo elétrico, sobre os eletrodos imersos em uma célula eletroquímica. Essas medidas podem estar relacionadas com algum parâmetro químico intrínseco deste analito e, por isso, são técnicas amplamente utilizadas na identificação, na determinação e no estudo eletroquímico de qualquer composto capaz de sofrer reações químicas de redução e/ou oxidação (SKOOG et al., 2006).

Os métodos eletroanalíticos oferecem as seguintes vantagens: (i) seletividade e especificidade das determinações resultantes da oxirredução das espécies analíticas de interesse em um potencial aplicado específico; (ii) seletividade decorrente dos processos de oxirredução do analito, em eletrodo de trabalho feito com material específico e; (iii) grande sensibilidade e baixos limites de detecção resultantes das técnicas de pré-concentração e modos de aquisição de sinal, que proporcionam um ambiente com baixo sinal de fundo (HARVEY, 2000).

O potencial aplicado no eletrodo de trabalho atua como a força motriz para a reação eletroquímica. É o potencial controlado que possibilita a espécie presente na solução ser oxidada ou reduzida na superfície do eletrodo. Na medida em que o potencial se torna mais negativo, o eletrodo se torna uma fonte de elétrons, favorecendo a redução das espécies na interface solução-eletrodo. No caso de um potencial mais positivo, a oxidação das espécies será favorecida. Por essa razão, quando se faz uma varredura de potencial no sentido negativo usa-se a denominação de varredura catódica, enquanto que uma varredura de potencial no sentido positivo é a varredura anódica (COMPTON; BANKS, 2014).

Nos processos eletroquímicos, a intensidade de corrente total deve-se não só a fenômenos faradaicos, mas também a fenômenos capacitivos. A corrente de interesse para o composto eletroativo, na voltametria, é a corrente faradaica, que surge devido à redução ou à oxidação do analito, no eletrodo de trabalho. A corrente capacitiva interfere nas medidas, forçando a transferência de elétrons do potenciostato para o eletrodo de trabalho, deixando o potencial mais negativo. Há um fluxo de íons e elétrons. Os cátions se aproximam e os ânions se afastam do eletrodo, modificando, assim, o valor da corrente faradaica, que deve ser minimizado (HARRIS, 2011).

As técnicas voltamétricas mais empregadas são: a voltametria cíclica (CV, do inglês *cyclic voltammetry*), a voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *square wave voltammetry*) e a voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *differential pulse voltammetry*) (KOMPTON; BANK, 2014).

A magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons, durante um processo de oxirredução (Equação 1), pode ser relacionada com a quantidade do analito presente na interface do eletrodo e, consequentemente, na célula eletroquímica. Já o registro da corrente, em função do potencial aplicado, o qual é denominado de voltamograma.



Sendo O, a forma oxidada da substância eletroativa e R, a forma reduzida.

A voltametria é largamente usada pelos químicos inorgânicos, físico-químicos e bioquímicos para finalidades não analíticas, incluindo estudos fundamentais de processos de redução e oxidação em vários meios, processos de adsorção em superfícies, mecanismos de transferência de elétrons em superfícies de eletrodos quimicamente modificados (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A CV é a técnica mais utilizada para a aquisição de informações qualitativas sobre os sistemas eletroquímicos, embora também seja bastante aplicada para fins quantitativos. Ela oferece uma localização rápida de potenciais redox das espécies eletroativas.

Os parâmetros eletroquímicos mais importantes em CV são os potenciais de pico de redução e oxidação (E_{pr} e E_{po}) e as correntes de pico catódica e anódica (I_{pc} e I_{pa}). Testes diagnósticos realizados a partir da observação da dependência da intensidade de corrente com o potencial aplicado em relação à velocidade de variação (v) permitem obter informações relevantes sobre reversibilidade ou irreversibilidade do processo de transferência de elétrons, ocorrência de reações químicas acopladas, fenômenos catalíticos e adsorção (SELVA, 2010).

Os valores dos seguintes parâmetros são utilizados para caracterizar o voltamograma cíclico de um processo reversível: (i) a separação entre os potenciais de oxidação e redução, ou seja, $\Delta E_p = E_{po} - E_{pr}$, deve apresentar valor de, ou próximo de, 59 mV/n, em todas as velocidades de variação, sendo n o número de elétrons; (ii) a relação entre a corrente de pico anódica (i_{pa}) e a corrente de pico catódico (i_{pc}) deve ser igual ou próximo a 1, ou seja, $i_{pa}/i_{pc} = 1$, não dependendo da velocidade de variação; (iii) A corrente de pico (i_p) varia

proporcionalmente com a raiz da velocidade de variação ($v^{1/2}$) (BARD; FAULKNER, 1980).

Os sistemas irreversíveis não apresentam um comportamento Nernstiano, diferentemente dos sistemas reversíveis, porque a velocidade de transferência de carga é lenta, comparada com a velocidade de variação (v). Desse modo, as concentrações das espécies oxidadas e reduzidas não serão mais funções apenas do potencial. Esses sistemas são caracterizados por apresentarem corrente controlada somente pela transferência de carga (SOUZA, 2011).

O termo “quase-reversível” é por vezes usado para descrever a situação intermediária entre os sistemas reversível e irreversível. Para uma reação eletrodica quase-reversível a corrente é controlada tanto pela difusão ou adsorção, como pela etapa de transferência de carga (SCHOLZ, 2010).

As técnicas de pulso são baseadas na aplicação de pulsos de potencial, onde a corrente é medida duas vezes. Após a aplicação dos pulsos de potencial, a corrente capacitiva se extingue mais rapidamente que a componente faradaica. Na DPV, a corrente é medida antes da aplicação do pulso e ao final do pulso e a corrente resultante da diferença entre as duas correntes. Entretanto, na SWV as correntes elétricas são medidas ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da varredura, e ao final do pulso reverso, no qual a direção do pulso é contrária à direção da varredura. A diferença entre essas duas correntes, corrente resultante (Δi), é maior que os valores de i_{pa} e i_{pc} isolados, porque as correntes do pulso direto e reverso têm sinais opostos (PACHECO et al., 2013). Isto não é válido para sistemas irreversíveis. A Δi é um sinal obtido diferencialmente e apresenta excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Essas técnicas mais utilizadas, podem ser conjugadas às técnicas de voltametria de redissolução, anódica (ASV, do inglês *anodic stripping voltammetry*) ou catódica (CSV, do inglês *catodic stripping voltammetry*) ou às técnicas de voltametria de redissolução adsortiva (AdSV, do inglês *adsorptive stripping voltammetry*) (FARGHALY; HAMEED; ABU-NAWWAS, 2014). Nas técnicas voltamétricas de redissolução (SV, do inglês *stripping voltammetry*), a espécie eletroativa é pré-concentrada no eletrodo de trabalho sob aplicação de um potencial controlado (E_{pc}), durante um tempo determinado (t_{pc}). Após essa etapa de pré-concentração, é feita uma varredura de potencial, no qual o analito é redissolvido (do inglês, *stripping*) para a solução. Nas técnicas de AdSV, a etapa de deposição é realizada pela adsorção das espécies

eletroativas na superfície do eletrodo sob aplicação de um potencial controlado, durante um tempo determinado. Em ambas as técnicas a etapa de pré-concentração ou de deposição devem ser realizadas em condições hidrodinâmicas (transporte de massa) controladas e reproduzíveis, sendo uma poderosa ferramenta para determinação em níveis traço de uma variedade de íons metálicos (e seus complexos), compostos orgânicos e organometálicos (FARGHALY; HAMEED; ABU-NAWWAS, 2014).

Dentre essas associações, as que são mais utilizadas na determinação de metais com os BiFEs são a voltametria de redissolução anódica no modo onda quadrada (SWASV, do inglês *square wave adsorptive stripping voltammetry*), a voltametria de redissolução anódica no modo pulso diferencial (DPASV, do inglês *diferencial pulse adsorptive stripping voltammetry*) e a voltametria adsortiva de redissolução anódica no modo onda quadrada (SWAdSV, do inglês *square wave adsorptive stripping voltammetry*) (FARGHALY; HAMEED; ABU-NAWWAS, 2014).

Neste trabalho, as técnicas eletroanalíticas utilizadas foram a voltametria cíclica (CV), para otimização das condições experimentais e realização dos estudos cinéticos e; a voltametria de onda quadrada (SWV) e de pulso diferencial (DPV), para avaliar qual das duas técnicas apresenta a maior sensibilidade na determinação da vitamina B₂. Na construção das curvas de calibração e na determinação nas amostras, optou-se por utilizar a SWV aliada a uma pré-concentração da vitamina B₂ (adsorção), utilizando a seguinte configuração: a utilização da voltametria de redissolução adsortiva no modo onda quadrada (SWAdSV).

2.3 ELETRODOS DE TRABALHO

A performance das análises voltamétricas depende da natureza e, principalmente, do comportamento redox do analito de interesse sobre a superfície escolhida do WE. Muitos materiais têm sido usados como WEs, com o objetivo de obter respostas de corrente com elevada razão sinal-ruído e boa reprodutibilidade. A janela eletroquímica do WE tem que ser ampla e adequada. A reação de oxirredução do analito eletroativo tem que acontecer na faixa de potencial na qual o WE possa atuar (PACHECO et al., 2013), sendo que este sinal não tenha nenhuma interferência, sendo seletivo naquele ponto. Porém, é interessante que na mesma janela possa ocorrer uma determinação multicomponente.

No intervalo de potenciais positivos destacam-se os eletrodos sólidos, que podem ser preparados por metais nobres (platina, prata e ouro), metais (prata, cobre, irídio, bismuto, ródio, paládio, níquel, ferro e tungstênio) e as diversas formas de carbono (carbono vítreo, carbono pirolítico, diamante dopado com boro, pasta de carbono, fulereno, nanotubos, entre outros). Na fase sólida, os WEs apresentam estabilidade mecânica, boa condutividade elétrica e fácil regeneração da superfície. Entretanto, estudos têm indicado problemas com a utilização de metais para confecção de WEs. Esses problemas estão relacionados a uma superfície heterogênea e à passivação da superfície em função da adsorção de compostos: reagentes, produtos ou derivados (DE SOUZA et al., 2011).

No intervalo de potenciais negativos, os eletrodos de mercúrio são os mais empregados. Eles apresentam um comportamento eletroquímico bem definido, com elevado sobrepotencial de hidrogênio, boa estabilidade e reprodutibilidade, em especial, para análises de redissolução anódica e redissolução adsorviva catódica (OGOREVC et al., 2001).

No entanto, devido à toxicidade dos sais de mercúrio e ao aumento da consciência ambiental, estudos referentes a eletrodos, que podem potencialmente substituir o mercúrio, são continuamente realizados (CLAUX; VITTORI, 2007).

A utilização de eletrodos de filme de bismuto (BiFE, do inglês *bismuth film electrode*) tornou-se bastante atrativa para a substituição do filme de mercúrio em determinações eletroanalíticas, uma vez que o BiFE tem um desempenho semelhante ao do mercúrio em potenciais negativos e, em alguns casos, apresentando melhorias. A vantagem mais significativa dos BiFEs é que eles são ambientalmente amigáveis, visto que a toxicidade do bismuto e seus sais é insignificante (ECONOMOU, 2005).

2.4 ELETRODOS DE FILME DE BISMUTO

O bismuto apresenta propriedades características, como a capacidade de formar filmes com boa estabilidade mecânica, o que proporciona baixa intensidade de corrente de fundo em potenciais negativos, favorecendo a determinação catódica de compostos orgânicos e possibilitando a análise por redissolução anódica de íons metálicos (OGOREVC et al., 2001).

O BiFE possui comportamento e desempenho similar ao dos eletrodos de mercúrio. Ele apresenta alto sobrepotencial de redução de

prótons ($H^+_{(aq)}$), fato que possibilita a redução de íons, substâncias e compostos orgânicos com potencial de redução muito negativos. Outro fator importante é a diminuição da interferência causada pela redução de oxigênio molecular gasoso dissolvido na solução de eletrólito presente na célula eletroquímica, devido à dificuldade cinética dessa reação sobre a superfície de bismuto (KRÓLICKA; BOBROWSKI, 2004).

Os BiFEs abrangem uma gama ampla de potenciais negativos, aproximadamente até -1,25 V para um pH de 4,5 vs. Ag/AgCl (3,0 mol L^{-1} KCl). Porém, a faixa de potenciais positivos não pode ser considerada devido à oxidação do bismuto. Essa janela eletroquímica, de cerca de 1,0 V, permite a medição, em simultâneo, de analitos eletroativos que tenham potencial padrão mais negativo que o bismuto (ŠVANCARA et al., 2010).

Outras propriedades atrativas dos BiFEs incluem a sua preparação simples, alta sensibilidade, obtenção de sinais bem definidos e simétricos, além de excelente resolução dos picos vizinhos nos voltamogramas.

2.4.1 Preparação do BiFE

A formação do filme de Bi sobre um determinado substrato tem como princípio a construção de um eletrodo quimicamente modificado, no qual a superfície possui propriedades químicas e físicas diferentes do material sobre o qual foi feita a modificação (OLIVEIRA, 2008). Esse procedimento consiste, basicamente, na eletrodeposição de um filme fino de Bi metálico sobre a superfície de um substrato. A formação do filme ocorre quando se aplica naquele sistema um potencial mais negativo que o do bismuto, que pode modificar, entre outros fatores, em função do eletrodo de trabalho, capaz de reduzir os íons Bi(III) em solução. O bom funcionamento do BiFE depende da estrutura do filme. Uma homogeneidade do filme formado é de fundamental importância para o desenvolvimento do método eletroanalítico (ECONOMOU, 2005).

Oliveira (2008) destaca que o método de preparo do eletrodo deve ser realizado com condições experimentais ajustadas, ou seja, os parâmetros de deposição devem ser cuidadosamente otimizados, pois eles irão definir a morfologia do filme. Os parâmetros de deposição, tais como o tempo de deposição (t_d) e o potencial de deposição (E_d) são dependentes do substrato e, também, do analito a ser determinado.

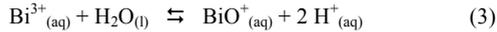
A eletrodeposição dos íons Bi(III) em um substrato ocorre, essencialmente, em meio ácido. A preparação em meio neutro ou

levemente alcalino torna os íons Bi(III) bastante susceptíveis à hidrólise (ECONOMOU, 2005).

Em meio neutro ou levemente alcalino ocorre a reação representada pela Equação 2.



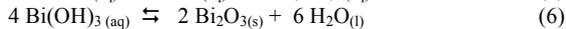
O hidróxido de bismuto, $\text{Bi}(\text{OH})_3$, é uma base fraca, portanto, os sais de bismuto hidrolisam-se rapidamente, conforme a Equação 3, com a formação do íon bismutíla ($\text{BiO}^{+}_{(\text{aq})}$). Esse íon facilmente forma sais insolúveis com cloretos. Porém essa formação é invertida em meio fortemente ácido, deslocando o equilíbrio da Equação 3 para a esquerda, no sentido inverso, garantindo e disponibilizando os íons Bi(III) para eletrodeposição.



Há também a possibilidade de eletrodeposição de íons Bi(III) em meio fortemente alcalino, conforme estudos, pois nessas condições ocorre a formação de complexos estáveis entre Bi(III) e íons hidroxila (OH^{-}), conforme mostra a Equação 4.



Entretanto, a solução com íons Bi(III) pode ser ajustada, com adição de uma solução alcalina (com íons hidroxila), para formar hidróxido de bismuto, que pode ser representada pela Equação 5. Depois de agitar essa solução, a decomposição do hidróxido de bismuto pode ocorrer através da formação de óxido de bismuto, conforme a Equação 6. Esse óxido pode ser depositado no eletrodo de trabalho, formando um filme de óxido de bismuto (GUJAR et al., 2005).



Conforme Economou (2005), existem três métodos gerais de revestimento da superfície do substrato com um depósito de bismuto. O primeiro método, é a eletrodeposição *in situ*; o segundo, consiste na

eletrodeposição *ex situ* e; o terceiro método de revestimento, baseia-se na modificação do eletrodo com um precursor do bismuto.

2.4.1.1 Eletrodeposição *in situ* do BiFE

No sistema *in situ*, a deposição do filme de bismuto acontece na mesma célula eletroquímica, ou seja, o analito e os íons bismuto estão na mesma solução.

Dependendo das características do analito, este pode ser incorporado ao filme ao mesmo tempo em que o BiFE é confeccionado, aplicando um potencial mais negativo que o potencial de redução dos íons do bismuto e do analito, que seja capaz de reduzir os íons Bi(III) em solução e o analito na superfície do substrato. Desse modo, o filme será composto do analito de interesse, juntamente com Bi⁰. Como o bismuto e o analito sofrerem redução, para a determinação do analito faz-se uma variação de potencial no sentido positivo para que haja o processo de oxidação do analito (BERNARDELI, 2009).

As Equações 7 e 8 representam as reações de redução que ocorrem, simultaneamente, com a aplicação de um potencial negativo, considerando um metal como o analito:



Utiliza-se bastante essa forma de deposição para determinações de íons metálicos que possuam comportamento reversível, pois é essencial que haja a redução e oxidação do analito.

É necessário ter cuidado na variação no sentido positivo para que não haja oxidação do bismuto. Caso isso aconteça, o filme terá que ser refeito para a realização de novas medidas.

Entretanto, se na confecção do BiFE o potencial de redução do analito for muito mais negativo que o do Bi, deve-se aplicar um potencial intermediário, localizado entre o potencial de redução do bismuto e do analito, de modo que seja capaz de reduzir os íons Bi(III) em solução e não reduzir o analito. Na sequência, determina-se o analito por redução, aplicando uma variação em potenciais mais negativos (REHACEK et al., 2008).

A concentração de íons Bi(III) deverá ser cerca de 10 vezes maior que a do analito, para evitar efeitos de saturação no eletrodo. Além disso, a preparação *in situ* apresenta algumas limitações relativas ao

valor de pH da solução que contém a amostra, sendo conveniente trabalhar com soluções de caráter ácido (ECONOMOU, 2005).

2.4.1.2 Eletrodeposição *ex situ* do BiFE

Nesse procedimento, a formação do filme e a determinação do analito ocorrem em células eletroquímicas diferentes. Dessa forma, são necessárias duas células eletroquímicas distintas: uma para a formação do BiFE e outra para a realização dos experimentos voltamétricos (PRADO, 2014).

Primeiramente, o EW é adicionado numa célula eletroquímica que contém em uma solução ácida com íons Bi(III). Esse é eletrodepositado na superfície do EW, com a aplicação de um potencial mais negativo que o potencial de redução do cátion bismuto a bismuto metálico ($\text{Bi}^{3+}/\text{Bi}^0$), o ocorrendo a confecção do BiFE. Na sequência, o BiFE é transferido para outra célula eletroquímica que contenha o eletrólito de suporte. É nela que as análises voltamétricas e a determinação eletroanalítica do analito serão realizadas.

2.4.1.3 Eletrodeposição com um precursor de bismuto

A utilização de um precursor de bismuto é o terceiro método para a preparação dos eletrodos modificados com bismuto. Usando-se um composto de Bi(III), tal como Bi_2O_3 , a um potencial de cerca de -1,0 V, este reduz-se a bismuto metálico, que forma um depósito na superfície do eletrodo (KRÓLICKA et al., 2002).

Esse método é essencialmente aplicado em eletrodo de pasta de carbono, no qual o precursor pode ser incorporado diretamente no eletrodo ao ser misturado com a pasta de carbono.

Os sensores modificados são de fácil preparação e simplificam a experiência, uma vez que o filme de bismuto é gerado *in situ*, sem necessidade de utilizar sais de bismuto (ECONOMOU, 2005; CALDEIRA, 2010).

2.4.2 Emprego do BiFE na determinação de íons inorgânicos e substâncias orgânicas

A maior classe de substâncias analisadas utilizando eletrodo de filme de bismuto são as substâncias inorgânicas, os íons metálicos. As configurações das técnicas instrumentais eletroquímicas empregadas para determinação dos íons metálicos são muito variadas (ŠVANCARA et al., 2010).

Já foram realizados estudos utilizando o BiFE para a determinação dos íons que constam na Tabela 1. Além dos íons já determinados por BiFE, constam os limites de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) determinados e as técnicas análise voltamétrica (TVAs, do inglês *techniques of voltammetric analysis*) associadas à determinação dos íons através do BiFE. Todos os íons inorgânicos presentes na Tabela 1 foram determinados por técnicas de redissolução voltamétrica (SV) fornecendo LODs a níveis traço. Os dados comprovam o bom desempenho do BiFE associados às SVs, na substituição do mercúrio, para determinação de metais pesados.

Considerando a complexidade da amostra, o íon Sn(IV) foi determinado com êxito com BiFE-SWASV, em amostras de biodiesel relatando um LOD de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. A exatidão foi evidenciada a partir de comparações com dados gerados pela técnica de espectrometria de absorção atômica (FRENA et al., 2011).

Propostas para determinação simultânea de metais pesados (íons inorgânicos) utilizando a combinação BiFE - SV também são encontradas na literatura.

Os cátions dos metais pesados zinco, cádmio e chumbo foram determinados em solução aquosa, utilizando a metodologia BiFE-SWASV, relatando os LODs de $12,0 \text{ nmol L}^{-1}$ para o Zn(II); $2,9 \text{ nmol L}^{-1}$ para Cd(II) e $2,4 \text{ nmol L}^{-1}$ para o Pb(II). O substrato utilizado para confecção do BiFE foi um disco de grafite ($0,5 \text{ mm}$ de diâmetro) (REHACEK et al., 2008).

Tabela 1 – Parâmetros analíticos utilizados na determinação de íons inorgânicos usando o BiFE.

| Íon | LOD | TVA | Referência |
|---------|---------------------------|----------|--|
| Al(III) | 0,56 nmol L ⁻¹ | SWAdSV | WANG et al. (2011) |
| Ti(IV) | 10,0 nmol L ⁻¹ | SWCtAdSV | BOBROWSKI (2009) |
| V(V) | 0,2 µg L ⁻¹ | SWCtAdSV | WANG et al. 2006 |
| Cr(III) | 100 ng L ⁻¹ | SWAdSV | CHATZITHEODOROU; ECONOMOU; VOULGAROPOULOS (2004) |
| Mn(II) | 40,0 µmol L ⁻¹ | SWASV | BANKS et al., (2005) |
| Fe(III) | 0,1 µg L ⁻¹ | SWASV | SEGURA; TORAL; ARANCIBIA (2008) |
| Co(II) | 0,3 µg L ⁻¹ | DPAdSV | KRÓLICKA et al. (2003) |
| Cu(II) | 2,0 µg L ⁻¹ | SWASV | WANG (2001) |
| Zn(II) | 9,6 nmol L ⁻¹ | ASV | GUO et al. (2005) |
| Ga(III) | 2,0 µg L ⁻¹ | ASV | KAMAT et al. (2011) |
| As(III) | 0,7 ng L ⁻¹ | CSV | JIAJIE; NAGAOSA (2007) |
| Se(IV) | 0,025 µg L ⁻¹ | CSV | LONG; NAGAOSA (2007) |
| Cd(II) | 0,5 µg L ⁻¹ | ASV | KOKKINOS; ECONOMOU (2011) |
| In(III) | 10,0 µg L ⁻¹ | SWASV | CHARALAMBOUS; ECONOMOU (2005) |
| Sn(IV) | 0,14 µg L ⁻¹ | ASV | FRENA et al. (2011) |
| Sb(III) | 2,0 ng L ⁻¹ | CSV | ZONG; NAGAOSA (2009) |
| Te(IV) | 0,5 µmol L ⁻¹ | SWCSV | NOSEUNG; MYUNG (2011) |
| Tl(I) | 10,8 nmol L ⁻¹ | ASV | JORGE; NETO; ROCHA (2007) |
| Pb(II) | 0,07 µg L ⁻¹ | SWASV | LI et al. (2011) |
| U(VI) | 0,1 µg L ⁻¹ | AdSV | KEFALA; ECONOMOU; VOULGAROPOULOS (2006) |

Os mesmos íons foram determinados, simultaneamente, em amostras de sangue, pela metodologia BiFE-DPASV e apontaram os LODs de 0,09 µg L⁻¹ para o Cd(II); 0,13 µg L⁻¹ para o Pb(II) e;

0,97 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Zn(II), respectivamente. Nesse caso, os pesquisadores usaram como substrato para o BiFE um eletrodo de carbono vítreo modificado com Nafion® (Liu et al., 2008). Nafion® é a marca comercial registrada da E. I. du Pont de Nemours and Company para o copolímero tetrafluoretileno-viniléterperfluorado (MAURITZ; MOORE, 2004).

Os íons Pb(II) e Cd(II) também foram determinados, simultaneamente, empregando BiFE-DPASV, em amostras de fertilizantes fosfatados. Foram relatados LODs de 2,43 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2,03 $\mu\text{g L}^{-1}$. Manipulando a mesma alíquota de amostra, a pesquisadora determinou U(IV) utilizando cupferron como agente complexante empregando SWAdSV, relatando LOD de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MARTOS, 2014).

A grande maioria das pesquisas orientadas aos eletrodos de bismuto tem incidido sobre a determinação de íons metálicos. Entretanto, tem havido um esforço para a determinação de compostos orgânicos. As investigações eletroquímicas em compostos orgânicos com o BiFE começaram com o estudo de nitrofenóis (ŠVANCARA et al., 2001).

Hutton et al. (2001) detectaram o 2-nitrofenol 70,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão Britton-Robinson pH 4, usando BiFE no modo *ex situ*. A eletrodeposição do BiFE foi realizada com a aplicação de um potencial de -1,0 V, durante 60 s, em um eletrodo de carbono vítreo (GCE) imerso em solução numa solução de tampão acetato 0,05 mol L^{-1} (pH 4,0), contendo Bi(III) 5,0 mg L^{-1} . O comportamento do 2-nitrofenol em BiFE mostrou-se semelhante aos comportamentos nos eletrodos de mercúrio e de carbono vítreo. Usando o mesmo modo de preparo do BiFE em GCE, Hutton et al. (2004) ampliaram o uso do BiFE na detecção de nitrofenóis (2-nitrofenol, 2-NP; 4-nitrofenol, 4-NP; 2,4-dinitrofenol, 2,4 DNP). Empregando a voltametria de onda quadrada, os limites de detecção foram de 0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, e 3,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, para 2-NP, 4-NP, e 2,4-DNP, respectivamente.

A partir dos nitrofenóis, foram realizados novos estudos e determinações em compostos orgânicos, inicialmente, em produtos farmacêuticos (ŠVANCARA et al., 2001).

Sattayasamitsathit, Thavarungkul e Kanatharana (2007) desenvolveram um sistema de injeção em fluxo com detecção amperométrica para análise de tetraciclina, utilizando como eletrodo de trabalho o BiFE. Os parâmetros para a formação do BiFE foram otimizados, aplicando-se um potencial de -0,3 V, por 6 minutos, no substrato de carbono vítreo, em uma solução de tampão acetato 100 mmol L^{-1} contendo Bi(III) 1,5 mmol L^{-1} . O método desenvolvido foi

utilizado para determinação do antibacteriano em cápsulas. Os resultados de recuperação foram obtidos entre 86 - 106% e demonstraram uma boa exatidão.

A determinação do diclofenaco de sódio em fármacos empregando o BiFE foi estudada por Rodriguez et al. (2007). Para isso, eles desenvolveram um sistema de injeção em fluxo, com detector amperométrico. Os autores obtiveram uma faixa linear de 6,0 - 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção igual a 4,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O antibiótico sulfadiazina foi determinado em formulações farmacêuticas, utilizando o BiFE-DPV. A redução eletroquímica da sulfadiazina, empregando a metodologia BiFE-DPV no modo *ex situ*, respondeu de forma linear em duas faixas de concentração: a primeira região linear, encontrou-se dentro da faixa de 3,2 - 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e, uma segunda, dentro da faixa de 20,0 - 96,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção alcançados para a primeira e segunda regiões lineares foram de 2,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 12,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O filme de bismuto foi obtido aplicando-se um potencial de -0,8 V, por 100 s, em uma solução Bi(III) 3,0 mmol L^{-1} , usando o GCE como substrato (CAMPESTRINI et al., 2010).

O aumento da poluição ambiental por metais tóxicos e, principalmente, por resíduos de pesticidas, das mais variadas classes químicas, tem estimulado o desenvolvimento de técnicas apropriadas para avaliação destes compostos em diferentes tipos de alimentos e bebidas, pois eles são os principais caminhos de ingestão desses contaminantes pelo homem (TADEO et al., 2000).

Sendo assim, as determinações de agrotóxicos, pesticidas e inseticidas usando BiFE também despertaram interesse.

Guzsvány et al. (2006) verificaram a aplicabilidade do BiFE-DPV, no modo *ex situ*, na determinação do inseticida thiamethoxan em amostras de batatas tratadas com esse inseticida. O BiFE foi preparado sobre GCE pela aplicação de -0,25 V, durante 60 s, em solução contendo Bi(III) 4,0 mg L^{-1} e KBr 0,5 mol L^{-1} em HCl 1,0 mol L^{-1} , sob agitação constante. Depois de preparado, o BiFE foi submetido à determinação do inseticida, por meio da redução eletroquímica do composto thiamethoxan usando BiFE-DPV, em tampão Britton-Robinson pH 8,0, apresentando LOD de 0,38 mg L^{-1} .

Posteriormente, Arribas et al. (2006) desenvolveram uma nova aplicação para o BiFE na determinação direta do herbicida Metamitron (4-amino-3-metil-6-fenil-1,2,4-triazina-5ona), em soluções não desaeeradas, por voltametria de onda quadrada. Para a confecção do BiFE foi aplicado um potencial de -0,6 V, por 240 s, em um eletrodo de

pasta de carbono (CPE) imerso em solução de tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ pH 4,5, contendo íons Bi(III) 0,5 mmol L⁻¹. Um pico de redução foi registrado para o herbicida em um potencial de -0,67 V. A faixa linear de concentração abrangeu valores entre 10 - 200 µmol L⁻¹ e o limite de detecção encontrado foi de 2 µmol L⁻¹.

O BiFE foi aplicado para análises eletroquímicas do pesticida metil paration por Du et al. (2008). Os parâmetros otimizados para a preparação do BiFE em substrato GCE foram -1,0 V, por 80 s, em solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0), contendo Bi(III) 1,25 µg L⁻¹ e o surfactante brometo de trimetilcetil amônio. A faixa linear obtida da curva de calibração variou de 3 a 100 µg L⁻¹, sendo o limite de detecção igual a 1,2 µg L⁻¹. Devido à preparação fácil e à capacidade de regeneração do BiFE, juntamente com a sua boa reprodutibilidade e estabilidade, a combinação do BiFE mostrou-se promissora para análises catódicas, abrindo uma nova oportunidade para a análise rápida, simples e sensível de compostos organofosforados.

O herbicida Metribuzin (4-amino-6-terc-4,5-didro-3-metil-tiol-1,2,4-triazin-5-ona) foi determinado pela metodologia BiFE-SWV apresentando um LOD de 6 µmol L⁻¹. O método desenvolvido com o BiFE apresentou melhores resultados quando confrontado com os resultados da determinação do mesmos herbicida com GCE. O BiFE foi preparado em GCE, aplicando-se um potencial -0,53 V, por 360 s, em solução H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹, contendo Bi(III) 125 mg L⁻¹ (MORENO et al., 2009).

Recentemente, a pendimentalina foi determinada, em um sistema *in situ*, utilizando a metodologia BiFE-SWV, obtendo um LOD de 37,0 nmol L⁻¹ em amostras reais de água da região. Um potencial constante de -0,250 V por 80 s era aplicado no GCE, em solução de ácido clorídrico (pH 3,0), Bi(III) com concentração de 10,0 µmol L⁻¹, para a confecção do BiFE (GERENT et al., 2015).

Além dos já citados, também foram relatados estudos da utilização do BiFE para determinação de vários compostos de relevância biológica, apesar da complexidade das amostras.

Yang et al. (2006) determinaram a metalotioneína (MT) usando BiFE-DPASV. A MT é uma representante das metaloproteínas que desempenham importantes papéis biológicos e ambientais, tais como no metabolismo e na desintoxicação de alguns metais. Em pH 2 e 5,5, dois picos anódicos bem definidos foram produzidos e atribuídos ao Zn(II) e Cd(II) inerente à MT. A curva de calibração relacionada ao Cd(II) mostrou uma boa linearidade com um LOD de 38,6 nmol L⁻¹ para a MT.

Lima e Spinelli (2013) desenvolveram um método eletroanalítico para determinação do hormônio progesterona, empregando o eletrodo de filme de bismuto (BiFE). A redução eletroquímica da progesterona 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR 0,1 mol L^{-1} (pH 12,0) foi investigada e constatou-se uma transferência eletrônica irreversível de 1 elétron, com presença de reação química acoplada. Para o desenvolvimento da metodologia, a voltametria de onda quadrada foi a técnica escolhida. Os parâmetros otimizados foram: frequência 70 Hz, amplitude 50 mV e incremento de potencial 2 mV. Nessas condições, foi obtido um pico de intensidade de corrente em -1,63 V referente à redução da progesterona, a qual respondeu de forma linear, na faixa de 0,40 a 7,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$, apresentando um limite de detecção de 0,18 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método foi aplicado na determinação de progesterona em quatro amostras de fármacos.

Apesar dos estudos com BiFE para compostos orgânicos terem aumentado, não há muitos registros na determinação de vitaminas do Complexo B com o BiFE.

2.4.3 Emprego do BiFE com substrato de cobre

Os BiFEs são preparados por deposição de bismuto sobre um substrato de material adequado. Segundo Oliveira (2008), a formação do BiFE sobre um determinado substrato tem como princípio a construção de um eletrodo quimicamente modificado, na qual a superfície modificada possui propriedades químicas e físicas diferentes do material sobre o qual foi feita a deposição. Essas propriedades podem proporcionar ao eletrodo maior sensibilidade e seletividade.

Na literatura, são encontrados diversos tipos de substratos para os BiFEs, como eletrodos de carbono vítreo - GCE (LIMA; SPINELLI, 2013), filme de carbono eletrogerado (PAULIUKAITĖ, R.; BRETT, 2005), eletrodo de diamante dopado com boro - BDDE (BANKS et al., 2005), fibra de carbono - CF (LIN et al., 2005), eletrodos de pasta de carbono - CPE (HUTTON et al., 2004; KRÓLICKA et al., 2002; BERNARDELLI et al., 2011), eletrodos impressos (KADARA; TOTHILL, 2005), eletrodos metálicos: Cu (LEGEAI; BOIS; VITTORI, 2006), Pt (WANG et al., 2011) e Au (BALDRIANOVA et al., 2006).

O cobre é o material condutor mais comumente usado; tem alta condutividade térmica e elétrica, boas propriedades mecânicas, resistência à corrosão e fácil conexão (SMITH; HASHEMI, 2012). O cobre é amplamente empregado em eletroanalítica na confecção de eletrodos para manter o contato com o circuito elétrico. No entanto,

conforme pesquisa bibliográfica, é um material pouco utilizado como substrato para construção de eletrodos de filme de bismuto.

Alguns trabalhos descritos na literatura utilizaram o cobre como substrato do BiFE. O primeiro estudo utilizando o cobre como substrato para deposição do Bi(III), determinou o cátion de Cd(II) em amostras reais de água potável, utilizando a metodologia BiFE-DPASV, no modo *ex situ*, relatando o LOD de $2,9 \text{ nmol L}^{-1}$ para Cd(II). Os dados foram validados por medidas de polarografia e (ICP-MS) (LEGEAI; VITTORI, 2006).

Ainda utilizando o cobre como substrato para formação do BiFE, Legeai, Bois e Vitorri (2006) prepararam o BiFE no modo *ex-situ* por eletrodeposição com a cronoamperometria. Um potencial de 1,0 V vs. Ag / AgCl é aplicado durante 0,1 s, em seguida, ele é subitamente reduzido a 0,05 V vs. Ag / AgCl por 0,02 s. Esse processo tem que ser repetido 1000 vezes. Os BiFEs foram utilizados para monitorar o conteúdo Ni(II) em águas subterrâneas e água da torneira. A voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV) foi utilizada, obtendo curvas de calibração lineares para Ni(II) em concentrações que variam de $10,0 \text{ nmol L}^{-1}$ a $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Em seu trabalho, Nunes (2007) otimizou a formação do filme de bismuto sobre cobre pelo modo *ex situ*. Ele usou potencial de deposição de -150 mV em 300 s, numa solução de nitrato de bismuto $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. A resposta analítica por voltametria de redissolução anódica por onda quadrada (SWASV) apresentou limites de detecção de $1,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, para os íons Cd(II) e de $28,0 \text{ nmol L}^{-1}$, para os íons Pb(II). Ao adicionar o aditivo citrato de sódio $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ na preparação do BiFE, houve uma diminuição nos limites de detecção para $63,0 \text{ nmol L}^{-1}$ e 25 nmol L^{-1} , respectivamente (NUNES; FARIA, 2008).

O pesticida paraquat foi determinado por Figueiredo-Filho et al. (2010). O BiFE foi depositado no cobre, no modo *ex situ*, aplicando um potencial de -0,18 V por 200 s. O eletrodo de cobre foi imerso numa solução contendo $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, citrato de sódio $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $1,5 \text{ mol L}^{-1}$. A curva de calibração para o paraquat, usando a técnica de DPV, tem comportamento linear para o paraquat de $0,66 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a $48,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $93,0 \text{ nmol L}^{-1}$. O método apresentou resultados satisfatórios, com um nível de confiança de 95% para amostras de água.

Em sua pesquisa, Kreft et al. (2012) propuseram a determinação da cianocobalamina (vitamina B₁₂) por voltametria de redissolução adsortiva por onda quadrada (SWAdSV). A eletrodeposição do BiFE no

substrato de cobre foi realizada pelo modo *ex situ*, utilizando a coulometria de potencial controlado. Foi aplicado um potencial de deposição de -0,3 V, durante 10 s, sob agitação constante de 500 rpm, em uma solução de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ 0,2 mmol L^{-1} em HCl 1,0 mol L^{-1} . Uma etapa de pré-concentração foi usada aplicando -1,2 V por 30 s. A curva de calibração obtida em tampão Britton-Robinson (pH 12,0) tem comportamento linear de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r^2 = 0,9980$) com limite de detecção de 33,1 nmol L^{-1} . O BiFE foi aplicado com sucesso na determinação de produtos farmacêuticos.

2.5 VITAMINAS

De um modo geral, o valor nutritivo de um alimento era definido com base no seu teor de proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais. Com o tempo, percebeu-se que determinados alimentos apresentavam substâncias capazes de eliminar diversos sintomas de doenças, chamando a atenção para o valor nutritivo dessas substâncias. Em 1911, o termo “Vitamina” surgiu para designar tais substâncias, pois se acreditava que todas as vitaminas eram aminas (BOBBIO, O.; BOBBIO, A., 1995).

As vitaminas diferem entre si quanto à estrutura, propriedades químicas e biológicas. Elas são classificadas de acordo com a sua solubilidade, sendo divididas em dois grupos: as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e as hidrossolúveis (B e C). Algumas poucas vitaminas, como a D_3 , a K_2 e a PP são sintetizadas pelo organismo por via anabólica, já as demais não são. A carência de vitaminas no corpo é causada pela má absorção realizada pelo organismo ou então devido à falta de ingestão vitamínica em forma de alimento ou suplemento. No entanto, não é correto raciocinar que devemos ingerir apenas as vitaminas não essenciais. A ingestão de todas as vitaminas é necessária, mesmo para as vitaminas que o organismo é capaz de sintetizar, porque a quantidade sintetizada não é suficiente para atingir os níveis mínimos para o bom funcionamento do organismo (CHATTERJEE; FOORD, 2009).

De um modo geral, o organismo necessita de micro-quantidades de vitaminas, mas a dose a ser administrada pode variar a depender da idade, sexo e atividade física do indivíduo. Além disso, a exigência dessas substâncias pode aumentar durante determinadas doenças, período de crescimento, gestação e lactação (MORESCHI, 2006).

A estreita relação entre boa alimentação e a saúde faz com que os consumidores busquem cada vez mais ingerir alimentos com mais

vitaminas. Nesse sentido, os alimentos fortificados tornam-se bastante atrativos. No entanto, a adição desses compostos aos produtos é apenas uma estratégia de *marketing* para conquistar o consumidor, uma vez que a grande maioria deles não atende de fato às reais necessidades do indivíduo (PAIXÃO; STAMFORD, 2004).

Com o objetivo de garantir que os produtos oferecidos aos consumidores atendam à legislação vigente, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis, rápidos, reprodutíveis, seletivos e robustos para a quantificação das vitaminas. Assim, tanto na área alimentícia, quanto na farmacêutica, as vitaminas hidrossolúveis e as lipossolúveis têm sido alvos de inúmeras pesquisas em função da sua grande importância biológica no sistema metabólico humano.

2.5.1 Vitamina B₂

As vitaminas diferem entre si quanto à estrutura, propriedades químicas e biológicas (BOBBIO, O.; BOBBIO, A., 1995). O principal método de classificação das vitaminas é realizado acordo com a sua solubilidade: as hidrossolúveis (B e C) e as lipossolúveis (A, D, E e K) (MASSEY, 2000).

As vitaminas hidrossolúveis não são armazenadas no organismo e, portanto, devem ser ingeridas diariamente na alimentação ou complementadas por meio de suplementos ou fármacos. Entretanto, as vitaminas lipossolúveis são armazenadas nos tecidos adiposos, diminuindo, e não eliminando, a necessidade de sua ingestão. Entre as vitaminas hidrossolúveis, há um grupo de vitaminas denominadas vitaminas do complexo B. Esse é constituído por um conjunto de oito vitaminas (SILVA, 2010):

- Vitamina B₁ (tiamina);
- Vitamina B₂ (riboflavina);
- Vitamina B₃ (niacina);
- Vitamina B₅ (ácido pantotênico);
- Vitamina B₆ (piridoxina);
- Vitamina B₇ (biotina);
- Vitamina B₉ (ácido fólico) e;
- Vitamina B₁₂ (cobalamina);

Entre as vitaminas do complexo B, encontra-se a vitamina B₂ ou Riboflavina, responsável por originar muitas das flavinas que se encontram ligadas a diversas enzimas (MASSEY, 2000). A vitamina B₂ é o analito de interesse deste trabalho.

Por volta de 1920, houve a observação de que uma parcela do extrato hidrossolúvel de leveduras possuía uma fluorescência verde-amarelada. Ensaios em ratos foram realizados constatando-se uma relação entre a aplicação do extrato e o crescimento dos ratos. Essa relação foi chamada de fator de crescimento. Em 1933, a substância com fluorescência verde-amarelada foi isolada por Kuhn, György e Wagner-Jauregg, no Instituto Kaiser Wilhelm, a partir do ovo, sendo chamada de ovoflavina (PERVEEN; YASMIN; KHAN, 2009).

Logo em seguida, o mesmo grupo de pesquisadores isolou essa substância a partir do soro do leite, chamando-a de lactoflavina. Ao mesmo tempo, Ellinger e Koschara, da Universidade de Düsseldorf, isolaram substâncias semelhantes a partir de fígado, rim e músculos. Esses fatores de crescimento solúveis em água começaram a ser designados como flavinas (VILLELA; HARGREAVES, 1945).

Em 1934, o grupo de Kuhn determinou a estrutura das flavinas (SOUZA, 2005). O prefixo ribo foi consagrado no nome pelo qual conhecemos o composto atualmente, por causa da cadeia ribitol. Além do leite que, como mencionado, foi uma das primeiras fontes de obtenção, a riboflavina (vitamina B₂) é encontrada também em carne, peixe e, principalmente, em vegetais de cor verde-escura.

A vitamina B₂, riboflavina, com o nome oficial de 7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina, é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B. Ela apresenta coloração amarela e é fluorescente. Essa vitamina foi isolada (apesar de não purificada) pela primeira vez, em 1879, pelo químico inglês A. Wynter Blyth. Em seus estudos relacionados à composição do leite de vaca, ele relata a identificação de um pigmento amarelo brilhante que chamou de “lactocromo” e que hoje nós conhecemos como sendo a vitamina B₂ (COMBS JUNIOR, 2008).

Vários nomes, tais como lactoflavina e ovoflavina, foram propostos para o composto a fim de estabelecer correlação com a fonte através da qual ele foi isolado. No entanto, o prefixo “ribo” foi o escolhido para compor o nome pelo qual conhecemos o composto atualmente, devido à cadeia ribitol. Já a cor amarelada, característica da vitamina B₂, é proveniente do sistema π , conjugado nos anéis isoaloxazina (SOUZA, 2005).

Além do leite que, como mencionado, foi uma das primeiras fontes de obtenção, a vitamina B₂ pode ser encontrada também em carnes, peixes e, principalmente, em vegetais de cor verde-escura. A fórmula estrutural da vitamina B₂ é mostrada na Figura 2.

Sua carência provoca rachaduras nos cantos da boca e nariz, estomatite, coceira e ardor nos olhos, inflamações das gengivas com sangramento, língua arroxeadada, pele seca, depressão, catarata, letargia e histeria.

A riboflavina (vitamina B₂) é de fundamental importância para organismos aeróbios, pois é precursora de importantes coenzimas participantes da cadeia transportadora de elétrons, como a flavina adenina dinucleotídeo (FAD, do inglês *flavin adenine dinucleotide*) e a flavina mononucleotídeo (FMN, do inglês *flavin mononucleotide*). Quando proveniente da dieta, a vitamina B₂ encontra-se na forma das coenzimas FAD e FMN ligadas a proteínas (NIAZI; AMJADI, 2007).

A riboflavina (vitamina B₂) existe amplamente em matrizes biológicas, farmacêuticas e alimentares, o que justifica a grande importância de sua determinação. As fórmulas estruturais da vitamina B₂, FAD e FMN estão mostradas na Figura 3.

As flavinas têm em comum o sistema de anel isoaloxazina que é o responsável pela fluorescência e pelos processos redox. O processo redox das flavinas é termodinamicamente reversível, independentemente do número de elétrons transferidos, o que significa que os seus estados redox (reduzida, semiquinona ou oxidada) devem ser considerados (YAMASHITA; ROSATTO; KUBOTA, 2002). O mecanismo eletroquímico, associado com o processo redox da vitamina B₂ participa de reações químicas com transferência tanto de dois, como também de um elétron, conforme a Figura 4 (MASSEY, 2000).

Além disso, em soluções aquosas e na ausência de qualquer tipo de enzimas, ocorre um equilíbrio entre a forma oxidada e a forma reduzida da vitamina B₂, conforme a Equação 9 (SOUZA, 2005).

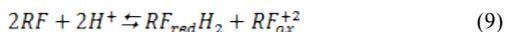
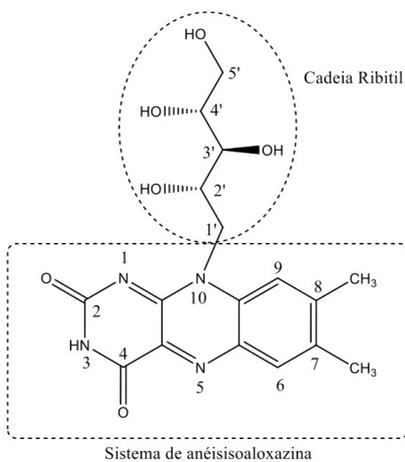
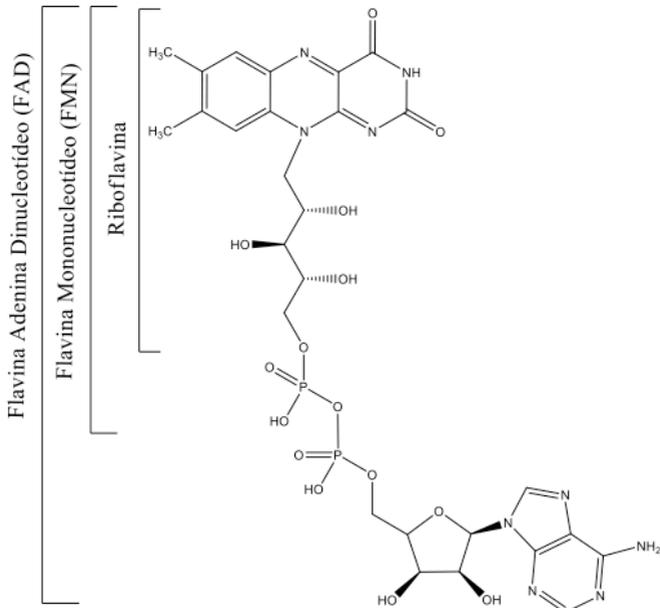


Figura 2 – Estrutura química da riboflavina (vitamina B2). Em destaque, a cadeia ribitol e o sistema de anéis isoaloxazina, que apresenta o sistema π conjugado.



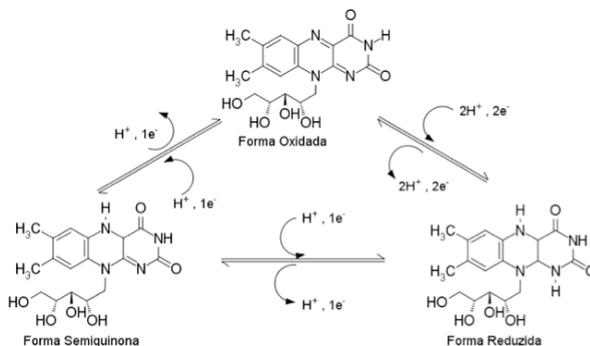
Sistema de anéis isoaloxazina
Fonte: Adaptado de SOUZA et al. (2005).

Figura 3 – Estrutura química das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), da riboflavina (vitamina B₂).



Fonte: Adaptado de TAN; KAN; WEBSTER (2013), YAMASHITA; ROSATTO; KUBOTA, (2002) e MASSEY (2000).

Figura 4 – Processo redox do sistema de anéis isoaloxazina na estrutura da riboflavina mostrando as formas: reduzida, oxidada e semiquinona.



Fonte: Adaptado de TAN; WEBSTER, (2012), YAMASHITA; ROSATTO; KUBOTA, (2002) e MASSEY (2000).

Recentemente, foi proposto um mecanismo de transferência de elétrons acoplados a transferências de prótons (PCET, do inglês *proton coupled electron transfer*) para a vitamina B₂ em solvente orgânico aprótico dimetil sulfóxido (DMSO) (TAN; WEBSTER, 2012). No entanto, as reações que ocorrem em DMSO não podem ser as mesmas em meio aquoso. Muitos estudos eletroquímicos foram realizados em flavinas em soluções aquosas tamponadas, sendo amplamente aceito que, em meio aquoso, as flavinas, integralmente na forma oxidada (FMN), são reduzidas (FMNH₂) em "uma etapa". Nessa etapa, a transferência de 2 elétrons e de 2 prótons ocorrem em um processo voltamétrico observável. No entanto, é improvável que a protonação irá ocorrer a pH muito elevado, pois não haverá prótons suficientes em solução para serem utilizados nessa reação (WEI, 2008).

A vitamina B₂ é o principal componente redox ativo das flavinas e possui três estados redox (reduzida, semiquinona ou oxidada) acessíveis, semelhantes a quinonas, que devem ser considerados, cada um com formas de protonação e desprotonação, conforme a Figura 5. A elucidação de reações de transferência de elétrons e propriedades redox da vitamina B₂ é fundamental para compreender a sua função bioquímica.

SALVADÓ, 2000; ALBALA'-HURTADO, 1997; NEVADO; FLORES; LLERENA, 1994; HASHMI et al., 1969) detector por espectrofotometria UV/VIS (TEROL et al., 2012; PERVEEN et al., 2009); detector por rede de diodos (KLEJDUS et al., 2004); detector por espectrometria de massa (GUO; LU; DONG, 2006; MIDTTUN, et al., 2005); detector de espectrometria de massa equipado com uma sonda elétrica pulverizadora de íons (MITROFANOV et al., 2009; CHEN, Z.; CHEN, B.; YAO, 2006) e; detector de espectrometria de massa equipado com uma sonda elétrica pulverizadora de íons e analisador quadrupolo único (LEPORATI et al., 2005).

A vitamina B₂ também pode ser determinada por meio de técnicas diversas: por espectrofotometria UV/Vis (BARTZATT; WOL, 2014; NIAZI; ZOLGHARNEIN; AFIUNI-ZADEH, 2007; LÓPEZ-DE-ALBA, et al., 2006); por análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica (ANICETO et al., 2000); por fluorescência (LEÓN-RUIZ; VERA; ANDRÉS, 2005; GARCÍA et al., 2001); por quimiluminescência (QI; CAO; HOU, 2011; WANG et al., 2007; PEREZ-RUIZ et al., 1994); por eletroquimiluminescência (ZHANG; QI, 2002); por eletroforese capilar (CHEN; SUN; LIU, 2012; HU et al., 2007; HUSTAD; UELAND; SCHNEEDE, 1999); por espectro eletroquímica (SHUMYANTSEVA et al., 2004); por determinação microbiológica (BRADFORD; COKE, 1945; STRONG; CARPENTER, 1942; ARNOLD; LIPSIUS; GREENE, 1941). No entanto, algumas dessas técnicas não têm seletividade e sensibilidade suficientes. Vale ressaltar, que essas técnicas podem ser demoradas e envolvem procedimentos complicados, além de exigir instrumentação de alto custo.

A determinação eletroquímica é uma alternativa interessante, uma vez que apresenta baixo custo da análise e requer instrumentação simples, além de, em alguns casos, poder ser realizada *in loco*.

2.5.3 Estudos eletroquímicos e determinações eletroanalíticas de vitamina B₂

Há na literatura várias metodologias utilizando técnicas eletroquímicas para caracterizar ou determinar a vitamina B₂ em diversas matrizes, principalmente, em preparações farmacêuticas e produtos alimentares. Apesar de existir um grande excesso de substâncias nas preparações farmacêuticas e nos alimentos, considerando amostras bem complexas, os métodos utilizando técnicas

eletroanalíticas têm sido ajustados para que a determinação não sofra interferência.

O estudo do comportamento eletroquímico das flavinas é um grande desafio quando realizado em um eletrodo de trabalho sólido, pois há relatos na literatura de efeitos deletérios e efeitos de adsorção. Chatterjee e Foord (2009) usaram três tipos distintos de eletrodos sólidos de diamante, como WE, para realizar o estudo do comportamento eletroquímico da vitamina B₂. Foram analisados dois WEs de nanodiamante, um comercial e um produzido artesanalmente no próprio laboratório, preparados por deposição química de vapor por filamento quente (HFCVD, do inglês *hot filament chemical vapor deposition*). No diamante comercial foi observada uma rápida transferência de carga, devido à adsorção acentuada da vitamina B₂ no WE. O WE artesanal mostrou um comportamento similar ao comercial, com uma diferença de cerca de 10% nas medidas. Em contraste, o WE microcristalino de alta pureza mostrou uma pequena tendência à adsorção da vitamina B₂, possibilitando que a transferência de carga seja controlada por difusão.

Wang et al. (1985) utilizaram AdSV, com uma etapa de pré-concentração de 30 min, para a detecção de até 25,0 pmol L⁻¹ de vitamina B₂ com a técnica DPV. Essa técnica em conjunto com a etapa de pré-concentração, relatados na literatura, melhora a forma do sinal eletroquímico e a sensibilidade da corrente por minimizar as interferências.

Wu et al. (2007) determinaram traços de vitamina B₂ em comprimidos de multivitamínicos usando eletrodos de carbono grafite aquecidos eletricamente (HGCEs, do inglês *hot glassy carbon electrode*), como o eletrodo de trabalho. Os HGCEs foram feitos a partir do grafite de lápis. Para determinar traços da vitamina B₂ foi usada a SWAdSV. A corrente de pico foi significativamente aumentada com o aumento da temperatura do eletrodo apenas durante a etapa de pré-concentração. Esse reforço ocorre devido à convecção térmica forçada por aquecimento do WE, que aumenta a transferência de massa e facilita o acesso da vitamina B₂ à superfície do WE. O parâmetro de acumulação otimizado para a determinação da vitamina B₂ foi a manutenção da temperatura do HGCE a 72°C, por 5 min. A faixa linear encontrada para a curva de calibração foi de 70,0 nmol L⁻¹ a 3,0 μmol L⁻¹, com LOD de 5 nmol L⁻¹.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho consiste em desenvolver uma metodologia eletroanalítica para determinação da vitamina B₂, riboflavina, empregando o eletrodo de filme de bismuto depositado na forma *ex situ* sobre um substrato de cobre metálico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Deposição *ex situ* do filme de bismuto em substrato de cobre metálico e estudo do comportamento eletroquímico da vitamina B₂

- Estudar o comportamento eletroquímico do Bi(III) em HCl 1,0 mol L⁻¹ sobre eletrodo de cobre e otimizar os parâmetros para a deposição *ex situ* do filme: potencial de deposição e tempo de deposição.
- Estudar o comportamento eletroquímico da vitamina B₂.

3.2.2 Desenvolvimento e aplicação da metodologia

- Escolher a técnica de trabalho;
- Otimizar os parâmetros para a técnica escolhida;
- Construir a curva de calibração;
- Estudar os possíveis interferentes na determinação da vitamina B₂ nos fármacos;
- Quantificar a vitamina B₂ nas amostras farmacêuticas;
- Obter a porcentagem de recuperação e;
- Quantificar a vitamina B₂ através do método comparativo e tratar os dados estatisticamente.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

4.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram todos de grau de pureza analítica. O padrão usado foi a vitamina B₂ da Sigma. Os ácidos clorídrico, acético, bórico e fosfórico utilizados foram da Synth. Os sais nitrato de bismuto e fosfato ácido de sódio foram da Merk. O hidróxido de sódio utilizado para ajuste do pH foi da Merk.

4.1.2 Soluções

Todas as soluções foram preparadas empregando reagentes de grau analítico e água ultrapura, purificada por um sistema Millipore (Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, EUA), com resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹, garantindo condutividade de saída da água ultrapura menor que 0,055 μS cm⁻¹ a 25 °C. Para realizar a limpeza e higienização das vidrarias foi utilizada água purificada por osmose reversa e destilação, garantindo condutividade de saída da água pura menor que 1,5 μS cm⁻¹ a 25 °C.

A solução padrão de vitamina B₂ 100 μmol L⁻¹ foi preparada com a vitamina B₂ da Sigma, em água ultrapura. A solução foi acondicionada em recipiente adequado, recoberta por papel alumínio, para evitar deterioração fotoquímica, e foi mantida sob refrigeração até sua utilização. A solução era substituída mensalmente.

Para o estudo do eletrólito de suporte, foram preparadas as soluções de tampão fosfato (Na₂HPO₄ 0,1 mol L⁻¹; H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹), tampão acetato (CH₃COONa 0,1 mol L⁻¹; CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹) e tampão Britton-Robinson (CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹; H₃BO₃ 0,1 mol L⁻¹; H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹), todas na concentração de 0,1 mol L⁻¹ e pH 4,0.

Para o estudo do pH, foi preparada a solução de tampão Britton-Robinson na concentração de 0,1 mol L⁻¹ e pH 2,0. Para o ajuste do pH, foi utilizada uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. As soluções foram armazenadas em recipiente adequado e mantidas sob refrigeração.

A solução estoque de Bi(III) 20,0 mmol L⁻¹ foi preparada com a diluição da massa necessária de Nitrato de Bismuto (Merk), em HCl 1,0 mol L⁻¹ (Synth). Essa solução foi utilizada para a formação do

filme de bismuto na superfície do eletrodo de cobre usando o modo *ex situ*.

4.1.3 Amostras

As amostras contendo vitamina B₂ dos fármacos EMS do Complexo B® - solução oral (amostra A), xarope (amostra B) e comprimidos (amostra C) - foram adquiridas em uma farmácia na região de Florianópolis/SC-Brasil.

4.2 EQUIPAMENTOS

As medidas de pH foram realizadas em pHmetro da marca MARTE, modelo MB10. Para auxiliar no preparo de algumas dissoluções e para limpeza do eletrodo de cobre, foi usado um ultrassom UNIQUE (UNIQUE, São Paulo, Brasil) modelo UltraCleaner 800. Para agitação e homogeneização da solução, utilizou-se um agitador magnético da marca DIST, modelo DI-03. Para lixar manualmente o substrato do BiFE, em meio úmido, foi utilizada uma politriz da marca PANAMBRA, modelo DP-10, contendo como agente polidor uma lixa d'água de carbeto de silício 1200 mm. A massa dos reagentes sólidos foi determinada utilizando uma balança analítica Shimadzu (Filipinas), com 0,01 mg de precisão.

4.2.1 Experimentos voltamétricos

Voltamogramas cíclicos, de pulso diferencial e de onda quadrada foram obtidos em um potenciostato/galvanostato Metrohm Autolab B. V., modelo PGSTAT 101, em conjunto com o *software* Nova versão 1.8, conectado a um computador comercial. Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em temperatura ambiente e sem desaeração prévia das soluções.

Foram usados dois conjuntos de células eletroquímicas (EC) de 30 mL, com três eletrodos:

- para a formação do filme: eletrodo de referência (Ag/AgCl, 3,0 mol L⁻¹ KCl) da BASi RE-5B, eletrodo auxiliar (fio de platina) e eletrodo de trabalho (substrato de cobre);
- para estudos da vitamina B₂: eletrodo de referência (Ag/AgCl, 3,0 mol L⁻¹ KCl) da BASi RE-5B, eletrodo auxiliar (fio de

platina) e eletrodo de trabalho (substrato de cobre recoberto com BiFE).

4.2.2 Experimentos de fluorimetria

Os espectros de fluorescência foram determinados em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500, equipado com uma célula de quartzo de 1,0 centímetro. As fendas de excitação e emissão do monocromador foram ajustadas para 2,5 nm. As amostras foram excitadas em 440 nm e os espectros de emissão foram corridos de 450,0 a 650,0 nm, com emissão máxima em 523 nm.

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Experimentos voltamétricos

4.3.1.1 Obtenção do eletrodo de filme de bismuto

O eletrodo de trabalho foi fabricado no próprio laboratório a partir de materiais alternativos, fio de cobre e resina epóxi (Durepoxi®). A proposta da utilização de eletrodos não tradicionais (comercial) diminui os custos de análise eletroanalítica.

Para um material ser utilizado como substrato na confecção de eletrodos voltamétricos, ele deve apresentar como principais características: elevada inércia química, inércia eletroquímica numa ampla faixa de potenciais, elevado sobrepotencial para evolução de hidrogênio e oxigênio, baixa corrente residual, alta condutividade elétrica, além de propiciar uma fácil regeneração da superfície. O cobre possui alta condutividade elétrica, baixo custo, relativa resistência mecânica e, ainda, propicia uma fácil regeneração da superfície.

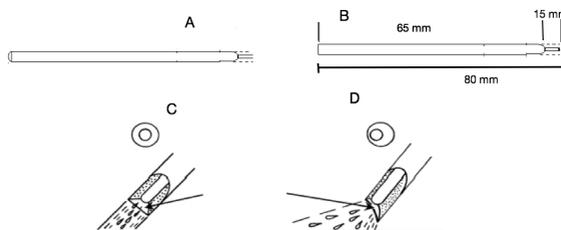
Um pedaço de fio de cobre comercial com cerca de 8 cm foi selecionado, lavado em água corrente com esponja e detergente e foi seco em estufa a 80°C, por 6 h. Após secagem, ele sofreu polimento por processo mecânico e trabalho manual, utilizando como agente polidor lixa d'água de carbo de silício 1200 mm. Depois de passar novamente por água corrente e secagem foi acondicionado em solução de ácido nítrico 10% por 24 h passando por lavagem e secagem novamente. É vital que sejam removidas todas as partículas na superfície do fio de cobre e que este esteja o mais limpo possível.

A resina epóxi é isolante, podendo acondicionar o cobre sem interferir na medida da corrente. A confecção de um eletrodo através do recobrimento do cobre com a resina epóxi é de fácil preparação e possui características interessantes: relativa resistência mecânica, relativo baixo custo de confecção, durabilidade e a possibilidade de regeneração da superfície.

A resina epóxi comercial é um produto que se apresenta em duas barras que, no momento do uso, devem ser intimamente misturadas em partes iguais. O procedimento de preparação do eletrodo consiste em misturar uma parte de resina e uma parte do endurecedor, na proporção de resina/endurecedor de 1:1 (m/m), e homogeneizar a mistura em um almofariz de vidro, até formarem uma massa cinza homogênea. Imediatamente, o fio de cobre (8 cm - bem limpo e seco) foi recoberto com a massa da mistura e modelado, num formato cilíndrico, com os dedos ou ferramenta umedecidos com água, até que a massa estivesse bem aderida à superfície do cobre, sendo necessária uma análise visual minuciosa para verificar a inexistência de rachaduras ou bolhas, para evitar infiltrações e garantir que a área de cobre seja constate. É necessário que uma extremidade seja utilizada como contato elétrico e a outra seja a superfície do eletrodo de trabalho. Portanto, uma das extremidades do eletrodo é vedada com a massa e a outra não, deixando uma ponta vazia (cerca de 1,5 cm) para ser conectada ao potenciostato. O eletrodo foi armazenado em um dessecador para o endurecimento (cura) por 24 h. O eletrodo de cobre está demonstrado na Figura 6A. Uma das suas pontas foi polida em uma politriz, com fluxo de água contínuo e 300 rpm de rotação constante, durante 30 s, conforme a Figura 6B. Essa é uma etapa relevante, pois se deve ter cuidado para que a superfície de cobre fique bem lisa e circularmente uniforme, para deixar a área de cobre constante, conforme a Figura 6C, evitando ao máximo a variação e deformação da área do cobre, conforme Figura 6D. A área geométrica de cobre na extremidade do CuE é de $0,0962 \text{ cm}^2$.

O eletrodo de cobre (CuE) foi polido por processo mecânico e trabalho manual, utilizando como agente polidor a suspensão de alumina de granulação $0,3 \mu\text{m}$ da METALOTEST, durante 60 s. Ele foi lavado com água destilada e colocado em um banho de ultrassom, durante 120 s, para remoção de possíveis partículas de alumina da superfície do eletrodo. É extremamente importante que sejam removidas todas as partículas de um abrasivo para confecção do BiFE.

Figura 6 – Confeção do eletrodo de cobre (A) Resina epóxi e fio de cobre; (B) Polimento de uma das extremidades do eletrodo; (C) A superfície de cobre tem que ficar sem ranhuras, lisa e circularmente uniforme; (D) Superfície não uniforme

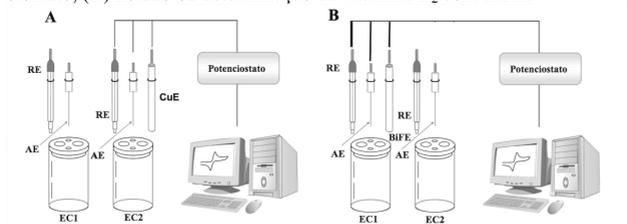


Fonte: Adaptado da página da BASi².

A Figura 7 apresenta os equipamentos básicos utilizados, neste trabalho, para o estudo da vitamina B₂ com o BiFE pelo modo ex situ. No esquema há a representação de um microcomputador, potenciostato, duas células eletroquímicas (EC1 e EC2), dois eletrodos de referência (RE), dois eletrodos auxiliares (AE) e um WE, que hora estão arranjados e conectados no sistema A e ora no sistema B. No primeiro momento, indicado pelo sistema A, os equipamentos eletrônicos estão conectados aos três eletrodos da célula eletroquímica (EC2), o EA, o ER e o CuE. Para a confecção do BiFE, o CuE é adicionado à célula eletroquímica EC2, que contém a solução de Bi(NO₃)₃ 20,0 mmol L⁻¹ em HCl 1,0 mol L⁻¹. A deposição do bismuto acontece devido à aplicação de um potencial constante em um determinado período de tempo, nesse caso, sem agitação. O CuE passa a ser o BiFE, pois ocorreu a formação do filme. O BiFE era lavado com água destilada e transferido para outra célula (EC1), conforme o sistema da Figura 10B, que contém a solução eletrolítica da vitamina B₂ para estudo ou determinação.

² Disponível em: < <http://www.basinc.com/products/ec.html> > Acesso em abr. 2015.

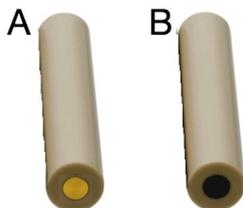
Figura 7 – Esquema demonstrativo do modo *ex situ* (A) Confeção do filme de bismuto; (B) Estudo ou determinação da vitamina B₂ com BiFE.



Fonte: Adaptado da página da BASi³.

O BiFE foi formado por deposição *ex situ*, no eletrodo de cobre em 20 mL de solução estoque de Bi(III), por cronamperometria, no qual foi aplicado um potencial de -0,15 V vs. Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) por 210 s, sem agitação. O eletrodo modificado foi lavado com água destilada, utilizando uma pisseta, e ficou pronto para uso. Após a medida, o filme foi removido por processo mecânico e todo processo de confecção do BiFE é repetido para realizar uma nova análise, a partir do polimento do CuE. A Figura 8 representa os eletrodos de trabalho utilizados: o eletrodo comercial de cobre (A) e o BiFE (B).

Figura 8 – Imagem do eletrodo de trabalho (A) comercial de cobre (B) BiFE.



Fonte: Adaptado da página da BASi⁴.

³ Disponível em: < <http://www.basinc.com/products/ec.html> > Acesso em abr. 2015.

⁴ Disponível em: < <http://www.basinc.com/products/ec.html> > Acesso em abr. 2015.

4.3.1.2 Estudos eletroquímicos e desenvolvimento da metodologia eletroanalítica

Antes de cada estudo eletroquímico ou determinação eletroanalítica era registrado o voltamograma do branco (somente o eletrólito de suporte, sem a vitamina B₂) com uma variação de potencial de -0,60 V até -0,15 V.

O estudo eletroquímico da vitamina B₂ era iniciado com a transferência do BiFE para uma célula eletroquímica, contendo 10 mL de uma solução de vitamina B₂ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na qual eram registrados os voltamogramas cíclicos, com uma variação de potencial de -0,60 V até -0,15 V.

Voltamogramas gerados sucessivamente com o mesmo filme e para a mesma determinação mostraram valores diversificados na leitura da intensidade de corrente, ora menores, ora mais elevados. Quando o voltamograma é iniciado em potenciais muito negativos resulta no decréscimo da corrente, devido à deterioração do filme. Buscou-se uma metodologia para a limpeza do filme, para que não fosse necessária a eletrodeposição do filme a todo o momento. Entretanto, houve a necessidade da confecção de um novo filme para cada determinação analítica.

4.3.1.3 Determinação da vitamina B₂ nas amostras

As descrições abaixo relatam os procedimentos de preparo das amostras utilizadas nas determinações de vitamina B₂.

O rótulo da solução oral (GOTAS) de Complexo B EMS (amostra A) indicava na embalagem uma quantidade de 2 mg de vitamina B₂ para 1 mL do produto. Um mililitro dessa amostra foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e completado com o eletrólito de suporte. Uma alíquota de 100 μL dessa solução foi retirada para ser colocada na célula eletroquímica (30 mL) com volume de 10 mL.

O rótulo do Xarope de Complexo B EMS (amostra B) indicava na embalagem uma quantidade de 1 mg de vitamina B₂ para 1 mL do produto. Dois mililitros dessa amostra eram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL e completado com o eletrólito de suporte. Uma alíquota de 200 μL dessa solução foi retirada para ser colocada na célula eletroquímica (30 mL).

O medicamento Complexo B – Polivitamínico do Complexo B (amostra C) anuncia 2 mg de vitamina B₂ por comprimido. Foram

pesados vinte comprimidos ($m = 5,1232 \text{ g}$) da amostra C e macerados em gral de porcelana. Uma massa de 253 mg foi transferida para um béquer de 100 mL, contendo 50 mL de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) e, logo após, submetido ao banho de ultrassom, durante 10 min, para uma completa dissolução da amostra. O volume da solução foi completado e ela foi filtrada em um funil de Büchner. O filtrado foi transferido para um balão de 50 mL e uma alíquota de 100 μL foi retirada para ser colocada na célula eletroquímica (30 mL).

4.3.2 Experimentos de fluorescência

Baseado na Farmacopeia Brasileira (1997), a fluorimetria ou espectroscopia de fluorescência foi utilizada como método comparativo, objetivando a validação do método desenvolvido neste trabalho para determinação de vitamina B₂ em fármacos.

A Farmacopeia Americana - USP-23 (1995) e a AOAC (1990) também recomendam o método fluorimétrico para a determinação da vitamina B₂, com excitação em comprimento de onda de 444 nm e medida da intensidade de fluorescência em 530 nm.

A curva de calibração para o padrão de vitamina B₂ foi obtida utilizando-se a solução estoque de vitamina B₂, que foi diluída para alcançar concentrações na faixa de 0,3 a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) e transferida para a cubeta, com volume de 3 mL. As amostras foram excitadas em 440 nm e os espectros de emissão foram corridos de 450,0 a 650,0 nm, com emissão máxima em 523 nm, utilizando o tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) como branco.

As quantificações da vitamina B₂ nas amostras farmacêuticas foram realizadas pelo método do padrão externo, no qual 3 mL de cada amostra (preparada como descrito na seção 4.3.1.3) foram colocados na cubeta, que, posteriormente, foi submetida à análise fluorimétrica, registrando-se espectros de fluorescência.

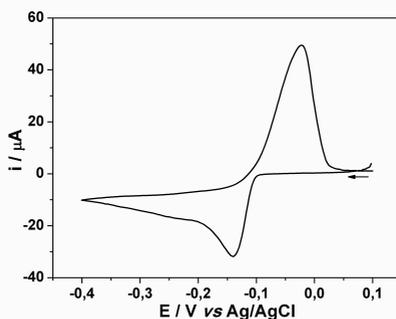
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARO DO BIFE E ATIVIDADE ELETROCATALÍTICA PARA A VITAMINA B₂

Para conhecer o comportamento eletroquímico de íons Bi(III), na superfície do eletrodo de cobre (CuE) em HCl 1,0 mol L⁻¹, foram registrados os dados de um voltamograma cíclico nesse sistema.

Na Figura 9, observa-se o voltamograma cíclico completo para CuE, imerso em uma solução de Bi(NO₃)₃ 20 mmol L⁻¹ e dissolvida em HCl 1,0 mol L⁻¹. O voltamograma registrado foi obtido com dados da variação do potencial aplicado no CuE, com velocidade de variação do potencial de 100 mV s⁻¹, partindo de 0,1 a -0,4 V, retornando até o potencial de partida, em 0,1 V. O voltamograma cíclico obtido é caracterizado por dois picos bem definidos, um pico de redução em -0,14 V (E_{pr}) e um pico de oxidação em -0,02 V (E_{po}), sugerindo que um potencial mais negativo que -0,14V precisa ser aplicado à solução de Bi(III) para que haja deposição de bismuto na superfície do eletrodo de cobre. A janela de potencial do BiFE é limitada pelo processo de oxidação do filme. A oxidação do bismuto tem intensidade de corrente máxima (i_{pa}) em -0,02 V (E_{po}). Porém a oxidação do bismuto inicia antes de ser encontrado o valor máximo de i_{pa}. Dessa forma, como garantia, potenciais menos negativos que -0,1 V não foram utilizados a fim de preservar a integridade do BiFE.

Figura 9 – Voltamograma cíclico para Bi(III) 20,0 mmol L⁻¹ em HCl 1,0 mol L⁻¹ sobre CuE, v=100 mV s⁻¹.



O eletrodo de trabalho influencia tanto o formato dos picos quanto a intensidade da corrente dos analitos na etapa de análise. O eletrodo de trabalho (BiFE), usado no estudo do comportamento da vitamina B₂, foi preparado pela eletrodeposição do bismuto metálico em substrato de cobre ($A = 0,0962 \text{ cm}^2$), aplicando um potencial constante no CuE, durante um intervalo de tempo definido por intermédio da técnica de cronoamperometria.

O procedimento de preparo do BiFE, no modo *ex situ*, foi descrito na subseção 4.3.1.1.

Com a intenção de obter a maior intensidade de corrente da vitamina B₂, ela foi usada como fator de referência para determinar, experimentalmente, a melhor opção de confecção do BiFE. Os parâmetros do potencial (E_d) e do tempo (t_d) de deposição foram determinados experimentalmente em função do sinal eletroquímico i_{pa} da vitamina B₂. Em segundo plano, foi considerado o perfil do pico voltamétrico e a qualidade do filme. Para analisar a qualidade do filme, foram observados o recobrimento total da superfície, a aderência ao substrato e o aspecto homogêneo (NUNES, 2007).

Com o objetivo de que a formação de um filme, que recobre toda a superfície do eletrodo, seja aderente ao substrato e homogêneo, foram determinados os parâmetros E_d e t_d . Primeiramente, analisando E_d (considerando um intervalo de tempo constante) e, posteriormente, t_d (aplicando um potencial constante, no caso, o E_d que foi selecionado anteriormente).

Os BiFEs foram preparados, para análise da aplicação do E_d , num intervalo de valores de potencial entre -0,4 a -0,1 V (-0,10; -0,15; -0,20; -0,25; -0,30; -0,35 e -0,40 V) com t_d constante de 90 s. Após a preparação, o BiFE era movido para uma célula eletroquímica contendo solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) e 100 μmol L⁻¹ de vitamina B₂. Foi aplicada uma variação de potencial de -0,1 a -0,6 V e retornando ao potencial inicial de -0,1 V. O perfil voltamétrico da vitamina B₂ foi registrado entre os potenciais de -0,1 a -0,6 V, partindo de -0,1 a -0,6 V e retornando ao potencial inicial de -0,1 V, identificando os potenciais de redução ($E_{pr} = -0,31 \text{ V}$) e oxidação ($E_{po} = -0,23 \text{ V}$) da vitamina B₂, sendo utilizado como referência para a confecção dos gráficos o valor de intensidade da corrente anódica (i_{pa}). A Figura 10A é a plotagem dos dados de análise de i_{pa} vs. E_d . A análise completa por CV da vitamina B₂ será exemplificada na seção 5.2 deste trabalho.

Quanto menor fosse o E_d aplicado, em direção a potenciais negativos, num intervalo de tempo de deposição constante, foi

observado o aumento da espessura do filme, resultando num decréscimo no valor da corrente (i_{pa}) para a vitamina B₂, o que indica uma dependência entre o decréscimo do pico do analito e o aumento da espessura do filme.

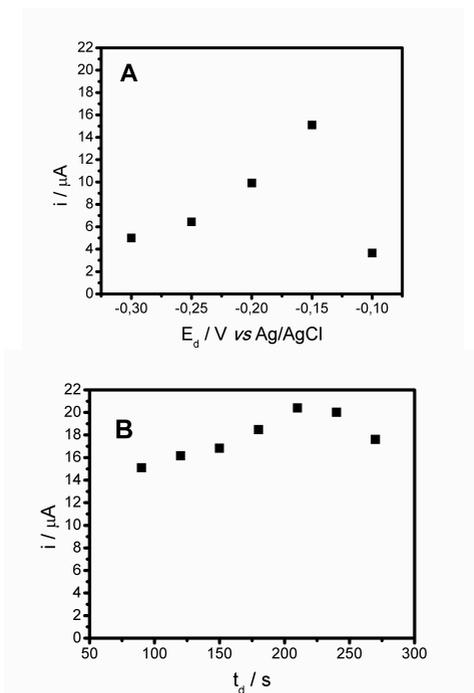
Ao selecionar condições que favoreçam a formação do filme, como por exemplo, o uso de valores de potencial de deposição muito negativos, é possível observar que elas proporcionam o aumento da eletrodeposição do bismuto. Porém, o filme apresenta recobrimento inadequado da superfície do substrato, uma superfície irregular, um sinal de corrente insatisfatório, além de uma baixa estabilidade mecânica.

A estabilidade mecânica é afetada de forma que, a partir de determinado potencial, levando em consideração a solução de Bi(NO₃)₃ 20,0 mmol L⁻¹ em HCl 1,0 mol L⁻¹, visualmente verifica-se o aumento da espessura do BiFE com a diminuição de E_d (no sentido de potenciais mais negativos), acarretando na precipitação do filme na solução, a partir de E_d de -300 mV, com t_d de 90 s.

Outro fator relevante para potenciais muito negativos é a reação de desprendimento de hidrogênio, que formará bolhas de gás sobre o BiFE aumentando a sua rugosidade e, em alguns casos, acarretando na precipitação do filme na solução. Em voltamogramas cíclicos que haja potenciais muito negativos, essa reação é evidenciada pelo aumento abrupto da intensidade de corrente catódica (i_{pa}) (ÂNGELO et al., 2001).

Desse modo, a espessura do BiFE poderá comprometer as propriedades elétricas da superfície do eletrodo de trabalho. Por outro lado, no entanto, aumentando-se o E_d aplicado, em direção a potenciais positivos no sentido do potencial de redução do bismuto, verifica-se o aumento da intensidade de corrente da vitamina B₂ e, visualmente, observa-se a diminuição da rugosidade apresentando um filme mais homogêneo. Porém, quando um dado potencial é atingido, ocorre um decréscimo na intensidade da corrente em função da oxidação do bismuto metálico a Bi(III). O maior valor da intensidade de corrente (i_{pa}) em conjunto com o melhor perfil voltamétrico foi observado em $E_d = -0,15$ V, ilustrado na Figura 10A.

Figura 10 – Influência dos parâmetros de preparação *ex situ* do BiFE na i_{pa} da vitamina B₂: (A) potencial de deposição, $t_d = 90$ s, (B) tempo de deposição, $E_d = -0,15$ V na intensidade de corrente da vitamina B₂ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) por voltametria cíclica $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Para selecionar o t_d , os BiFEs foram preparados num intervalo de valores de t_d entre 90 a 300 s, com E_d constante de -0,15 V. A Figura 10B é a plotagem dos dados de análise de i_{pa} vs. t_d . Dependendo dos parâmetros utilizados, o recobrimento da superfície era inadequado. Com o aumento do tempo de deposição foi observado, visualmente, um aumento no recobrimento da superfície do substrato e um aumento na homogeneidade do filme, resultando num aumento da intensidade de corrente medida. Porém, com o aumento da espessura do filme, ocorre a

diminuição do sinal i_{pa} , conforme já citado anteriormente. O t_d selecionado foi de 210 s.

A partir desse momento, todos os BiFEs foram produzidos com os parâmetros otimizados de E_d de -0,15 V e t_d de 210 s, para o estudo eletroquímico e determinação eletroanalítica da vitamina B₂.

O eletrodo de trabalho influencia tanto o formato dos picos quanto a intensidade da corrente dos analitos na etapa de análise. Após cada eletrodeposição, o eletrodo de filme de bismuto era submetido ao teste de aderência, que consistia na lavagem do filme com água destilada. Se fosse verificada qualquer alteração no BiFE, como rugosidade ou descobrimento de uma pequena área da superfície, o filme era descartado e refeito.

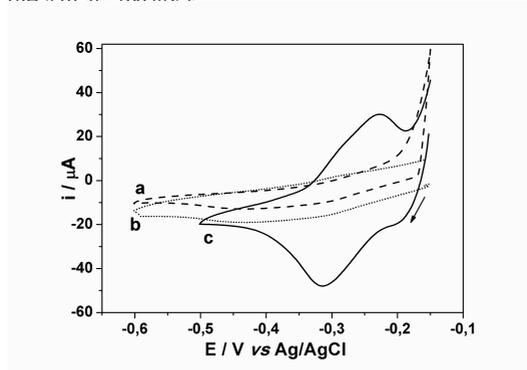
5.2 ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DA VITAMINA B₂ UTILIZANDO VOLTAMETRIA CÍCLICA

O comportamento ciclovoltamétrico da vitamina B₂ no BiFE foi estudado em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0), para verificar se há alguma interferência ou sobreposição entre os voltamogramas, dificultando a determinação da vitamina B₂. Os voltamogramas cíclicos foram registrados entre os potenciais de -0,15 a -0,6 V, partindo de -0,15 a -0,6 V e retornando ao potencial inicial de -0,1 V.

Na Figura 11 em (a), observa-se o voltamograma cíclico completo para o branco do eletrodo de trabalho, CuE (somente o eletrólito de suporte), não sendo registrado nenhum sinal de redução ou oxidação do cobre no eletrólito de suporte. Na Figura 11 em (b), observa-se o voltamograma cíclico completo para o branco do BiFE (somente o eletrólito de suporte) e, como esperado, não foi registrado nenhum sinal de redução ou oxidação do BiFE no eletrólito de suporte.

Desse modo, na Figura 11 em (c), o voltamograma completo do BiFE, em presença da vitamina B₂ 100 μmol L⁻¹, registrou a presença de um par de picos bem definidos: por um processo de redução com intensidade máxima de corrente, aproximadamente, em -0,31 V e; um processo de oxidação, com intensidade máxima de corrente, aproximadamente, em -0,23 V.

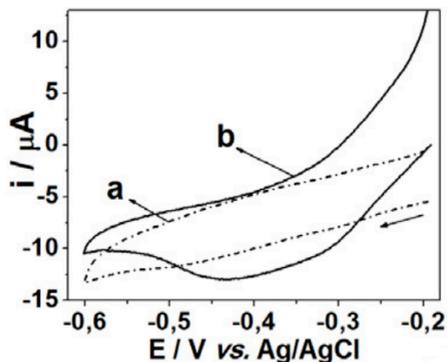
Figura 11 – Voltamogramas cíclicos completos para: (a) CuE, (b) BiFE, (c) BiFE na presença de vitamina B₂ 100 μmol L⁻¹, todos em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$



No início do voltamograma, quando é aplicado o potencial de -0,1 V, a vitamina B₂ está na forma oxidada (quinona). Por isso, o pico em -0,31 V corresponde à reação da vitamina B₂ para a forma reduzida (hidroquinona), enquanto que o pico em -0,23 V corresponde à reação de volta para a forma oxidada. Essa interpretação está de acordo com os dados publicados por Massey (2000) e envolve a transferência de dois prótons e dois elétrons, durante as reações eletroquímicas. Entretanto, a separação entre os potenciais de oxidação e redução, $\Delta E_p = E_{po} - E_{pr} = 80 \text{ mV}$ indicam uma taxa lenta para a reação de transferência de elétrons (carga), embora a relação entre a corrente anódica e catódica seja $\left| \frac{j_{pa}}{j_{pc}} \right| \approx 1,0$.

A Figura 12 mostra os registros dos voltamogramas cíclicos do substrato de cobre (CuE), isento do filme de bismuto, imerso em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0), sem a presença de vitamina B₂ em (a) e com a presença de vitamina B₂ 100 μmol L⁻¹ em (b), executados do mesmo modo que os experimentos anteriores: com a variação de potencial entre -0,15 a -0,6 V, partindo de -0,15 a -0,6 V e retornando ao potencial inicial de -0,1 V. Observa-se com muita clareza que não apareceram picos de redução ou de oxidação na ausência do BiFE. Sendo assim, pode-se concluir que o BiFE tem um efeito eletrocatalítico sobre a reação eletroquímica da vitamina B₂.

Figura 12 – Voltamogramas cíclicos do substrato de cobre (CuE), isento do filme de bismuto, imerso em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) (a) sem a presença de vitamina B₂ e (b) com a presença de vitamina B₂ 100 μmol L⁻¹.



O WE não é transformado durante a ocorrência da reação, servindo apenas como um aceitador ou doador de elétrons e participando do processo através de etapas de adsorção de reagentes e/ou intermediários. Considera-se como efeito electrocatalítico a alteração da cinética da reação eletroquímica em função da natureza (forma e estrutura eletrônica dos átomos na superfície do eletrodo) do material do eletrodo de trabalho (TICIANELLI; CAMARA; SANTOS, 2005; GONZALEZ, 2000).

Rajamani et al. (2014) citam o efeito electrocatalítico do material do eletrodo de trabalho, bismuto em forma geométrica nanohexagonal, na determinação simultânea de íons inorgânicos, obtendo valores de LODs em ppb.

A influência da velocidade de varredura do potencial sobre a vitamina B₂ na superfície do BiFE foi estudada. Inicialmente, foi aplicada uma variação de potencial no sentido negativo de -0,15 até -0,50 V, seguida de uma variação no sentido positivo até -0,15 V, em diferentes velocidades de variação do potencial (10-400 mV s⁻¹). Os voltamogramas cíclicos da Figura 13 mostram o comportamento eletroquímico referente à redução da vitamina B₂ 100 μmol L⁻¹, em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0), sobre o BiFE.

Os voltamogramas foram obtidos aplicando-se, inicialmente, uma variação de potencial no sentido negativo de -0,15 até -0,50 mV,

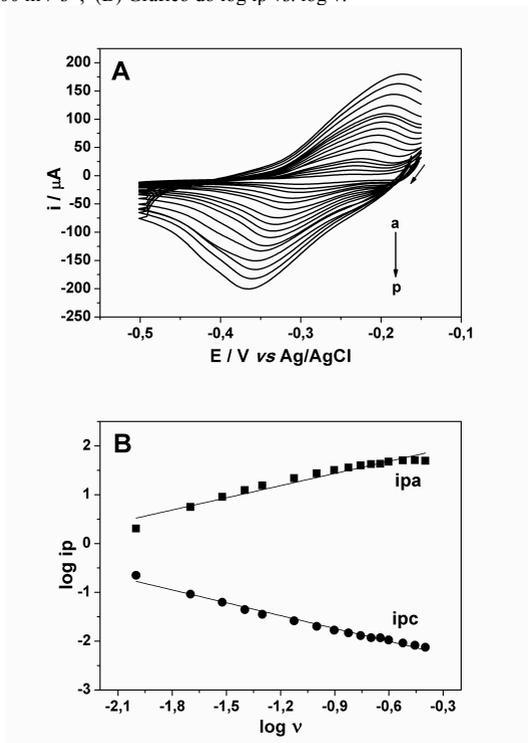
seguida de uma variação no sentido positivo até $-0,15$ V, em diferentes velocidades de variação (10 - 400 mV s^{-1}). Em todas as velocidades estudadas, ambos os picos referentes à redução/oxidação da vitamina B_2 são evidenciados. Há uma variação de potencial (E_{pc} e E_{po}) em cada medição, à medida que a velocidade cresce. Os dados voltamétricos registrados e ilustrados na Figura 13A, revelam uma sensibilidade baixa do BiFE para as velocidades de varredura entre 10 e 40 mV s^{-1} , ocorrendo uma modificação insignificante nos potenciais dos picos de redução e oxidação da vitamina B_2 . Com o aumento de v , acima de 40 mV s^{-1} , é possível notar um deslocamento do potencial de pico de redução (E_{pr}), para valores mais negativos e um deslocamento do potencial de pico de oxidação (E_{po}), para valores mais positivos.

Em relação às taxas de varredura maiores que 40 mV s^{-1} , é evidente que a separação entre os potenciais de pico aumentou, indicando que a superfície do BiFE não é capaz de promover a rápida transferência de elétrons (carga). Assim, nesse caso, não pôde ser observada uma reação eletroquímica reversível para os pares quinona/hidroquinona.

Além disso, um gráfico $\log i_p$ vs. $\log v$ foi plotado com os dados da variação da velocidade de varredura do potencial, para os sinais de corrente catódico (i_{pc}) e anódico (i_{pa}). A Figura 13B, exemplifica um comportamento linear, em ambas as curvas, de redução (Coeficiente angular $-0,87$) e oxidação (Coeficiente angular $0,83$), com uma inclinação com valor próximo de $1,0$. Este é um indicativo que ambas as reações foram principalmente controladas por fenômenos interfaciais (adsorção), em vez de serem controladas por difusão.

Assim, deduzimos que a vitamina B_2 é submetida a uma reação de transferência de carga quase-reversível controlada por adsorção na superfície do BiFE. Esse fenômeno foi observado em muitos outros eletrodos sólidos, utilizados para estudos eletroquímicos em flavinas (CHATTERJEE; FOORD, 2009), nos quais era difícil obter respostas reprodutíveis. Isso porque, como demonstrado, a vitamina B_2 é adsorvida na superfície do BiFE, envenenando o eletrodo de trabalho e, possivelmente, dificultando a interface eletrodo e analito, modificando as intensidades de corrente dos voltamogramas.

Figura 13 – (A) Voltamogramas cíclicos para vitamina B₂ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em BiFE imerso em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) v (a) 10 mV s⁻¹, (b) 20 mV s⁻¹, (c) 30 mV s⁻¹, (d) 40 mV s⁻¹, (e) 50 mV s⁻¹, (f) 75 mV s⁻¹, (g) 100 mV s⁻¹, (h) 125 mV s⁻¹, (i) 150 mV s⁻¹, (j) 175 mV s⁻¹, (k) 200 mV s⁻¹, (l) 225 mV s⁻¹, (m) 250 mV s⁻¹, (n) 300 mV s⁻¹, (o) 350 mV s⁻¹, e (p) 400 mV s⁻¹; (B) Gráfico do log ip vs. log v.

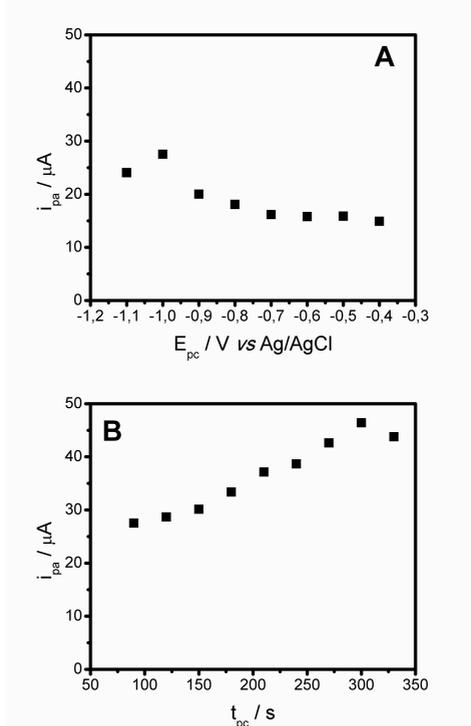


O problema principal parece estar relacionado com o tempo que o sensor foi imerso na solução contendo vitamina B₂, antes da voltametria cíclica ser iniciada. Para resolver esse problema, as experiências foram efetuadas com acúmulo da vitamina B₂ na superfície do BiFE, antes de executar os voltamogramas, com o objetivo de obter uma superfície que adsorva a vitamina B₂ de uma maneira uniforme.

A Figura 14 mostra a influência da variação dos parâmetros de pré-concentração, como E_{pc} e t_{pc}, na resposta da intensidade de corrente anódica (i_{pa}) da vitamina B₂. Os dados foram obtidos por voltametria cíclica, v = 100 mV s⁻¹, em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0), para uma solução de vitamina B₂ 100 μmol L⁻¹, em BiFE.

Na Figura 14A, observa-se a variação de E_{pc} na faixa de -0,4 a -1,2 V, onde foi mantido t_{pc} = 90 s. Nota-se um aumento de i_{pa} com E_{pc} para a vitamina B₂, na faixa de -0,7 a -1,1 V. Acima de -1,1 V visualiza-se um decréscimo da corrente anódica. Portanto, escolheu-se o potencial de pré-concentração de -1,0 V, pois, neste valor, o voltamograma apresentou boa concordância entre o perfil voltamétrico e o valor da corrente. Depois de fixado o potencial, variou-se o t_{pc} na faixa de 90 a 330 s. Os dados foram registrados na Figura 14B. Constatou-se que houve um aumento nos valores de i_{pa}, com o aumento do t_{pc}, indicando um acréscimo de vitamina B₂ na superfície do eletrodo. Optou-se por um tempo de 300 s. As condições otimizadas para a confecção do BiFE e sua atividade eletrocatalítica para a vitamina B₂ foram usados em experimentos complementares. Em vista disso, para prosseguir com os estudos, o E_{pc} e t_{pc} escolhidos foram -1,0 V e 300 s, respectivamente.

Figura 14 – Influência dos parâmetros de pré-concentração: (A) potencial de pré-concentração, $t_{pc} = 90$ s, (B) tempo de pré-concentração, $E_{pc} = -1,0$ V, na intensidade de corrente anódica da vitamina B₂ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) por voltametria cíclica ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$), utilizando o BiFE.



5.3 INFLUÊNCIA DO PH E SELEÇÃO DO ELETRÓLITO DE SUPORTE

Além da otimização dos parâmetros de pré-concentração, outro fator importante a ser estudado para propósitos quantitativos é a influência do pH na resposta da intensidade de corrente e do potencial de pico para o processo de oxidação da vitamina B₂.

O mecanismo de muitas reações orgânicas envolvem processos que são dependentes do pH do meio. Por esse motivo, foi investigada a influência do pH nos potenciais de pico dos processos de oxidação/redução da vitamina B₂, na superfície do BiFE, em diferentes faixas de pH (2,0-12,0). Para isso, utilizou-se tampão Brittonn-Robson (BR) 0,1 mol L⁻¹, que permite uma ampla variação de pH.

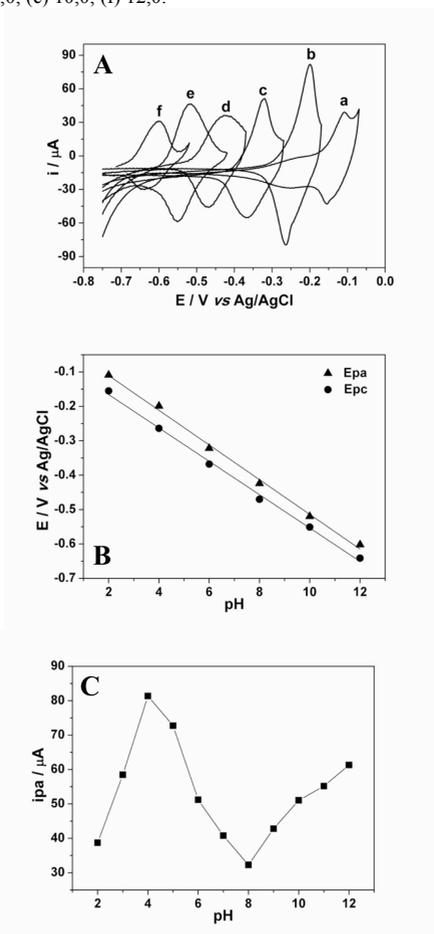
A Figura 15A mostra os voltamogramas cíclicos registrados da vitamina B₂ em função da variação do pH, com velocidade de variação de 100 mV s⁻¹. Fica evidente que os picos de redução e oxidação da vitamina B₂ sofrem um deslocamento para potenciais mais negativos com o aumento do pH de 2,0 a 12,0, comportamento esperado de acordo com a Equação de Nernst.

A Figura 15B exhibe a variação dos potenciais dos picos de redução e oxidação da vitamina B₂ em função do pH. O gráfico de E_p vs. pH resultou em uma curva linear fornecendo um coeficiente angular de -50,5 mV dec⁻¹ (R² = 0.996), para a reação de oxidação e -48,5 mV dec⁻¹ (R² = 0.997), para a reação de redução. Desse modo, o mecanismo de reação envolve o mesmo número de prótons e elétrons sendo associados com ambas as reações eletroquímicas.

No entanto, a separação entre os potenciais de pico de oxidação e redução é de -45 mV ($\Delta E_p = E_{po} - E_{pr}$), sendo maior que o valor esperado de 30 mV para uma reação com dois elétrons. A diferença entre o esperado e os valores encontrados pode ser explicada pela adsorção de vitamina B₂ na superfície do BiFE. Além disso, as experiências realizadas com o BiFE não permitiram a determinação do pKa para as formas protonadas e não protonadas da vitamina B₂. O valor de pKa para estas espécies é, normalmente, encontrado como sendo entre 6,0 e 10,0 (CHATTERJEE; FOORD, 2009; BRZEZINSKA; MIELCZAREK; PAJAK, 2008). Porém, há indícios que os resultados são fortemente dependentes da superfície do eletrodo.

Com base na Figura 15C, fica evidente que a intensidade de corrente varia com a alteração do potencial, resultado da variação de pH. Os picos mais elevados foram obtidos a pH 4,0, sendo o pH usado nos ensaios do eletrólito de suporte.

Figura 15 – Estudo do pH: (A) voltamogramas cíclicos; (B) potencial e; (C) intensidade de corrente em função do pH para o BiFE na presença de vitamina B₂ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} por voltametria cíclica, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 300 \text{ s}$, pH (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 6,0; (d) 8,0; (e) 10,0; (f) 12,0.

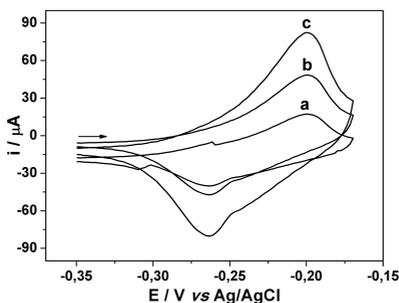


Após a escolha do pH adequado, variou-se a composição dos eletrólitos de suporte. A etapa de escolha do eletrólito de suporte é de extrema importância para o desenvolvimento do método eletroanalítico, pois a sua presença ocasiona efeitos nos processos termodinâmicos e cinéticos da transferência de carga e adsorção na superfície do eletrodo. Foram testados o tampão fosfato, o tampão Britton-Robson (B-R) e o tampão acetato, todas as soluções $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 4,0.

A Figura 16 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para esses diferentes eletrólitos na presença de vitamina B₂ $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Em todos os voltamogramas cíclicos, os sinais do processo de oxidação e redução foram observados quando realizada uma variação de $-0,40$ a $-0,15 \text{ V}$, voltando para $-0,40 \text{ V}$, na velocidade de 100 mV s^{-1} . Observa-se que os sinais dos processos de oxidação e redução da vitamina B₂ ocorrem, respectivamente, no potencial de $-0,21$ e $-0,26 \text{ V}$. Em tampão fosfato (voltamograma a), apresentam intensidades de corrente insatisfatórias para determinação eletroanalítica da vitamina B₂. O tampão acetato (voltamograma c) tem o mesmo comportamento do tampão B-R (voltamograma b), mas com a vantagem do sinal de intensidade de corrente ser mais intenso.

Como demonstrou um pico bem definido aliado a uma alta intensidade de corrente, o tampão acetato (pH 4,0) foi escolhido como o eletrólito de suporte para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica.

Figura 16 – Voltamogramas cíclicos para vitamina B₂ $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em BiFE imerso em soluções $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de (a) tampão fosfato (pH 4,0), (b) tampão B-R (pH 4,0), (c) tampão acetato (pH 4,0), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 300 \text{ s}$.



5.4 SELEÇÃO DA TÉCNICA VOLTAMÉTRICA E OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS

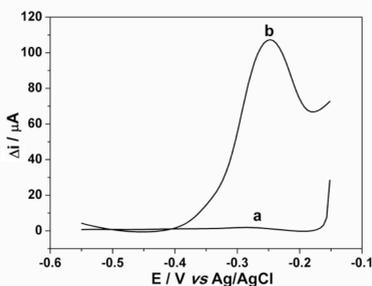
A voltametria cíclica é uma técnica utilizada para o estudo eletroquímico do analito. Os experimentos realizados com voltametria cíclica demonstraram que a vitamina B₂ é adsorvida na superfície plana do BiFE, dificultando a obtenção de dados reprodutíveis. Para as determinações eletroanalíticas as técnicas de pulso são as mais indicadas, pois quando o pulso é gerado, a corrente faradaica pode ser coletada somente quando a contribuição da corrente capacitiva tenha se minimizado, aumentando a sensibilidade da técnica.

A etapa de pré-concentração ajuda a distribuir a vitamina B₂ homogeneamente sobre toda a superfície do BiFE. Ao aplicar um potencial de -1,0 V por 300 s, a vitamina B₂ fica na forma reduzida. Há um tempo de condicionamento, período de 15 s, para a harmonização da solução e, em seguida, faz-se a medida por técnicas de pulso, partindo de -1,0 a -0,1 V, obtendo-se o pico de oxidação da vitamina B₂ (forma oxidada).

A redissolução da vitamina B₂ tem excelente reprodutibilidade. O mesmo procedimento é realizado sem a presença da vitamina B₂, considerado como branco ou linha de base. A diferença entre o valor da corrente de linha de base e o valor da corrente no pico de oxidação no mesmo potencial, será considerada a corrente obtida, no caso a corrente resultante (Δi).

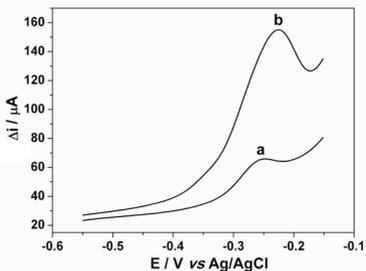
O potenciostato utilizado disponibiliza duas técnicas de pulso, a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada. A oxidação da vitamina B₂ foi investigada eletroanaliticamente por ambas as técnicas, para que a mais sensível fosse selecionada. A Figura 17 mostra os voltamogramas de (a) pulso diferencial e de (b) onda quadrada para a vitamina B₂ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em BiFE, em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0). A voltametria de onda quadrada indicou o melhor perfil voltamétrico e, por este motivo, foi a escolhida.

Figura 17 – Voltamogramas de (a) pulso diferencial (b) onda quadrada para a vitamina B₂ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em BiFE em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0\text{ V}$, $t_{pc} = 300\text{ s}$.



Para fins de visualização do efeito de pré-concentração, a Figura 18 mostra a comparação entre o sinal da oxidação da vitamina B₂ 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) no BiFE, (a) sem pré-concentração e (b) com pré-concentração, utilizando voltametria de onda quadrada ($f = 30\text{ Hz}$, $a = 70\text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5\text{ mV}$). Pode-se notar um aumento significativo no valor da corrente resultante (Δi) e uma melhor definição do pico quando comparada à resposta da vitamina B₂ na ausência de pré-concentração. O aumento é cerca de quatro vezes maior.

Figura 18 – Voltamogramas de onda quadrada para vitamina B₂ 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$: (a) sem pré-concentração e (b) com pré-concentração $E_{pc} = -1,0\text{ V}$, $t_{pc} = 300\text{ s}$ em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0), $f = 30\text{ Hz}$, $a = 70\text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5\text{ mV}$, utilizando o BiFE.



A otimização do método analítico envolve um estudo sistemático dos parâmetros experimentais que afetam a resposta da voltametria de onda quadrada (SWV), a saber, a frequência de aplicação dos pulsos (f), a amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (a) e o incremento de potencial (ΔE_s).

A frequência de aplicação dos pulsos de potencial é uma das mais importantes variáveis na SWV. Isso ocorre porque, mantendo-se constante a concentração dos analitos, é a frequência que determina a intensidade dos sinais e, conseqüentemente, a sensibilidade obtida nas análises. Um aumento na amplitude, também pode provocar aumento da corrente de pico e um sinal com um perfil voltamétrico mais definido e uma diminuição na extensão da base.

A velocidade de variação, na SWV, é definida em função da frequência de aplicação dos pulsos de potencial e do incremento de variação de potencial, pois ela é obtida pelo produto desses parâmetros. A otimização do incremento pode alterar significativamente a sensibilidade obtida nas análises.

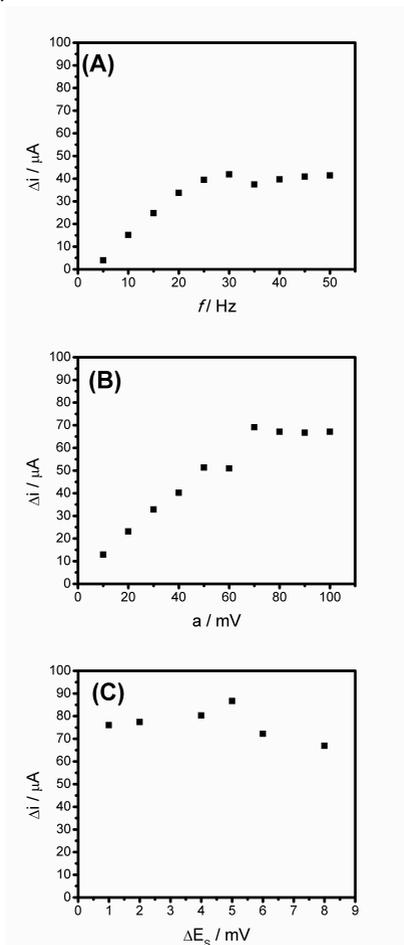
A otimização dos parâmetros de voltametria de onda quadrada (SWV) foi feita em uma solução de vitamina B₂ 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) como eletrólito de suporte, para os parâmetros da frequência (f), da amplitude (a) e do incremento de potencial (ΔE_s), como mostra a Figura 19, analisada para um BiFE imerso em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0), contendo vitamina B₂ 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 19A mostra a dependência da Δi com a frequência ($a = 70$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV). A Figura 19B mostra a dependência da Δi com amplitude de pulso ($f = 30$ Hz e $\Delta E_s = 5$ mV). A Figura 19C mostra a dependência da Δi com o incremento de potencial ($f = 30$ Hz e $a = 70$ mV).

A Tabela 2 exhibe os dados referentes à otimização dos parâmetros da SWV, a faixa estudada e o valor selecionado. Eles foram relacionados considerando a maior sensibilidade e o melhor perfil voltamétrico.

Tabela 2 – Otimização dos parâmetros experimentais por SWV para análise de vitamina B₂.

| Parâmetro | Faixa | Valor selecionado |
|-------------------------|--------------|--------------------------|
| frequência | 5 - 50 Hz | 30 Hz |
| amplitude de pulso | 10 - 100 mV | 70 mV |
| incremento de potencial | 1 - 8 mV | 5 mV |

Figura 19 – Dependência da Δi com (A) frequência ($a = 70$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV), (B) amplitude de pulso ($f = 30$ Hz e $\Delta E_s = 5$ mV) e (C) incremento de potencial ($f = 30$ Hz e $a = 70$ mV) para um BiFE imerso em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) contendo vitamina B_2 $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Dados obtidos por voltametria de onda quadrada.



Em seguida, para a implantação da metodologia eletroanalítica e a determinação da vitamina B₂ em produtos farmacêuticos comerciais, foi aplicada a voltametria de redissolução adsorptiva por onda quadrada (SWAdSV).

5.5 METODOLOGIA ELETROANALÍTICA USANDO BIFE-SWADSV

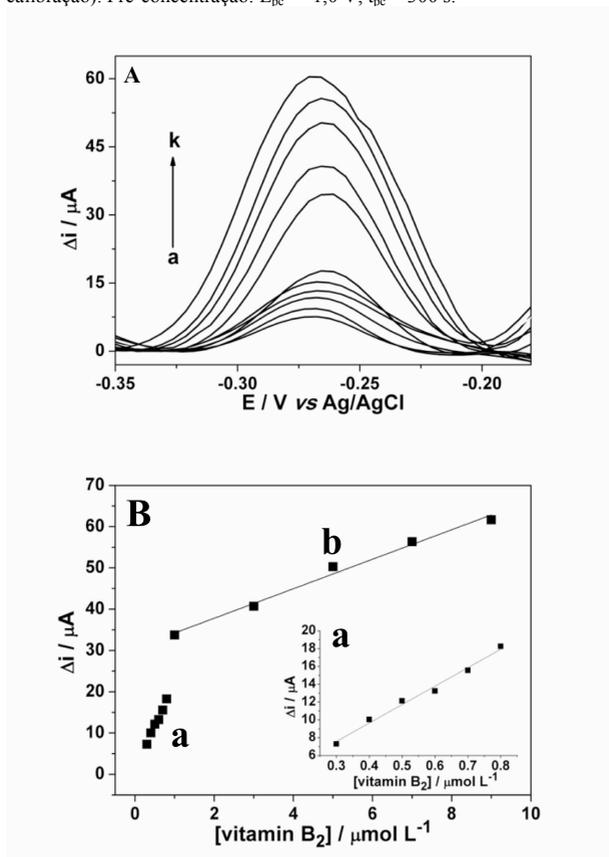
Segundo Harris (2011), a validação determina a adequação de uma análise no sentido de fornecer a informação desejada. Com o intuito de verificar se os métodos desenvolvidos estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam e se os resultados obtidos são confiáveis, a ferramenta ideal e essencial é a validação. O objetivo final da validação de um método analítico é assegurar que cada medição, em análises de rotina, será próxima o suficiente do valor verdadeiro, que é o real conteúdo do analito na amostra.

Para construir a curva de calibração utilizando o procedimento BiFE-SWAdSV, diferentes alíquotas da solução padrão de vitamina B₂ foram adicionados ao eletrólito de suporte, o tampão de acetato (pH 4,0).

Usando as melhores condições de trabalho, a curva de calibração para a Vitamina B₂ foi obtida. A Figura 20A mostra os voltamogramas de onda quadrada para a Vitamina B₂ após sucessivas adições da solução padrão. Os dados demonstram que, com o aumento da concentração de vitamina B₂, a intensidade de corrente aumenta para o mesmo potencial. Um pico de oxidação bem definido é observado no potencial de -0,26 V, não variando o potencial com o acréscimo de vitamina B₂.

A relação matemática entre o sinal medido no equipamento e a concentração da espécie de interesse é chamada de curva de calibração. Essa relação demonstra uma faixa de concentrações do analito, cuja sensibilidade pode ser considerada constante, na qual o método pode ser aplicado, chamada de curva de calibração (HARVEY, 2000). A linearidade pode ser verificada pelo quadrado do coeficiente de correlação angular, R², resultante da regressão para, no mínimo, cinco concentrações diferentes, sendo o valor mínimo aceitável de R² = 0,99 (RIBANI et al., 2004).

Figura 20 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para a vitamina B2 em solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹(pH 4,0) em BiFE: (a) 0,3 μmol L⁻¹, (b) 0,4 μmol L⁻¹, (c) 0,5 μmol L⁻¹, (d) 0,6 μmol L⁻¹, (e) 0,7 μmol L⁻¹, (f) 0,8 μmol L⁻¹, (g) 1,0 μmol L⁻¹, (h) 3,0 μmol L⁻¹, (i) 5,0 μmol L⁻¹, (j) 7,0 μmol L⁻¹, (k) 9,0 μmol L⁻¹, ($f = 30$ Hz, $a = 70$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV).; (B) Dependência de Δi em função da concentração da vitamina B₂ (curva de calibração). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 300$ s.



Dois faixas lineares são observadas com sensibilidade diferentes. A Figura 20B mostra em (a) uma região linear entre as concentrações 0,3 a 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com inclinação de 20,70 $\mu\text{A L mol}^{-1}$ e coeficiente de correlação linear de 0,9925 e; em (b) mostra outra região linear entre as concentrações 1,0 a 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com inclinação de 3,6 $\mu\text{A L mol}^{-1}$ e coeficiente de correlação linear de 0,9928. A Figura 20B mostra as curvas de calibração com boa linearidade. Esse comportamento pode ser explicado da seguinte forma: em baixas concentrações de vitamina B₂, a área do eletrodo para acesso do analito é considerada alta, resultando numa boa sensibilidade. Em concentrações mais elevadas, o fenômeno da adsorção aumenta, diminuindo o acesso para novas moléculas na superfície do eletrodo, diminuindo, assim, a sensibilidade.

As curvas de calibração para as duas faixas podem ser expressas de acordo com as equações 10 e 11.

$$\Delta i/\mu\text{A} = 1,4 + 20,7 [\text{vitamina B}_2]/\mu\text{mol L}^{-1} \quad (10)$$

$$\Delta i/\mu\text{A} = 30,7 + 3,6 [\text{vitamina B}_2]/\mu\text{mol L}^{-1} \quad (11)$$

Segundo Leite (2008), a menor quantidade de um analito, detectado pelo sistema analítico, numa solução ideal, isenta de interferentes e na melhor condição de análise, é o limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*), enquanto que o limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) exige uma determinada confiabilidade. O cálculo do LOD e LOQ são obtidos com dados da curva de calibração e calculados pelas equações 12 e 13, nesses quais o SD é o desvio padrão (do inglês *standard deviation*) do coeficiente linear da equação e “x” é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva de calibração.

$$\text{LOD} = 3,3 \frac{\text{SD}}{x} \quad (12)$$

$$\text{LOQ} = 10 \frac{\text{SD}}{x} \quad (13)$$

Os valores encontrados para LOD e LOQ foram 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os parâmetros analíticos encontrados a partir da curva de calibração para a determinação de vitamina B₂ estão indicados na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros obtidos da curva de calibração para a determinação de vitamina B₂.

| Parâmetro ^a | Valor |
|---|------------------------|
| Potencial de pico (V) | - 0,26 |
| Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 0,30 a 0,8 e 1,0 a 9,0 |
| R ² | 0,9925 e 0,9928 |
| Coefficiente angular ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$) | 20,7 e 3,6 |
| SD do coeficiente angular ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$) | 1,1 e 0,2 |
| Coefficiente linear (μA) | 1,4 e 30,7 |
| SD do coeficiente linear (μA) | 0,6 e 1,2 |
| Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 0,1 e 1,1 |
| Limite de quantificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 0,3 e 3,3 |

n = 5.

Para estudar a repetibilidade dos sinais produzidos aplicando BiFE-SWAdSV, foram preparadas cinco soluções de vitamina B₂ 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, no mesmo dia (intradia) e em cinco dias diferentes (interdia). Os valores do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) calculados, correspondentes à SWAdSV-BiFE compreenderam valores menores que 4,0%, 3,6% e 3,2%. Os resultados verificados indicam a sensibilidade e a repetibilidade do BiFE-SWAdSV para análise da vitamina B₂. Os dados do estudo intradia e interdia do método proposto estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados do estudo da repetibilidade do método proposto.

| Parâmetro | RSD (%) |
|---|---------|
| Repetibilidade da i_{pa} (intradia) (%) ^{a, b} | 3,6 |
| Repetibilidade da i_{pa} (interdia) (%) ^{a, b} | 3,2 |
| Repetibilidade do E_{pa} (intradia) (%) ^{a, b} | 0,2 |
| Repetibilidade do E_{pa} (intradia) (%) ^{a, b} | 0,5 |

^a Desvio padrão relativo (%) ^b *n* = 5.

5.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B₂ EM FÁRMACOS

Para viabilizar o procedimento proposto, o primeiro passo é determinar a vitamina B₂ em um produto comercial. Foram escolhidas três amostras de fármacos: uma solução oral (amostra A), um xarope (amostra B) e comprimidos (amostra C), para determinação de vitamina B₂ por adição de padrão. As três amostras de vitamina B₂, foram preparadas conforme a subseção 4.3.1.3 e analisadas pelo método proposto.

O objetivo é avaliar a performance da metodologia desenvolvida usando BiFE-SWAdSV. Salientamos, desse modo, que o objetivo não é verificar se o produto comercial está adequado conforme informações no rótulo.

A seletividade fornecida pelo eletrodo proposto, BiFE, foi avaliada com o intuito de investigar possíveis interferentes na determinação da vitamina B₂. As matrizes farmacológicas são complexas e, geralmente, compostas por uma gama considerável de substâncias.

O sucesso do método da curva de calibração é muito dependente da exatidão com que são conhecidas as concentrações dos padrões e de quão próxima a matriz dos padrões está da matriz das amostras a serem analisadas. Infelizmente, é muito difícil ou até impossível estabelecer essa similaridade de matriz entre amostras complexas e padrões, além disso, os efeitos da matriz levam a erros causados por interferência. No entanto, adições de quantidades conhecidas do analito na amostra (*spiking*) eliminam ou minimizam interferências introduzidas pela matriz de amostras complexas, por que a matriz permanece quase inalterada após cada adição, sendo que, a única diferença é a concentração do analito. Como não foi possível criar uma amostra sintética similar aos medicamentos, nem extrair possíveis interferentes da matriz, foi utilizado o método de adição de padrão.

Uma concentração aproximada de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi usada para preparar as amostras. Uma alíquota de 1 mL das amostras A e B foram diluídas para 100 mL do eletrólito de suporte. Uma alíquota desta solução era adicionada diretamente na célula eletroquímica contendo 100 mL de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) para a determinação. A amostra C, por ser comercializada na forma de comprimidos, foi macerada e solubilizada no eletrólito de suporte. Uma alíquota dessa solução foi adicionada ao eletrólito de suporte para sua determinação. As adições eram realizadas no intuito de que as concentrações

encontradas aparecessem na primeira faixa de calibração da curva mais sensível, entre 0,3 e 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

As Figuras 21A e 21B referem-se a dados coletados das determinações de vitamina B₂ na amostra farmacêutica A, pelo método de adição de padrão interno. Na Figura 21A são ilustrados os voltamogramas de redissolução adsortiva no modo onda quadrada coletados e, na Figura 21B, pode ser visualizada a curva de adição de padrão, em conjunto com a curva de calibração.

É possível observar claramente na Figura 21B, que a curva de adição de padrão é praticamente paralela à curva de calibração, indicando uma adequação entre os procedimentos.

Os coeficientes angulares encontrados foram 22,1, 21,7 e 23,3 $\mu\text{A L mol}^{-1}$, respectivamente, para as amostras A, B e C. Os coeficientes são da mesma ordem de grandeza da inclinação da curva de calibração (20,7 $\mu\text{A L mol}^{-1}$, Tabela 3). Esses resultados indicam que as substâncias presentes nas matrizes não interferiram na determinação da vitamina B₂ usando BiFE-SWAdSV.

Na Tabela 5, constam os dados coletados referentes ao coeficiente angular e ao coeficiente de correlação obtidos pelo método de adição de padrão. Os valores do coeficiente angular das curvas de adição de padrão são semelhantes ao da curva de calibração (20,7 $\mu\text{A L mol}^{-1}$, Tabela 3), indicando, assim, uma excelente seletividade do método proposto.

Figura 21 – (A) Voltamogramas de redissolução adsorptiva de onda quadrada para o eletrodo de BiFE (a) tampão acetate pH4 e adições de (b) 100 μL de amostra A e adições de 10 μL (c – f) até 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de solução padrão de vitamina B₂. (B) Gráfico das adições de padrão na amostra A. $E_{pc} = -1,0\text{V}$, $t_{pc} = 300\text{s}$; $\Delta E_s = 5\text{mV}$, $a = 70\text{mV}$ e $f = 30\text{Hz}$.

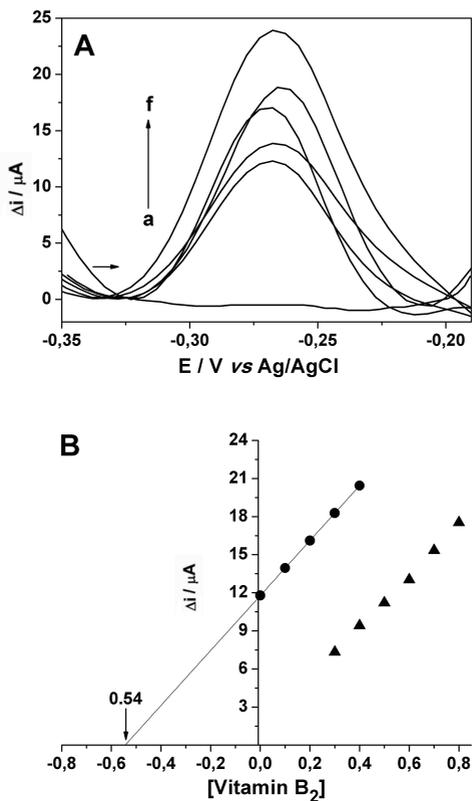


Tabela 5 – Dados do estudo da adição de padrão.

| Amostra | Coefficiente angular | Coefficiente de correlação |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| A | 22,1 | 0,992 |
| B | 21,7 | 0,991 |
| C | 23,3 | 0,987 |

A Tabela 6 mostra os resultados alcançados para a quantificação de vitamina B₂ nas amostras farmacêuticas, realizadas em triplicata no mesmo dia (intradia) e em dias diferentes (interdia).

Tabela 6 – Resultados obtidos para a quantificação de vitamina B₂ nas amostras pelo método proposto.

| Amostra | Valor encontrado (mg) | Média (mg) | RSD (%) |
|----------------|------------------------------|-------------------|----------------|
| A (intradia) | 2,03 | 2,05 | 2,06 |
| | 2,07 | | |
| | 2,04 | | |
| A (interdia) | 2,07 | 2,04 | 2,52 |
| | 2,02 | | |
| | 2,05 | | |
| B (intradia) | 1,05 | 1,03 | 3,13 |
| | 1,04 | | |
| | 0,99 | | |
| B (interdia) | 1,07 | 1,05 | 2,08 |
| | 1,02 | | |
| | 1,05 | | |
| C (intradia) | 2,06 | 2,06 | 0,48 |
| | 2,07 | | |
| | 2,05 | | |
| C (interdia) | 2,03 | 2,02 | 0,01 |
| | 2,01 | | |
| | 2,03 | | |

Testes de recuperação também foram realizados para determinar a precisão do procedimento. Uma quantidade conhecida de vitamina B₂ foi adicionada à cada amostra (A, B e C) em triplicata, para testar se a resposta da amostra corresponde ao esperado a partir da curva de calibração. Os resultados foram obtidos através do cálculo utilizando a Equação 14.

Para evitar mudança significativa no volume de amostra, durante os ensaios de recuperação, foram adicionados pequenos volumes de um padrão concentrado de vitamina B₂. A Equação (14) foi utilizada para a análise da recuperação da vitamina B₂ nas amostras.

$$\%_{rec} = \frac{C_{ss} - C_{ssn}}{C_{add}} \times 100 \quad (14)$$

Na qual:

$\%_{rec}$ é a porcentagem de recuperação do analito;

C_{add} é a concentração do analito adicionada à amostra ($\mu\text{mol L}^{-1}$);

C_{ss} é a concentração da amostra fortificada ($\mu\text{mol L}^{-1}$) e;

C_{ssn} é a concentração da amostra não fortificada ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

As concentrações dos dois intervalos da curva de calibração foram utilizadas nesses ensaios. As amostras sem adição de padrão foram preparadas com as concentrações de $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ (para faixa menor da curva de calibração) e de $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (para faixa maior da curva de calibração). Foram obtidos resultados semelhantes para as duas faixas de concentração. As recuperações dentro de 100-107% foram encontradas para a amostra A, 96-99% para a amostra B e 102-105% para a amostra C, nas concentrações mais elevadas. Esses resultados confirmam a precisão dos dados obtidos com o sensor proposto para a determinação da vitamina B₂.

A Tabela 7 mostra o estudo da recuperação pelo método da adição de padrão das amostras. Os dados de recuperação evidenciam que as adições do padrão de vitamina B₂ nas amostras A, B e C estão na faixa de 97-107%.

Tabela 7 – Estudo da recuperação pelo método da adição de padrão das amostras.

| Amostra | Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | ^a Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Recuperado (%) | Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | ^b Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Recuperado (%) |
|---------|---------------------------------------|--|----------------|---------------------------------------|--|----------------|
| A | 0,30 | 0,62 | 106 | 1,00 | 4,07 | 107 |
| | 0,40 | 0,72 | 105 | 2,00 | 5,02 | 101 |
| | 0,50 | 0,81 | 102 | 3,00 | 6,04 | 102 |
| | 0,60 | 0,98 | 100 | 4,00 | 7,01 | 100 |
| B | 0,30 | 0,59 | 96,7 | 1,00 | 3,97 | 97 |
| | 0,40 | 0,69 | 97,5 | 2,00 | 4,98 | 99 |
| | 0,50 | 0,78 | 96,0 | 3,00 | 5,95 | 98 |
| | 0,60 | 0,88 | 96,7 | 4,00 | 6,94 | 99 |
| C | 0,30 | 0,61 | 103 | 1,00 | 4,04 | 104 |
| | 0,40 | 0,72 | 105 | 2,00 | 5,06 | 103 |
| | 0,50 | 0,81 | 102 | 3,00 | 6,14 | 105 |
| | 0,60 | 0,92 | 103 | 4,00 | 7,09 | 103 |

^aAmostra inicial = 0,30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ^bAmostra inicial = 3,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$

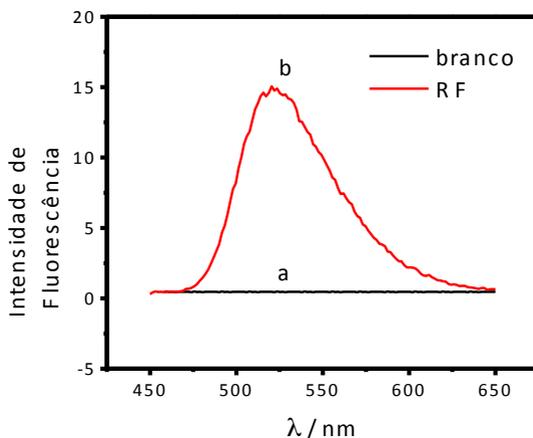
5.7 DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B₂ NAS AMOSTRAS ATRAVÉS DO MÉTODO COMPARATIVO E TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Outra forma de verificar a exatidão do método desenvolvido é a comparação dos resultados obtidos com os resultados de um segundo método conhecido. Assim, para testar a viabilidade de utilização da metodologia eletroanalítica, empregou-se como método comparativo a fluorimetria.

Os espectros de fluorescência para uma solução de Vitamina B₂ 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em etanol e para o tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) (branco) são exibidos na Figura 24. As soluções foram excitadas em 440 nm e os espectros de emissão foram corridos de 450,0 a 650,0 nm, com emissão máxima em 523 nm para a vitamina B₂.

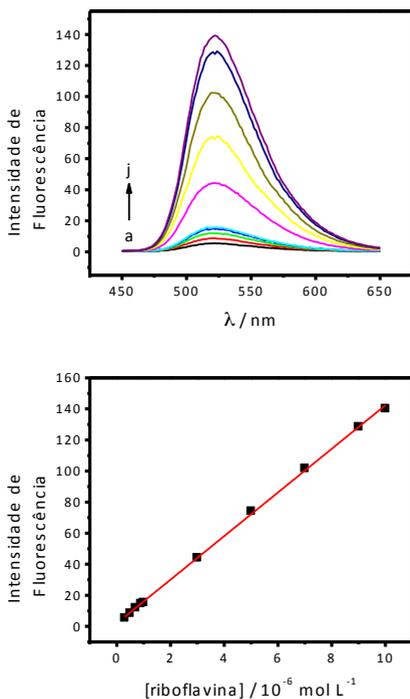
A Figura 22 apresenta os espectros de fluorescência com a respectiva curva de calibração para o padrão de Vitamina B₂ na faixa de concentração de 0,3 a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A curva de calibração apresentou linearidade em toda faixa de concentração estudada, com $R^2 = 0,9994$.

Figura 22 – Espectro de fluorescência para: (a) tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) e (b) uma solução de vitamina B₂ 1,0 μmol L⁻¹ em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0).



A curva analítica obtida para a intensidade de fluorescência da Vitamina B₂ apresentou uma relação linear entre intensidade de fluorescência e as concentrações de vitamina B₂ de 0,3 a 10,0 μmol L⁻¹. A curva foi construída usando uma série de 10 medidas em triplica, em 523 nm. A equação para a reta é $Y = 1,9733 + 1,404 \times 10^7 X$, na qual X é a concentração de vitamina B₂ em mol L⁻¹ e Y é a intensidade de fluorescência. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9994. Os dados encontrados para a linearidade, pelo método dos mínimos quadrados, demonstraram um bom coeficiente de correlação. Esses resultados podem ser observados na Figura 23.

Figura 23 – Espectros de fluorescência (a) $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (h) $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (i) $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (j) $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e curva de calibração da emissão (523 nm) em função da concentração da vitamina B₂ para os dados já mencionados.



A Tabela 8 mostra os resultados obtidos para a quantificação de vitamina B₂ nas amostras A, B e C, em triplicata, usando o método comparativo.

Os dados apresentaram um RSD menor que 6% para todas as amostras, indicando boa precisão para o método, tornando possível, desse modo, a sua utilização para comparação dos dados.

Tabela 8 – Resultados obtidos para a quantificação de vitamina B₂ em amostras diversas usando o método comparativo.

| Amostra | Valor encontrado (mg) | Média (mg) | RSD (%) |
|---------|-----------------------|------------|---------|
| A | 1,980 | 1,954 | 1,14 |
| | 1,940 | | |
| | 1,943 | | |
| B | 1,02 | 1,057 | 5,66 |
| | 1,06 | | |
| | 1,09 | | |
| C | 1,982 | 1,974 | 0,15 |
| | 1,988 | | |
| | 1,984 | | |

O Erro Relativo é o erro de uma medida dividido pelo valor verdadeiro (ou aceito). Foi calculado o erro relativo entre o método proposto ou comparativo e os valores rotulados pelo fabricante (E_{r1}) e os valores de erro relativo encontrados entre o método desenvolvido e o método comparativo (E_{r2}).

Considerando o valor rotulado da vitamina B₂ nos produtos farmacêuticos, um tratamento estatístico foi realizado no intuito de verificar a validade dos dados obtidos por meio do método proposto com os dados do método comparativo.

Foi realizada a quantificação de vitamina B₂ aplicando a metodologia eletroanalítica proposta, usando o procedimento BiFE-SWAdSV e também utilizando o método comparativo com a técnica de fluorescência. Cálculos estatísticos foram empregados a fim de avaliar o método proposto quanto à precisão, à exatidão e à confiabilidade dos resultados encontrados na determinação. Ambas as técnicas forneceram dados confiáveis para os parâmetros analíticos, conforme apresentado na Tabela 9.

Os valores do Desvio Padrão Relativo (RSD) na quantificação da vitamina B₂, para a média de três medições, foram calculados entre 0,48% e 3,13% usando o sensor proposto e, entre 0,15 e 0,94%, utilizando a técnica de fluorescência, o que demonstra a boa exatidão desses métodos.

Tabela 9 – Tratamento estatístico da determinação de vitamina B₂ em fármacos.

| Amostra | A | | B | | C | |
|-------------------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| | BiFE-SWAdSV | Fluorimetria | BiFE-SWAdSV | Fluorimetria | BiFE-SWAdSV | Fluorimetria |
| Valores rotulados (mg) | 2,00 | 2,00 | 1,00 | 1,00 | 2,00 | 2,00 |
| Encontrado (mg) ^a | 2,05 | 1,939 | 1,03 | 1,06 | 2,06 | 1,97 |
| RSD (%) | 1,02 | 0,28 | 3,13 | 0,94 | 0,48 | 0,15 |
| Er ₁ (%) ^b | 2,05 | -3,05 | 3,0 | 5,7 | 3,00 | -1,5 |
| Er ₂ (%) ^c | 5,72 | ---- | -2,83 | --- | 4,56 | --- |
| t _{calculado} ^d | 4,16 | 3,57 | 1,61 | 2,79 | 3,88 | 10,39 |
| F _{calculado} ^e | 1,14 | 1,14 | 1,19 | 1,19 | 5,81 | 5,81 |

^a n = 3

^b Er₁ = Erro relativo entre o método proposto ou comparativo e os valores rotulados.

^c Er₂ = Erro relativo entre o método proposto e o método comparativo.

^d t_{crítico} = 4,30

^e F_{crítico} = 19

A precisão fornecida pelo sensor proposto, como revelado pelos ensaios de recuperação, foi corroborada por dados obtidos usando a técnica de fluorescência, com baixos valores para os Erros Relativos Er₁ e Er₂. Para avaliar a confiabilidade dos resultados encontrados, uma comparação entre os dados obtidos com o procedimento de BiFE-SWAdSV e a técnica de fluorescência foi realizada por meio de ensaios com testes t e F. No nível de confiança de 95%, os valores calculados para t e F foram inferiores aos respectivos valores críticos, demonstrando que os dados obtidos pelas duas técnicas são estatisticamente idênticas.

O teste F foi utilizado para comparar as variâncias dos dados dos métodos propostos e o método comparativo. O teste estatístico F, que é definido como a razão entre as duas variâncias das amostras, é calculado e comparado com o valor crítico de F em um determinado nível de confiança. Para um nível de 95% de confiança, com dois graus de liberdade, os valores de F, encontrados para os medicamentos, foram muito menores que 19. Com isso, a hipótese nula foi aceita, indicando, assim, não haver diferença significativa na precisão fornecida pelos dois métodos empregados na determinação de vitamina B₂ em produtos farmacêuticos. Nesse caso, o valor fornecido pelo fabricante foi aceito como valor verdadeiro. Para as amostras A, B e C o $t_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $t_{\text{teórico}}$, indicando que não há diferença significativa entre os dois métodos.

Com base nos resultados é possível quantificar a vitamina B₂ em amostras farmacêuticas por meio da metodologia eletroanalítica empregando BiFE-SWAdSV. O método proposto tem exatidão e precisão comparáveis ao valor rotulado de cada fármaco e aos valores obtidos pelo método comparativo.

5.8 COMPARAÇÃO COM OUTROS ELETRODOS

A faixa linear e o limite de detecção fornecidos pelo método BiFE-SWAdSV estão compatíveis e em concordância com resultados obtidos com outros eletrodos e as técnicas utilizadas para a determinação de vitamina B₂. Os dados da Tabela 10 são organizados de acordo com o aumento dos valores para o limite de detecção. Muitos eletrodos modificados e não modificados e diferentes técnicas eletroquímicas em variadas condições experimentais foram utilizados para a obtenção desses dados. Por conseguinte, é difícil comparar o desempenho dos eletrodos.

Do mesmo modo, é possível observar que o BiFE-SWAdSV forneceu dados comparáveis aos obtidos com outros eletrodos. Além disso, o intervalo linear e o limite de detecção conseguido neste trabalho para a determinação da vitamina B₂ são comparáveis à faixa linear (100 a 1000 nmol L⁻¹) e o limite de detecção (33,1 nmol L⁻¹) obtidos utilizando a mesma abordagem para a determinação da vitamina B₁₂ (KFREFT, 2012).

Tabela 10 – Faixa Linear e Limite de detecção (LOD) para a vitamina B₂.

| Faixa Linear (nmol L ⁻¹) | LOD (nmol L ⁻¹) | Referência |
|---|--------------------------------|--|
| 0,8-110,0 e 110,0-1000,0 | 0,100 | SAFAVI et al. (2010) |
| 7,97-2338,2 | 0,201 | ENSAFI; HERDARI-BAFROOEI; AMINI (2012) |
| 1,33-26,6 | 0,266 | QI; CAO; HOU (2011) |
| 1,33-185992 | 0,531 | KOTKAR; DESAI; SRIVASTAVA (2007) |
| 9,0-55900 | 0,820 | BANDŽUCHOVÁ et al. (2012) |
| 9,0-55900 | 1,00 | KUMAR; MANOJ; SANTHANALAKSHMI (2014) |
| 9,0-55900 | 1,39 | BANDŽUCHOVÁ et al. (2012) |
| 9,0-55900 | 4,20 | WU, et al., 2008 |
| 9,0-55900 | 12,0 | NIE et al. (2014) |
| 26,6-46498 | 13,3 | ZHU; LUO (2008) |
| 10000-90000 | 45,4 | REVIN; JOHN (2012) |
| 100 -200000 | 50,0 | ZHANG et al. (2010) |
| 300-800 e 1000-9000 | 100 | Trabalho proposto |
| 500-2500 | 300 | ZHANG et al. (2006) |
| 2000-80000 | 500 | LI, et al. (2012) |
| 10000-200000 | 500 | LIU et al. (2009) |
| 1329-185992 | 903 | ENSAFI; HERDARI-BAFROOEI; AMINI (2012) |
| 5000-43000 | 1000 | DOS SANTOS et al. (2013) |
| 3000-20000 | 1000 | SHEN; XI; MING (2011) |
| 2400-100000 e 100000-500000 | 1400 | LIU; GAO (2012) |

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho descreve a aplicação do eletrodo de filme de bismuto, preparado sobre um substrato de cobre, modo *ex situ*, para a determinação de vitamina B₂ em formulações farmacêuticas.

O BiFE, novamente, mostrou ser um bom sensor para a identificação de substâncias eletroativas em fármacos. Ele foi efetivamente aplicado em estudos na determinação eletroanalítica de vitamina B₂. Como demonstrado, a vitamina B₂ foi submetida a uma reação quase-reversível com a transferência de um próton e um elétron, sendo dependente da variação do pH. A etapa determinante da velocidade foi controlada por adsorção.

Uma etapa de acumulação foi aplicada ao sistema fazendo com que a vitamina B₂ ficasse na forma reduzida e, em seguida, foi aplicada uma varredura no sentido de potenciais mais positivos que o potencial de acumulação, promovendo a redissolução da vitamina B₂, retornando à forma oxidada, quando um único sinal anódico, por voltametria de onda quadrada, em um potencial anódico de -0,26 V, tendo como eletrólito de suporte um tampão acetato (pH 4,0).

A corrente de oxidação (i_{pa}) medida aumentou linearmente com o acréscimo de concentração de vitamina B₂, nos intervalos de 0,3 a 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,0 a 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Vários parâmetros analíticos podem ser obtidos a partir da curva de calibração. O limite de detecção conseguido foi de 100 nmol L^{-1} .

O método foi aplicado com eficiência na determinação de vitamina B₂ para os fármacos comerciais da EMS que possuem vitaminas do Complexo B, na forma de solução oral, de xarope e de comprimidos. A precisão fornecida foi verificada por meio de experimentos de recuperação, com valores aceitáveis entre 97,0 a 107,0%. Eles foram comparados com os resultados obtidos pela técnica de fluorescência, indicando que não há diferença significativa entre os dois métodos.

Por último, verificou-se que os dados fornecidos pelo BiFE-SWAdSV sobre a determinação de vitamina B₂ foram semelhantes às determinadas por outros eletrodos e sensores na literatura.

A escassez de trabalhos que utilizam o eletrodo de filme de bismuto sobre cobre para a determinação de compostos orgânicos, gera uma enorme perspectiva para novas linhas de investigação.

Como perspectivas futuras desse trabalho podem ser realizados estudos detalhando o mecanismo de oxidação da vitamina B₂.

Na literatura, aparecem novas metodologias de confecção do BiFE, que possuem uma superfície mais regular. O bismuto com forma geométrica de hexágono foi eletrodepositado sobre eletrodos policristalinos de cobre a partir de um banho de nitrato de bismuto. Geometrias hexagonais de tamanhos diferentes são obtidas por meio do ajuste da taxa de deposição.

Os nanohexagonos de bismuto demonstraram boa sensibilidade para a detecção simultânea de Pb(II), Zn(II) e Cd(II) usando SWASV, com LODs em ppb, indicando o potencial para esta morfologia como um material electrocatalítico (RAJAMANI et al., 2014).

Utilizar esse modelo novo de nanofilme de bismuto podem gerar resultados mais sensíveis para a determinação de compostos orgânicos.

Também há a possibilidade de investigar a aplicabilidade desse sistema na determinação de vitamina B₂ em amostras biológicas, como por exemplo, a urina.

Por fim, sugiro a investigação e a determinação simultânea de multivitaminas do complexo B ou todas as vitaminas hidrossolúveis.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, S. M. L. et al. O eletrólito de suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, p. 813-817, 2004.

ALBALA'-HURTADO, S. et al. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 778, n. 1-2, p. 247-253, 1997.

ALBALA'-HURTADO, S. et al. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 778, n. 1-2, p. 247-253, 22 ago. 1997.

ANALYTICAL METHODS, C. Determination of thiamine and riboflavin in pet foods and animal feeding stuffs. **Analyst**, v. 125, n. 2, p. 353-360, 2000.

ÂNGELO, A. C. D. et al. Estudo da adsorção de hidrogênio e sulfeto na superfície de paládio: Aspectos experimentais (eletroquímica) e teóricos (ab initio e teoria do funcional da densidade). **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 473-479, 2001.

ANICETO, C. et al. Determinação espectrofotométrica de vitamina B₂ (riboflavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema de análises por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 23, p. 637-640, 2000.

ANIK, Ü. et al. The usage of a bismuth film electrode as transducer in glucose biosensing. **Microchimica Acta**, v. 160, n. 1, p. 269-273, 2008. AOAC -ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Method 924.29**: Official methods of analysis. 15 ed. Arlington: AOAC, v. 2, p. 1053-1054, 1990.

ARNOLD, A.; LIPSIUS, S. T.; GREENE, D. J. Riboflavin determination by the microbiological method. **Journal of Food Science**, v. 6, n. 1, p. 39-43, 1941.

ARRIBAS, A. S. et al. Voltammetric Detection of the Herbicide Metamitron at a Bismuth Film Electrode in Nonde-aerated Solution. **Electroanalysis**, v. 18, n. 23, p. 2331-2336, 2006.

BABAEI, A. et al. A sensitive determination of acetaminophen in pharmaceutical preparations and biological samples using multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 344-351, 2011.

BALDRIANOVA, L. et al. Effect of Bi(III) concentration on the stripping voltammetric response of in situ bismuth-coated carbon paste and gold electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 2, p. 481-490, 2006.

BALL, G. F. M. **Vitamins in foods: analysis, bioavailability and stability**. London: CRC Press, 2006.

BANDŽUCHOVÁ, L. et al. Voltammetric monitoring of electrochemical reduction of riboflavin using silver solid amalgam electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 75, p. 316-324, 2012.

BANKS, C. E. et al. Manganese detection in marine sediments: anodic vs. cathodic stripping voltammetry. **Talanta**, v. 65, n. 2, p. 423-429, 2005.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods, fundamentals and applications**. New York: John Wiley & Sons Inc, 1980.

BAREK, J. et al. Nontraditional Electrode Materials in Environmental Analysis of Biologically Active Organic Compounds. **Electroanalysis**, v. 19, n. 19-20, p. 2003-2014, 2007.

BARTZATT, R.; WOL, T. Detection and Assay of Vitamin B₂ (Riboflavin) in Alkaline Borate Buffer with UV/Visible Spectrophotometry. **International Scholarly Research Notices**, p. 1-7, 2014.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5th. ed. New York: W H Freeman, 2002.

BERNARDELI, Jossy Karla Brasil. **Preparo e caracterização de eletrodos compósitos a base de carbono, bismuto e poliuretano para determinação de metais**. 127 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em engenharia mecânica e de Materiais, Departamento

de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BERNARDELLI, J. K. B. et al. Determination of zinc and cadmium with characterized Electrodes of carbon and polyurethane modified by a bismuth film. **Materials Research**, v. 14, p. 366-371, 2011.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química dos alimentos**. 2. ed. rev. São Paulo: Varela, 1995. 163-189.

BOBROWSKI, A. et al. Application of the Bismuth Film Electrode for Voltammetric Determination of Titanium Using Ti(IV)-Oxalate-Chlorate Catalytic System. **Electroanalysis**, v. 21, n. 22, p. 2415-2419, 2009.

BRADFORD, E. A. M.; COKE, H. Observations on the microbiological determination of riboflavin in blood. **Biochemical Journal**, v. 39, n. 5, p. 379-385, 1945.

BRZEZIŃSKA, E.; MIELCZAREK, C.; PAJAŁ, W. Analysis of acid-base properties of riboflavin calculated via semi-empirical methods. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 65, n. 1, p. 59-63, 2008.

BUČKOVÁ, M.; GRÜNDLER, P.; FLECHSIG, G. U. Adsorptive Stripping Voltammetric Detection of Daunomycin at a Bismuth Bulk Electrode. **Electroanalysis**, v. 17, n. 5-6, p. 440-444, 2005.

CALDEIRA, A. I. C. **Desenvolvimento de sensores electroquímicos para a determinação de vestígios de iões metálicos tóxicos em eléctrodos de filme de bismuto**. 69 f., Dissertação (Mestrado). Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

CAMPESTRINI, I. et al. Application of bismuth-film electrode for cathodic electroanalytical determination of sulfadiazine. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 17, p. 4970-4975, 2010.

CARVALHO, P. B.; ARAUJO, W. M. C. Rotulagem de suplementos vitamínicos e minerais: uma revisão das normas federais. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 13, supl. p. 779-791, Apr. 2008.

CHARALAMBOUS, A.; ECONOMOU, A. A study on the utility of bismuth-film electrodes for the determination of In(III) in the presence of Pb(II) and Cd(II) by square wave anodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 547, n. 1, p. 53-58, 2005.

CHATTERJEE, A.; FOORD, J. S. Biological applications of diamond electrodes; electrochemical studies of riboflavin. **Diamond and Related Materials**, v. 18, n. 5-8, p. 899-903, 2009.

CHATZITHEODOROU, E.; ECONOMOU, A.; VOULGARPOULOS, A. Trace Determination of Chromium by Square-Wave Adsorptive Stripping Voltammetry on Bismuth Film Electrodes. **Electroanalysis**, v. 16, n. 21, p. 1745-1754, 2004.

CHEN, J.; SUN, J.; LIU, S. Determination of Riboflavin in Cereal Grains by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection with On-Line Concentration. **Analytical Letters**, v. 46, n. 6, p. 887-899, 2012.

CHEN, M. et al. Determination of riboflavin by high-performance liquid chromatography with riboflavin-depleted urine as calibration and control matrix. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 820, n. 1, p. 147-150, 2005.

CHEN, Z.; CHEN, B.; YAO, S. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets. **Analytica Chimica Acta**, v. 569, n. 1-2, p. 169-175, maio 2006.

CHEN, W. et al. Redox reaction characteristics of riboflavin: a fluorescence spectroelectrochemical analysis and density functional theory calculation. **Bioelectrochemistry**, v. 98, p. 103-108, 2014.

CLAUX, B.; VITTORI, O. Bismuth Film Electrode as an Alternative for Mercury Electrodes: Determination of Azo Dyes and Application for Detection in Food Stuffs. **Electroanalysis**, v. 19, n. 21, p. 2243-2246, 2007.

COMBS JUNIOR, Gerald F. **The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health**. 4. ed. Boston: Academic Press, 2008. 600 p.

COMPTON, Richard G.; BANKS, Graig E.. **Understanding Voltammetry**. 2. ed. London: Imperial College Press, 429 p., 2014.

CORTÉS, P. et al. A New Epoxy-Based Layered Silicate Nanocomposite Using a Hyperbranched Polymer: Study of the Curing Reaction and Nanostructure Development. **Materials**, v. 7, p. 1830-1849, 2014.

DE SOUZA, D. et al. Utilização de eletrodos sólidos de Amálgama para a determinação analítica de compostos orgânicos e inorgânicos. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 487-496, 2011.

DOS SANTOS, T. A. D. et al. Cost-effective composite electrode for the fast voltammetric screening and determination of riboflavin (B2) and pyridoxine (B6) in pharmaceuticals. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 548-562, 2013.

DU, D.; et al. Cathodic electrochemical analysis of methyl parathion at bismuth-film-modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 13, p. 4478-4484, 2008.

ECONOMOU, A. Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 334-340, 2005.

ENSAFI, A. A.; HERDARI-BAFROEI, E.; AMINI, M. DNA-functionalized biosensor for riboflavin based electrochemical interaction on pretreated pencil graphite electrode. **Biosens Bioelectron**. v. 31, n. 1, p. 376-381, 2012.

Farmacopéia Brasileira. 3. ed. São Paulo: Organização Andrei Editora S. A.: p. 694-696, 1977.

FARGHALY, O. A.; HAMEED, R. S. A.; ABU-NAWWAS, A.-A. H. Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, p. 3287-3318, 2014.

FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S. et al. Differential Pulse Voltammetric Determination of Paraquat Using a Bismuth-Film Electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 11, p. 1260-1266, 2010.

FRENA, M. et al. In situ bismuth-film electrode for square-wave anodic stripping voltammetric determination of tin in biodiesel. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 12, p. 4678-4684, 2011.

GARCÍA, L. et al. Determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in pharmaceuticals by synchronous fluorescence spectrometry in organized media. **Analytica Chimica Acta**, v. 434, n. 2, p. 193-199, 11 maio 2001.

GATTI, R.; GIOIA, M. G. Liquid chromatographic determination with fluorescence detection of B 6 vitamers and riboflavin in milk and pharmaceuticals. **Analytica Chimica Acta**, v. 538, n. 1-2, p. 135-141, 2005.

GERENT, G. G. et al. In situ bismuth-film electrode for square-wave cathodic voltammetric detection of pendimethalin at nanomolar level. **Electrochimica Acta**, v. 168, n. 0, p. 379-385, 2015.

GONZALEZ, Ernesto R.. Eletrocatalise e poluição ambiental. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 262-266, 2000.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.

GUO, J.; LU, Y.; DONG, H. HPLC-MS Analysis of the Riboflavin Crude Product of Semisynthesis. **Journal of Chromatographic Science**, v. 44, n. 9, p. 552-556, 1 out. 2006.

GUJAR, T. P. et al. Bismuth oxide thin films prepared by chemical bath deposition (CBD) method: annealing effect. **Applied Surface Science**, v. 250, n. 1-4, p. 161-167, 31 ago. 2005.

GUO, Z. et al. Quantitative determination of zinc in milkvetch by anodic stripping voltammetry with bismuth film electrodes. **Talanta**, v. 65, n. 4, p. 1052-1055, 2005.

GUZSVÁNY, V. et al. Bismuth modified carbon-based electrodes for the determination of selected neonicotinoid insecticides. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4451-4466, 2011.

GUZSVÁNY, V. et al. Bismuth film electrode for the cathodic electrochemical determination of thiamethoxam. **Electroanalysis**, v. 18, n. 13-14, p. 1363-1371, 2006.

GUZSVÁNY, V. et al. Monitoring of Photocatalytic Degradation of Selected Neonicotinoid Insecticides by Cathodic Voltammetry with a Bismuth Film Electrode. **Electroanalysis**, v. 20, n. 3, p. 291-300, 2008.

HARDWICK, C. C. et al. Separation, Identification and Quantification of Riboflavin and its Photoproducts in Blood Products using High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: A Method to Support Pathogen Reduction Technology. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 3, p. 609-615, 2004.

HARRIS, D. C. Tradução de J. Bordinhão et al. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 868, 2011.

HARVEY, David. Electrochemical Methods of Analysis. In: HARVEY, David. **Modern analytical chemistry**. Boston: Mcgraw-hill Companies, 2000. Cap. 11. p. 461-542.

HASHMI, M. H. et al. Spectrophotometric determination of riboflavin from pharmaceutical preparations. **Microchimica Acta**, v. 57, n. 1, p. 30-35, 1969.

HEUDI, O.; KILINÇ, T.; FONTANNAZ, P. Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes. **Journal of Chromatography A**, v. 1070, n. 1-2, p. 49-56, 8 abr. 2005.

HU, L. et al. Determination of riboflavin in urine and beverages by capillary electrophoresis with in-column optical fiber laser-induced

fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 856, n. 1–2, p. 245-251, 1 set. 2007.

HUSTAD, S.; UELAND, P. M.; SCHNEEDE, J. Quantification of Riboflavin, Flavin Mononucleotide, and Flavin Adenine Dinucleotide in Human Plasma by Capillary Electrophoresis and Laser-induced Fluorescence Detection. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 862-868, 1999.

HUTTON, E. A. et al. An introduction to bismuth film electrode for use in cathodic electrochemical detection. **Electrochemistry Communications**, v. 3, n. 12, p. 707-711, 2001.

HUTTON, E. A. et al. Validation of bismuth film electrode for determination of cobalt and cadmium in soil extracts using ICP–MS. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 849-855, 2004.

HUTTON, E. A.; OGOREVC, B.; SMYTH, M. R. Cathodic Electrochemical Detection of Nitrophenols at a Bismuth Film Electrode for Use in Flow Analysis. **Electroanalysis**, v. 16, n. 19, p. 1616-1621, 2004.

HUTTON, E. A.; HOČEVAR, S. B.; OGOREVC, B. Ex situ preparation of bismuth film microelectrode for use in electrochemical stripping microanalysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, n. 1-2, p. 285-292, 2005.

JIAJIE, L.; NAGAOSA, Y. Cathodic stripping voltammetric determination of As(III) with in situ plated bismuth-film electrode using the catalytic hydrogen wave. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, n. 1, p. 1-6, 2007.

JORGE, E. O.; NETO, M. M. M.; ROCHA, M. M. A mercury-free electrochemical sensor for the determination of thallium(I) based on the rotating-disc bismuth film electrode. **Talanta**, v. 72, n. 4, p. 1392-1399, 2007.

KADARA, R. O.; TOTHILL, I. E. Resolving the copper interference effect on the stripping chronopotentiometric response of lead(II) obtained at bismuth film screen-printed electrode. **Talanta**, v. 66, n. 5, p. 1089-1093, 2005.

KAMAT, J. V. et al. Scope of detection and determination of gallium(III) in industrial ground water by square wave anodic stripping voltammetry on bismuth film electrode. **Talanta**, v. 86, n. 0, p. 256-265, 2011.

KARIM-NEZHAD, G. et al. Kinetic study of electrocatalytic oxidation of carbohydrates on cobalt hydroxide modified glassy carbon electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 141-151, 2009.

KEFALA, G.; ECONOMOU, A.; VOULGAROPOULOS, A. Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Trace Uranium with a Bismuth-Film Electrode Based on the U(VI)→U(V) Reduction Step of the Uranium-Cupferron Complex. **Electroanalysis**, v. 18, n. 3, p. 223-230, 2006.

KLEJDUS, B. et al. Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, n. 1-2, p. 57-67, 23 ago. 2004.

KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A. Disposable Nafion-modified micro-fabricated bismuth-film sensors for voltammetric stripping analysis of trace metals in the presence of surfactants. **Talanta**, v. 84, n. 3, p. 696-701, 2011.

KOTKAR, R. M.; DESAI, P. B.; SRIVASTAVA, A. K. Behavior of riboflavin on plain carbon paste and aza macrocycles based chemically modified electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 124, n. 1, p. 90-98, 2007.

KOZHANOVA, L. A.; FEDOROVA, G. A.; BARAM, G. I. Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins in Multivitamin Preparations by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 40-45, 2002.

KREFT, G. L.; DE BRAGA, O. C.; SPINELLI, A. Analytical electrochemistry of vitamin B12 on a bismuth-film electrode surface. **Electrochimica Acta**, v. 83, p. 125-132, 2012.

KRÓLICKA, A. et al. Bismuth-film-plated carbon paste electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 4, n. 2, p. 193-196, 2002.

KRÓLICKA, A. et al. Study on Catalytic Adsorptive Stripping Voltammetry of Trace Cobalt at Bismuth Film Electrodes. **Electroanalysis**, v. 15, n. 23-24, p. 1859-1863, 2003.

KRÓLICKA, A.; BOBROWSKI, A. Bismuth film electrode for adsorptive stripping voltammetry – electrochemical and microscopic study. **Electrochemistry Communications**, v. 6, n. 2, p. 99-104, 2004.

KUMAR, D. R.; MANOJ, D.; SANTHANALAKSHMI, J. Electrostatic fabrication of oleylamine capped nickel oxide nanoparticles anchored multiwall carbon nanotube nanocomposite: A robust electrochemical determination of riboflavin at nanomolar levels. *Analytical Methods*, v. 6, n. 4, p. 1011-1020, 2014.

LEGEAI, S.; BOIS, S.; VITTORI, O. A copper bismuth film electrode for adsorptive cathodic stripping analysis of trace nickel using square wave voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 591, n. 1, p. 93-98, 2006.

LEGEAI, S.; VITTORI, O. A Cu/Nafion/Bi electrode for on-site monitoring of trace heavy metals in natural waters using anodic stripping voltammetry: An alternative to mercury-based electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 560, n. 1-2, p. 184-190, 2006.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5. Campinas: Átomo, 2008. 357 p.

LEÓN-RUIZ, V.; VERA, S.; ANDRÉS, M. P. S. Validation of a screening method for the simultaneous identification of fat-soluble and water-soluble vitamins (A, E, B1, B2 and B6) in an aqueous micellar medium of hexadecyltrimethylammonium chloride. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 381, n. 8, p. 1568-1575, 2005.

LEPORATI, A. et al. Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to the analysis of water-soluble vitamins in Italian pasta. **Analytica Chimica Acta**, v. 531, n. 1, p. 87-95, 21 fev. 2005.

LI, H. et al. Simultaneous determination of ultratrace lead and cadmium by square wave stripping voltammetry with in situ depositing bismuth at Nafion-medical stone doped disposable electrode. **Journal of Hazardous Materials**, v. 191, n. 1-3, p. 26-31, 2011.

LI, R.; XIONG, J.; ZHU, W. Q., HAN, Y. Y.; HE, X. Y. Electrochemical behavior and determination of vitamin B2 on Ag-doped sodium montmorillonite modified electrode, *Fenxi Kexue Xuebao*, n. 28, p. 365, 2012.

LIMA, C. A.; SPINELLI, A. Electrochemical behavior of progesterone at an ex situ bismuth film electrode. **Electrochimica Acta**, v. 107, p. 542-548, 2013.

LIN, L. et al. Adsorptive stripping voltammetric measurements of trace uranium at the bismuth film electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 535, n. 1-2, p. 9-13, 2005.

LIU, B. et al. A Study of Nafion-Coated Bismuth-Film Electrode for the Determination of Zinc, Lead, and Cadmium in Blood Samples. **Electroanalysis**, v. 20, n. 21, p. 2363-2369, 2008.

LIU, C. Y.; GAO, C. Investigation of electrochemical properties of Keggin-type phosphotungstic acid/2-aminopyridine electropolymerized modified electrode and its electrocatalysis towards vitamin B₂, *Fenxi Ceshi Xuebao*, n. 31, p. 174, 2012.

LIU, W. S.; ZHANG, J. K.; LU, J. H.; BAI, L. R. DONG, S. M. Trace vitamin B2 determination with glassy carbon electrode and electrochemical behavior. *Shengwu, Jiagong Guocheng*, n. 7, p. 73, 2009.

LONG, J.; NAGAOSA, Y. Determination of Selenium(IV) by Catalytic Stripping Voltammetry with an in situ Plated Bismuth-film Electrode. **Analytical Sciences**, v. 23, n. 11, p. 1343-1346, 2007.

LÓPEZ-DE-ALBA, P. L. et al. Simultaneous determination and classification of riboflavin, thiamine, nicotinamide and pyridoxine in pharmaceutical formulations, by UV-visible spectrophotometry and multivariate analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 715-722, 2006.

MARIA, L. et al. Estatística aplicada à química: dez dúvidas comuns. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 888-892, 2011.

MARTOS, Lara Martholly di. **Determinação voltamétrica sequencial de urânio, cádmio e chumbo em fertilizantes fosfatados utilizando o eletrodo de filme de bismuto**. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química., Centro de Ciências Físicas e Matemáticas., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MASSEY, V. The chemical and biological versatility of riboflavin. **Biochemical Society transactions**, v. 28, n. 4, p. 283-296, 2000.

MAURITZ, K. A.; MOORE, R. B. State of Understanding of Nafion. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 10, p. 4535-4586, 2004.

MIDTTUN, O. et al. Multianalyte quantification of vitamin B6 and B2 species in the nanomolar range in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Clinical chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1206-1216, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 40, de 13 de janeiro de 1988. **Medicamentos à Base de Vitaminas E/ou Minerais Ou Suas Associações**. n. 11, Seção 1, p. 11-11. Disponível em: <http://cn3.org.br/legislacao/doc/40_1998.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2015.

MITROFANOV, D. A et al. Structure of Chemical Compounds , Methods of Analysis and Process Control Using Hplc With Mass-Spectrometric in Complex Medicinal Forms. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 43, n. 3, p. 53-56, 2009.

MORENO, M. et al. Cathodic Electrochemical Determination of Herbicides in Acid Media Using a Bismuth Film Electrode. **Electroanalysis**, v. 21, n. 3-5, p. 415-421, 2009.

MORENO, P.; SALVADÓ, V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870, n. 1-2, p. 207-215, 18 fev. 2000.

MORESCHI, E. C. P. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas em alimentos**. 2006. 220 p. (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, São Paulo.

NDAW, S. et al. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs. **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 129-138, 2000.

NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; LLERENA, M. J. V. Simultaneous determination of tartrazine, riboflavine, curcumin and erythrosine by derivative spectrophotometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 350, n. 10, p. 610-613, 1994.

NAZI, A.; AMJADI, E. Adsorptive Stripping Differential Pulse Voltammetry for Determination of Trace Amounts of Riboflavin in Human Plasma. **JOURNAL OF SCIENCES (ISLAMIC AZAD UNIVERSITY)** v. 17, n. 64, p. 27-34, Summer 2007.

NAZI, A.; ZOLGHARNEIN, J.; AFIUNI-ZADEH, S. Spectrophotometric Determination of Ternary Mixtures of Thiamin, Riboflavin and Pyridoxal in Pharmaceutical and Human Plasma by Least-Squares Support Vector Machines. **Analytical Sciences**, v. 23, n. 11, p. 1311–1316, 2007.

NIE, T. et al. Electroactive species-doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films: Enhanced sensitivity for electrochemical simultaneous determination of vitamins B2, B6 and C. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 244-250, 2013.

NOSEUNG MYUNG et al. Cathodic Stripping Voltammetry of Tellurium(IV) at a Bismuth Film Electrode. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 32, n. 9, p. 3501-3504, 2011.

NUNES, L. M. D. S. **Desenvolvimento de eletrodo de filme de bismuto depositado sobre cobre para aplicações eletroanalíticas**. 2007. 74 f., Dissertação (Mestrado). UFSCar, São Carlos.

NUNES, L. M. S.; FARIA, R. C. The Influence of the Electrodeposition Conditions on the Electroanalytical Performance of the Bismuth Film

Electrode for Lead Determination. **Electroanalysis**, v. 20, n. 20, p. 2259-2263, 2008.

Official Methods of Analysis of the AOAC. 14. Arlington: Association of Official Analytical Chemists. p. 868-869, 1984.

OGOREVC, B. et al. An introduction to bismuth film electrode for use in cathodic electrochemical detection. **Electrochemistry Communications**, v. 3, n. 12, p. 707-711, 2001.

OLIVEIRA, F. C. M. D. **Desenvolvimento de sensores eletroanalíticos utilizando eletrodos modificados com filme de Bismuto**. 2008. 119 f., Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PAIXAO, J. A. D.; STAMFORD, T. L. M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos: uma abordagem analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 96 - 105, 2004.

PAULIUKAITĖ, R.; BRETT, C. M. A. Characterization and Application of Bismuth-Film Modified Carbon Film Electrodes. **Electroanalysis**, v. 17, n. 15-16, p. 1354-1359, 2005.

PEREZ-RUIZ, T. et al. Photochemical spectrophotometric determination of riboflavin and riboflavin 5[prime or minute]-phosphate by manual and flow injection methods. **Analyst**, v. 119, n. 6, p. 1199-1203, 1994.

PEREZ-RUIZ, T. et al. Photokinetic determination of riboflavin and riboflavin 5[prime or minute]-phosphate using flow injection analysis and chemiluminescence detection. **Analyst**, v. 119, n. 8, p. 1825-1828, 1994.

PERVEEN, S.; YASMIN, A.; KHAN, K. M. Quantitative Simultaneous Estimation of Water Soluble Vitamins, Riboflavin, Pyridoxine, Cyanocobalamin and Folic Acid in Neutraceutical Products by HPLC. **The Open Analytical Chemistry Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2009.

PHILIPSBORN, H. E. **Dictionary of vitamins and phamacochemistry**. 1. ed. Oxford: Elsevier B.V., 828 p., 2007.

PRADO, Fernanda Scavassa Ribeiro do. **Preparação, caracterização e testes de eletrodo modificado com filme de bismuto para aplicação na análise voltamétrica de metais pesados**. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Analítica, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

PRESOTO, A. E. F.; RIOS, M. D. G.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. DE. Simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of vitamins B1, B2 and B6 in royal jelly. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, n. 1, p. 136-139, 2004.

PRIOR, C.; LENEHAN, C. E.; WALKER, G. S. Utilising gallium for enhanced electrochemical copper analysis at the bismuth film electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 598, n. 1, p. 65-73, 2007.

QI, H.; CAO, Z.; HOU, L. Electrogenerated chemiluminescence method for the determination of riboflavin at an ionic liquid modified gold electrode. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 78, n. 1, p. 211-215, 2011.

RAJAMANI, A. R. et al. Nano-and micro-hexagons of bismuth on polycrystalline copper: electrodeposition and heavy metal sensing. *CrystEngComm*, v. 16, n. 10, p. 20-32, 2014.

REHACEK, V. et al. Bismuth film electrodes for heavy metals determination. *Microsystem Technologies*, v. 14, n. 4, p. 491-498, 2008.

REVIN, S. B.; JOHN, S. A. Simultaneous determination of vitamins B2, B9 and C using a heterocyclic conducting polymer modified electrode. *Electrochimica Acta*, v. 75, p. 35-41, 2012.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIMAN, D. et al. Sparked-bismuth oxide screen-printed electrodes for the determination of riboflavin in the sub-nanomolar range in non-

deoxygenated solutions. **Electrochimica Acta**, v. 165, p. 410-415, maio 2015.

RIVLIN, R. S.; PINTO, J. T. Riboflavin. In: RUCKER, R. B. et al. (Ed.). **Handbook of vitamins**. 3. ed. rev. e ampl. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 255-273.

RODRÍGUEZ, J. A. et al. Validation of a tubular bismuth film amperometric detector: Determination of diclofenac sodium by multisyringe flow injection analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 1, p. 47-53, 2007.

SAFAVI, A. et al. Development of a sensitive and selective Riboflavin sensor based on carbon ionic liquid electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, n. 2, p. 176-181, 2010.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. et al. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in edible marine seaweeds by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatographic science**, v. 42, n. 3, p. 117-120, 2004.

SATTAYASAMITSATHIT, S.; THAVARUNGKUL, P.; KANATHARANA, P. Bismuth Film Electrode for Analysis of Tetracycline in Flow Injection System. **Electroanalysis**, v. 19, n. 4, p. 502-505, 2007.

SCHOLZ, F. et al. **Electroanalytical Methods Guide to Experiments and Applications**. 2. ed. Heidelberg: Springer, 366 p., 2010.

SEGURA, R.; TORAL, M. I.; ARANCIBIA, V. Determination of iron in water samples by adsorptive stripping voltammetry with a bismuth film electrode in the presence of 1-(2-piridylazo)-2-naphthol. **Talanta**, v. 75, n. 4, p. 973-977, 2008.

SELVA, T. M. G. **Estudos eletroquímicos da lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) e derivados de 1,4-naftoquinona com atividade moluscida**. 92 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SHEN, Z.; XI, X.; MING, L. Electrochemical behavior and voltammetric determination of vitamin B2 at a multi-wall carbono

nanotube modified electrode, Suzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, n. 27, p. 81, 2011.

SHIH, Y. et al. Flow injection analysis of zinc pyrithione in hair care products on a cobalt phthalocyanine modified screen-printed carbon electrode. **Talanta**, v. 62, n. 5, p. 912-917, 2004.

SHUMYANTSEVA, V. V. et al. Fluorescent assay for riboflavin binding to cytochrome P450 2B4. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 2, p. 365-370, 2004.

SILVA, D. C. **Desenvolvimento de método analítico para determinação das vitaminas hidrossolúveis em amostras de alimentos por eletroforese capilar explorando cromatografia eletrocinética micelar**. 110 f., Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos da Química Analítica**. 8. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 1124 p., 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, p. 836, 2002.

SMITH, William F.; HASHEMI, Javad **Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais** 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 712 p., 2012.

SOUZA, A. C. S. D. et al. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 887-891, 2005.

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

SOUZA, P. H. M. D. **Estudos Eletroquímicos de Complexos de Cu(II) de Antibióticos da Classe das Fluorquinolonas**. 99 f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química, Belo Horizonte, 2011.

STRONG, F. M.; CARPENTER, L. E. Preparation of Samples for Microbiological Determination of Riboflavin. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, v. 14, n. 11, p. 909-913, 1 nov. 1942.

ŠVANCARA, I. et al. A Decade with Bismuth-Based Electrodes in Electroanalysis. **Electroanalysis**, v. 22, n. 13, p. 1405-1420, 2010.

ŠVANCARA, I. et al. Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 311-345, 2001.

TADEO, J. L. et al. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 882, n. 1-2, p. 175-191, 16 jun. 2000.

TAN, S. L. J.; KAN, J. M.; WEBSTER, R. D. Differences in proton-coupled electron-transfer reactions of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) between buffered and unbuffered aqueous solutions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 44, p. 13755-13766, 2013.

TAN, S. L. J.; WEBSTER, R. D. Electrochemically Induced Chemically Reversible Proton-Couple Electron Transfer Mechanisms occurs only when the phosphate groups are completely of Riboflavin (Vitamin B2). **J. Am. Chem. Soc.** 134, 5954-5964, 2012.

TEROL, A. et al. Microwave high performance liquid chromatography with UV-visible detection. Application to vitamins determination. **Analyst**, v. 137, n. 9, p. 2260-2266, 2012.

The United States Pharmacopeia -The National Formulary-USP-23. NF-18: p. 1379-1381, 1995.

TICIANELLI, Edson A.; CAMARA, Giuseppe A.; SANTOS, Luís G. R. A.. Eletrocatalise das reações de oxidação de hidrogênio e de redução de oxigênio. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 664-669, 2005 .

TIMUR, S.; ANIK, Ü. α -Glucosidase based bismuth film electrode for inhibitor detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, n. 1, p. 143-146, 2007.

VILLELA, G. G.; HARGREAVES, A. B. Estudos sobre a dosagem microbiológica das vitaminas do complexo B - I. Riboflavina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 167-176, 1945.

VIÑAS, P. et al. Liquid Chromatographic Analysis of Riboflavin Vitamers in Foods Using Fluorescence Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1789-1794, 2004.

WANG, H. et al. Preparation of a Preplated Bismuth Film on Pt Electrode and its Application for Determination of Trace Aluminum(III) by Adsorptive Stripping Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 23, n. 5, p. 1095-1099, 2011.

WANG, J. et al. Adsorptive stripping voltammetry of riboflavin and other flavin analogs at the static mercury drop electrode. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 158-162, 1985.

WANG, J. et al. Catalytic adsorptive stripping voltammetric measurements of trace vanadium at bismuth film electrodes. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 914-917, 2006.

WANG, J. et al. Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 434, n. 1, p. 29-34, 2001.

WANG, J. et al. Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 14, p. 3218-22, 2000.

WANG, J.; LU, J. Bismuth film electrodes for adsorptive stripping voltammetry of trace nickel. **Electrochemistry Communications**, v. 2, n. 6, p. 390-393, 2000.

WANG, M. et al. Determination of riboflavin by enhancing the chemiluminescence intensity of peroxomonosulfate-cobalt(II) system. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 4-5, p. 1222-1227, 2007.

WANG, X.-M.; CHEN, H.-Y. A spectroelectrochemical study of the interaction of riboflavin with β -cyclodextrin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 52, n. 5, p. 599-605, 1996.

WEI, H.; Omanovic, S. Interaction of Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) with a Glassy Carbon Electrode Surface. **Chem. Biodiv.** 2008, 5, 1622-1639.

WU, S.-H. et al. Adsorptive Stripping Analysis of Riboflavin at Electrically Heated Graphite Cylindrical Electrodes. **Electroanalysis**, v. 19, n. 21, p. 2251-2257, 2007.

YAMASHITA, M.; ROSATTO, S. S.; KUBOTA, L. T. Electrochemical comparative study of riboflavin, FMN and FAD immobilized on the silica gel modified with zirconium oxide. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 5, p. 635-641, 2002.

YANG, M. et al. Differential pulse anodic stripping voltammetry detection of metallothionein at bismuth film electrodes. **Talanta**, v. 69, n. 5, p. 1162-1165, 2006.

ZHANG, C.; QI, H. Highly sensitive determination of riboflavin based on the enhanced electrogenerated chemiluminescence of lucigenin at a platinum electrode in a neutral aqueous solution. **Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 18, p. 819-822, 2002.

ZHANG, F.; YAN, Y. WANG, Z.; CHEN, Y. Electrochemical behavior of riboflavina on carbon nanotube modified electrode *Huaxue Chuanganqi*, n. 26, p. 41, 2006.

ZHANG, H.; ZHAO, J.; LIU, H.; WANG, H.; LIU, R.; LIU, J. Application of poly (3-methylthiophene) modified glassy carbon electrode as riboflavin sensor. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 5, n. 3, p. 295-301, 2010.

ZHU, L.; LUO, D. Determination of Riboflavin Using the Polarographic Reduction Wave of Its Photochemical Reaction Products. **Analytical Letters**, v. 41, n. 17, p. 3138-3146, 2008.

ZONG, P.; NAGAOSA, Y. Determination of antimony(III) and (V) in natural water by cathodic stripping voltammetry with in situ plated bismuth film electrode. **Microchimica Acta**, v. 166, n. 1, p. 139-144, 2009.