

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ELETRODOS SELETIVOS
AO ANTIBIÓTICO TIAMULINA

Margareth Rita de Cássia Marques

02 26138



TESE-M348C

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

1995



UNIVERSITY	IQ
INSTITUTE	
TECHNICAL	
REPORT	
	26138
	433/95
C. I.	U. S.
PREPARED BY	R. J. J. O. O.
DATE	18/11/95
N° CPD	

CM-00080345-4

Aos meus pais,
Reinaldo e Elizabeth

Ao

Prof. Graciliano de Oliveira Neto

AGRADECIMENTOS

À empresa Rhodia S. A. pelo apoio e cooperação durante todo o curso.

À empresa Indústrias Químicas Resende S. A. pelo apoio, fornecimento de hidrogenofumarato de tiamulina puro e por permitir a utilização de suas instalações para a realização da parte experimental desta tese.

À empresa Biochimie G. m. b. H. (Kundl, Áustria) pelo fornecimento de informações técnicas, referências bibliográficas e formulações veterinárias.

ÍNDICE

	Página
Resumo.....	01
Abstract.....	02
1 - Introdução.....	03
2 - Revisão Bibliográfica.....	05
2.1 - Tiamulina.....	05
2.1.1 - Características Físico-Químicas.....	06
2.1.2 - Farmacologia.....	07
2.1.3 - Metodologia Analítica.....	09
2.1.3.1 - Extração.....	09
2.1.3.2 - Determinação Microbiológica.....	09
2.1.3.3 - Determinação Cromatográfica.....	10
2.1.3.4 - Determinação Fluorimétrica.....	11
2.1.3.5 - Determinação Volumétrica.....	11
2.2 - Eletrodos Seletivos a Íons.....	11
2.2.1 - Célula Clássica.....	11
2.2.2 - Seletividade.....	18
2.2.3 - Eletrodos de Vidro.....	20
2.2.4 - Eletrodos Baseados em Sais Inorgânicos.....	21
2.2.5 - Eletrodos com Membrana Polímero/Líquido.....	22
2.2.6 - Eletrodos Sensíveis a Gases.....	26
2.2.7 - Eletrodos Miniaturizados.....	30
2.2.8 - Eletrodos Seletivos para Fármacos.....	33
2.2.9 - Mecanismo de Funcionamento dos Eletrodos.....	35
3 - Materiais e Métodos.....	45
3.1 - Materiais.....	45
3.1.1 - Hidrogenofumarato de Tiamulina.....	45
3.1.2 - Reagentes e Soluções.....	45
3.1.3 - Preparações Veterinárias.....	46
3.1.4 - Equipamentos.....	48
3.2 - Métodos.....	48
3.2.1 - Preparação do Par Iônico Tetrafenilborato de Tiamulina.....	48
3.2.2 - Preparação do Par Iônico Fosfotungstato de Tiamulina.....	49
3.2.3 - Preparação do Par Iônico Aliquat-Tiamulina.....	50

3.2.4 - Preparação das Membranas.....	50
3.2.5 - Montagem do Eletrodo	59
3.2.6 - Efeito do pH.....	62
3.2.7 - Efeito do Meio Utilizado no Preparo das Soluções Utilizadas nas Medições.....	63
4 - Resultados e Discussões.....	64
5 - Conclusões.....	112
6 - Perspectivas.....	114
Referências Bibliográficas.....	115

RESUMO

O antibiótico hidrogenofumarato de tiamulina pode ser determinado quantitativamente através de eletrodos seletivos. Esses eletrodos podem ser construídos com membranas de PVC, copolímero etileno/acetato de vinila (EVA) com os pares iônicos tetrafenilborato de tiamulina e fosfotungstato de tiamulina. A maioria dos eletrodos seletivos preparados apresentou resposta nernstiana na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L de hidrogenofumarato de tiamulina e, em alguns casos, até $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L. Os limites de detecção encontrados foram da ordem de 10^{-5} a 10^{-6} mol/L. Esses eletrodos foram utilizados na determinação do teor de tiamulina em formulações de uso veterinário e na forma pura. Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente com aqueles obtidos pelos métodos comumente utilizados, cromatografia líquida de alto desempenho para as formulações e titulação em meio não-aquoso para tiamulina na forma pura. Dependendo da composição da formulação contendo hidrogenofumarato de tiamulina, a determinação do teor deste antibiótico pode ser feita por potenciometria direta sem tratamento prévio da amostra. Mas, em alguns casos, isso não foi possível, sendo necessário processo de extração seguido de determinação com o eletrodo seletivo. Os métodos analíticos apresentaram boa correlação. Dependendo das condições de análise, a estimativa de desvio padrão das determinações utilizando eletrodos seletivos é menor do que aquele obtido com cromatografia líquida de alto desempenho. As vantagens da análise utilizando eletrodos seletivos são que, como essas medições são por potenciometria direta, o custo das análises é menor quando comparado com cromatografia líquida de alto desempenho, as respostas são obtidas rapidamente, o equipamento utilizado não é caro nem sofisticado e o pessoal envolvido não requer treinamento especializado. Com o uso de potenciômetros movidos à bateria, é possível realizar análises utilizando eletrodos seletivos à tiamulina no campo, abrindo ampla gama de aplicações para esses eletrodos, possibilitando, entre outros, a realização de estudos de estabilidade de formulações e acompanhamento do tratamento dos animais.

ABSTRACT

The antibiotic tiamulin hydrogen fumarate can be assayed by using ion-selective electrodes. These electrodes can be made with membranes of PVC or ethylene/vinyl acetate copolymer (EVA) with the ionic pairs tiamulin tetraphenylborate and tiamulin phosphotungstate. Most of the ion-selective electrodes prepared showed nernstian response in the range from $1,0 \times 10^{-2}$ to $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L of tiamulin hydrogen fumarate and, in some cases, even down to $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L. The detection limits were found at the range of 10^{-5} mol/L to 10^{-6} mol/L. These ion-selective electrodes were used in the assay of tiamulin in veterinary preparations and in the bulk. The results were statistically compared to those from the methods usually employed to the assay of tiamulin, high-performance liquid chromatography in the case of veterinary preparations and non-aqueous titration for bulk tiamulin. Depending on the components of the veterinary formulation, the assay of tiamulin hydrogen fumarate can be made by direct potentiometry without previous treatment of the samples. But in some cases an extraction step was necessary before the determination with ion-selective electrodes. The analytical methods showed good correlation. According to the analytical procedure, the standard deviation in the ion-selective electrode methods is lower than that obtained with high-performance liquid chromatography. With the use of the ion-selective electrode methods it is possible to conduct the analysis by direct potentiometry with lower cost than with high-performance liquid chromatography. The responses are fast obtained, the equipment involved is neither expensive nor sophisticated and the analysts do not need an specialized training. Using portable potentiometers it is possible to conduct the analysis by ion-selective electrodes in the field. This fact yields a lot of possibilities to the application of these electrodes. It will be possible to study the stability of the veterinary formulations and to survey the animals therapy.

1 - INTRODUÇÃO

Controle de qualidade de medicamentos é um ramo da química analítica que tem grande impacto em saúde pública, assim o desenvolvimento de métodos confiáveis, rápidos e precisos para a determinação das substâncias ativas neles contidas se faz necessário.

Exigências mais rígidas e o desenvolvimento de métodos analíticos adequados para a determinação de vários fármacos em amostras complexas, como são os medicamentos e fluidos biológicos, têm levado muitos pesquisadores a descreverem e a aplicarem novas técnicas potenciométricas envolvendo eletrodos seletivos para fármacos, que podem substituir com vantagens os métodos mais sofisticados e trabalhosos.

Em geral, os principais compêndios farmacêuticos, como as Farmacopéias Britânica e Americana, prescrevem métodos para determinação do teor de fármacos que requerem etapas de pré-tratamento. Esses métodos, além de serem trabalhosos, sofrem, em muitos casos, interferências importantes devido à presença de outros compostos de estrutura semelhante. Muitos dos métodos analíticos mais sofisticados, como cromatografia gasosa, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, cromatografia líquida de alto desempenho, radioimunoensaio e outros, envolvem etapas de manipulação demoradas, equipamentos caros e treinamento especializado (31).

Eletrodos seletivos para íons são instrumentos importantes e confiáveis para análises biomédicas, farmacêuticas e químicas. Eles apresentam custo reduzido, são fáceis de usar, sua manutenção é simples e podem oferecer resultados em curto espaço de tempo. Eles apresentam várias vantagens em aplicações como a determinação de fármacos iônicos *in vitro*, *in vivo* e na monitoração de íons iônicos gerados *in situ*. Esses eletrodos constituem meio simples, rápido e barato para medir a atividade de espécies iônicas em ampla faixa de concentração, de 3 a 6 ordens de magnitude, sem complexa preparação da amostra. Os eletrodos seletivos proporcionam meio de determinação direta da atividade iônica de fármacos mesmo em soluções turvas ou coloridas (6).

Tiamulina é um antibiótico semi-sintético utilizado no tratamento de infecções em animais. Entre os poucos métodos analíticos já descritos para sua quantificação, estão técnicas sofisticadas, trabalhosas e que exigem equipamentos caros como cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alto desempenho e fluorimetria.

O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento e avaliação de método analítico para a quantificação de tiamulina utilizando eletrodos seletivos. Foi estudada a possibilidade de construção desses eletrodos utilizando os formadores de filmes policloreto de vinila (PVC), copolímero etileno/acetato de vinila (EVA), acetato de celulose e Nafion. Como polímeros geralmente necessitam da presença de plastificantes para a formação das membranas, diversos plastificantes foram empregados a fim de se verificar a influência da natureza desses compostos na resposta dos eletrodos. A resposta do eletrodo também depende da presença e das características do ionóforo incorporado à membrana, para se observar a influência destes pares iônicos, tetrafenilborato de tiamulina e fosfotungstato de tiamulina foram sintetizados e incorporados às membranas. De todos os eletrodos construídos, alguns foram escolhidos para a determinação quantitativa direta de hidrogenofumarato de tiamulina em preparações veterinárias comerciais.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - TIAMULINA

Em 1951, foi isolada de duas espécies de basidiomicetos, *Pleurotus mutilus* (Fr.) Sacc. e *Pleurotus passeckerianus* Pilat, uma substância que mostrou atividade antibacteriana, pleuromutilina (Figura 1). Em 1963, esse mesmo antibiótico foi obtido a partir de cepas de *Clitopilus passeckerianus*. Sua atividade era modesta e seu espectro de ação confinado aos organismos gram-positivos (23,36,68-69).

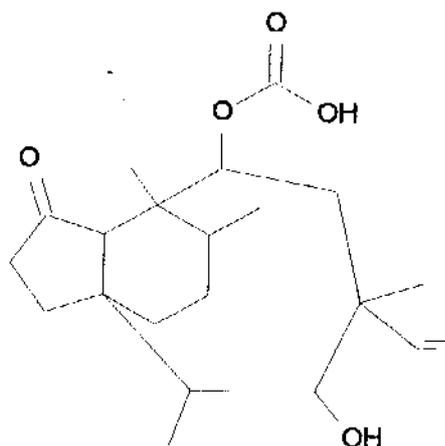


Figura 1 - Estrutura da pleuromutilina.

Pleuromutilina mostrou-se eficaz principalmente contra o crescimento de micoplasmas, uma propriedade interessante, uma vez que esses microrganismos têm sido diagnosticados como causadores de várias doenças infecciosas encontradas tanto no homem como em animais. Por esta razão foram preparados derivados de pleuromutilina com o objetivo de aumentar a eficácia do composto de origem e conseguir uma substância que pudesse ser utilizada como agente quimioterapêutico no tratamento de doenças causadas por micoplasmas.

Em 1976 conseguiu-se com sucesso a síntese de derivado semisintético de pleuromutilina, o qual apresentou atividade antimicrobiana maior que o composto de partida e que podia ser utilizado no tratamento de infecções em animais. Esse derivado cristalizava facilmente como hidrogenofumarato e foi denominado tiamulina, quimicamente é $[[(2\text{-dietilamino)etil]tio]-6\text{-etenildecáhidro-5-hidroxi-4,6,9,10-tetrametil-1-oxo-3a,9-propano-3a,H-ácido acético}$ (Figura 2) (23,36). Tiamulina ultrapassa pleuromutilina na sua atividade contra microrganismos gram-positivos e micoplasmas por, no mínimo, um fator de 10 e, em alguns casos, por um fator de 50 (36).

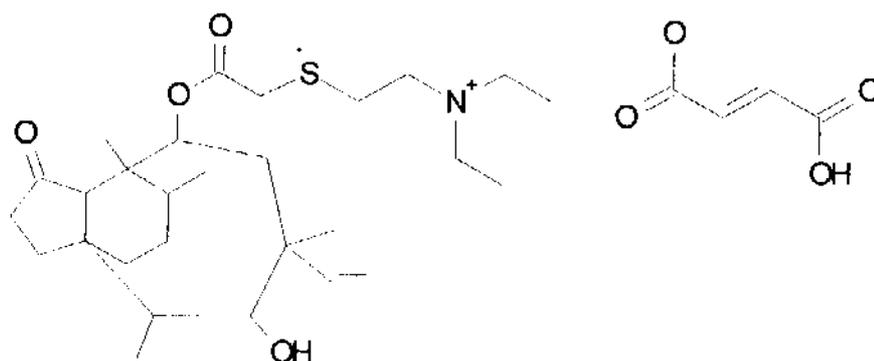


Figura 2 - Estrutura do hidrogenofumarato de tiamulina.

2.1.1 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Tiamulina é empregada na forma de base livre em formulações oleosas quando administrada por via parenteral e na forma de hidrogenofumarato para uso por via oral. Trata-se de pó cristalino branco a branco-amarelado com odor característico (9,10,23,68-69).

Seu peso molecular é 609,82. Dependendo da mistura de solventes utilizada na sua cristalização, seu ponto de fusão pode variar de $146 \pm 3^\circ\text{C}$ a $149 \pm 3^\circ\text{C}$ (68-69).

É solúvel em água (a cerca de 6%), metanol, etanol, acetona e clorofórmio; insolúvel em hexano e éter (9,23).

Esse antibiótico é estável à 25°C por 24 meses e a 50°C por 12 meses (23).

2.1.2 - FARMACOLOGIA

Tiamulina atua como inibidor da síntese proteica. Como este antibiótico tem afinidade muito forte pela sub-unidade 50S do ribossomo bacteriano, há quebra da cadeia peptídica imediatamente após o início da síntese proteica, levando à bacteriostase. Em concentrações muito altas, com vezes a concentração mínima inibitória, tiamulina pode ser letal para microrganismos sensíveis. Nas concentrações normalmente empregadas em terapêutica, tiamulina age como bacteriostático (20,23,36,67-69).

Sua atividade *in vitro* depende do pH do meio, sendo ótima a valores de pH iguais a 8,5 - 9,0 e reduzida em meio ácido (23).

O aspecto mais interessante da tiamulina é a sua eficácia contra várias espécies de micoplasmas. Ela é superior à atividade de tilosina, espiramicina, tetraciclina e outros antibióticos comumente empregados no tratamento de infecções causadas por esses microrganismos (10,18,20,36,41,63,67-70).

Tiamulina é um dos agentes antimicrobianos mais ativo contra *Treponema hyodysenteriae*. A concentração mínima inibitória para 90% de todas as cepas testadas foi menor que 0,10 µg/ml. Tilosina, lincomicina, eritromicina, espiramicina e espectinomicina não têm atividade *in vitro* contra esse microrganismo (10,18-20,23,36,41,63,67-69).

A atividade antibacteriana da tiamulina contra a maioria dos organismos gram-positivos é muito grande (18,36,41,63,67-69).

Tiamulina também é altamente ativa contra anaeróbios importantes como, por exemplo, *Clostridium perfringens* e *Haemophilus* sp. (20,36,63,67-69).

Tiamulina é largamente administrada para porcos no tratamento de pneumonia causada por micoplasma, desintéria, contra leptospirose, erisipela e infecções por estreptococcus e, numa extensão menor, contra pneumonias bacterianas, incluindo aquelas causadas por *Haemophilus pleuropneumoniae* e *P. multocida* (10,18-20,41,63).

Leptospirose em porcos é causada principalmente por *L. pomona*, *L. hyos*, *L. canicola* e *L. icterohaemorrhagiae* (68-69). Estudos preliminares mostraram que tiamulina a 200 ppm, em rações por 10 dias, produz diminuição de leptospúria e regressão marcante do processo inflamatório renal causado por *L. pomona* (63,68-69).

Tiamulina mostrou-se mais eficaz que tetraciclina, eritromicina, lincomicina-espectinomicina e tilosina no tratamento e prevenção de infecções causadas por *M. gallisepticum* e *M. synoviae* em aves.

Existem poucos relatórios sobre o uso de tiamulina no gado, possivelmente por causa da sua natureza irritante quando administrada por via parenteral, da sua neurotoxicidade após injeção intravenosa e de ser intragável para bezerros. Tiamulina tem apresentado bons resultados na prevenção de poliartrite fibrosa e sinovites em bezerros através da sua administração no leite durante o período de engorda.

Em carneiros, tiamulina apresenta efeito no tratamento de queratoconjuntivite infecciosa causada por *Rickettsia* sp. Dose única subcutânea de solução aquosa de tiamulina elimina ureaplasma do trato genital de carneiros, enquanto que a sua administração por via oral é ineficaz neste caso (63).

A concentração mínima inibitória da tiamulina é muito baixa para *M. mycoides* e rapidamente reverte os sinais de pleuropneumonia caprina contagiosa (70).

2.1.3 - METODOLOGIA ANALÍTICA

2.1.3.1 - EXTRAÇÃO

CORTANI (26) desenvolveu método onde substâncias lipofílicas, como é o caso da tiamulina base, podem ser separadas de amostras gordurosas através da extração em fase sólida, utilizando cartuchos de adsorvente ativado, por exemplo SEP-PAK, seguida de eluição do soluto com metanol. A vantagem desse processo é que os cartuchos podem ser lavados e reutilizados.

MARKUS & SHERMA (49,51) extraíram hidrogenofumarato de tiamulina presente em suplementos alimentares e em rações através de tratamento com carbonato de sódio, ocorrendo sua transformação em base livre. Tiamulina base é separada pela extração com mistura de solventes orgânicos seguida de extração com solução aquosa de ácido tartárico, sendo convertida de base livre para o tartarato. Esses mesmos autores mostraram que, dependendo da natureza da amostra, extrações com água são suficientes para a remoção de tiamulina, procedimento este que pode ser adotado com apresentações veterinárias na forma de grânulos de cloreto de polivinila contendo tiamulina (50).

2.1.3.2 - DETERMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Doseamento microbiológico com *Staphylococcus aureus* pode ser usado na quantificação de tiamulina em rações animais. Esse método, bastante sensível, baseado na determinação dos valores de pH do meio de cultura, foi estabelecido por COSGROVE & JONES (27). A grande diluição da amostra removeu qualquer efeito estimulante da ração no crescimento dos microrganismos e preveniu qualquer mudança dos valores de pH que não fosse ocasionada pelo desenvolvimento

microbiano. Os resultados foram lineares e puderam ser favoravelmente comparados com aqueles obtidos pelo método convencional de difusão em ágar (74).

JINBO e colaboradores (42) determinaram quantitativamente tiamulina residual presente em fígado e músculo de porco através da extração com metanol e posterior bioensaio com *Micrococcus luteus*. Este método apresentou sensibilidade de 0,05 µg de tiamulina/g de amostra.

2.1.3.3 - DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Procedimento para a determinação quantitativa de hidrogenofumarato de tiamulina em rações animais através da técnica de cromatografia líquida de alto desempenho foi descrito por HOWARD & COWEN (38). Hidrogenofumarato de tiamulina nas concentrações de 10 e 120 µg/g foi extraído das rações através de solução de acetato de etila, a 25% v/v em hexano, na presença de solução de carbonato de sódio. Tiamulina base foi então extraída com solução aquosa de ácido tartárico, sendo injetada em coluna empacotada com Hypersil-ODS 5 µm. Devido à baixa absorção de luz ultravioleta pela tiamulina a 250 nm, grandes volumes de injeção foram necessários para sua adequada quantificação.

Técnica semelhante foi utilizada por MARKUS & SHERMA (49,51) na determinação cromatográfica de tiamulina em suplementos alimentares e rações completas para porcos, com a introdução do uso de pré coluna de Adsorbosil sílica.

Tiamulina presente em formulações granulares associada com cloreto de polivinila pode ser determinada por cromatografia líquida de alto desempenho com prévia extração com água (50). Neste caso foi empregada coluna empacotada com fase estacionária octadecil (C₁₈).

A técnica de cromatografia gasosa pode ser empregada na quantificação de resíduos de tiamulina em tecido animal. MARKUS & SHERMA (52) utilizaram esse recurso para a determinação de resíduos desse fármaco em fígado de porcos. Os metabólitos de tiamulina foram

submetidos à hidrólise alcalina com posterior derivatização do produto hidrolítico principal, 8- α -hidroximutilina, com anidrido penta- fluoropropiônico. Esse derivado foi purificado e concentrado por cromatografia em coluna contendo Florisil como fase estacionária. O concentrado foi injetado em cromatógrafo gasoso equipado com coluna empacotada com SP-2250 a 3% ou SP-2100 a 3% e detector de captura de elétrons. A primeira coluna apresentou melhor desempenho devido à melhor resolução dos picos; o uso de uma terceira coluna, OV-210 a 5%, nas mesmas condições especificadas no método, proporciona meio adicional na eliminação de interferências.

2.1.3.4 - DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA

Aminas terciárias, como é o hidrogenofumarato de tiamulina, foram determinadas por GÜBITZ & AMANN (34) através da formação de par iônico com ácido 2-acridonassulfônico e quantificação por fluorimetria. O desvio padrão foi de 2 a 3% e o limite de detecção de cerca de 1×10^{-7} mol/L. Aminas primárias, secundárias e compostos de amônia quaternário interferem neste método.

2.1.3.5 - DETERMINAÇÃO VOLUMÉTRICA

Como tiamulina é uma base fraca, ela pode ser determinada por titulação em meio não aquoso. O desvio padrão deste método foi de 0,2% e apresentou linearidade na faixa de $1,9 \times 10^{-1}$ a 1,4 mol/L de tiamulina (9).

2.2 - ELETRODOS SELETIVOS A ÍONS

2.2.1 - CÉLULA CLÁSSICA

Eletrodos seletivos a íons podem ser definidos como sensores eletroquímicos que monitoram atividade iônica em solução (56). Uma vez que o potencial de um único eletrodo não pode ser medido, em uma definição mais correta, o potencial do eletrodo seletivo a íons deve ser substituído pela força eletromotriz de uma

célula galvânica consistindo de um eletrodo seletivo a íon, a solução da amostra e o eletrodo de referência (3). O conjunto necessário para realizar medidas com esses eletrodos é mostrado na Figura 3. Seu princípio de funcionamento é simples: dois eletrodos de referência de potencial fixo são separados pela membrana íon-seletiva. A solução em um dos lados da membrana é de composição conhecida e constante e contém os íons para os quais o eletrodo de referência interna e o eletrodo íon-seletivo respondem. A solução da amostra está em contato com o outro lado da membrana. Esta célula de trabalho pode ser esquematizada por:

	1	2	3	4
eletrodo de referência externa	solução da amostra	membrana íon seletiva	solução interna	solução de referência interna
A	B	C	D	E

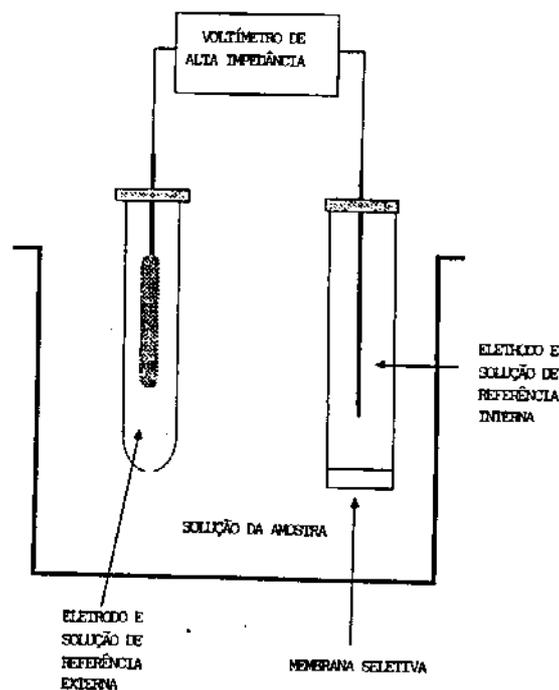


Figura 3 - Esquema do conjunto necessário para determinações potenciométricas utilizando eletrodo seletivo a íons.

A fim de que se possa obter sinais estáveis, cada eletrodo ou membrana deve estar em contato com uma solução que contenha o íon para o qual o eletrodo/membrana responde de maneira reversível. Uma célula adequada para medidas potenciométricas diretas deverá manter todos esses potenciais constantes, exceto o potencial de membrana ($\Delta\phi_M$), o qual é a diferença de potencial elétrico entre a solução interna e a solução da amostra ($\phi_{INT} - \phi_{AM}$ ou $\phi_D - \phi_B$). A variação neste potencial de membrana será a indicação da atividade do íon em análise na solução da amostra.

Considerando o exemplo de uma membrana de pH de vidro, imersa em solução diluída de atividade a de Cl^- fixa, com eletrodo de referência interna e externa $Ag/AgCl$. Uma solução interna adequada seria HCl $0,1$ M, porque o fio de $Ag/AgCl$ é recoberto pelos íons cloreto e a membrana de vidro pelo H^+ . Por convenção, o potencial E da célula é calculado como:

$$(1) \quad E_{\text{cel}} = (\phi_B - \phi_A) + (\phi_C - \phi_B) + (\phi_D - \phi_C) + (\phi_E - \phi_D)$$

Na prática, o eletrodo de referência interna, a solução interna e a membrana íon-seletiva estão restritos em uma unidade física chamada **eletrodo indicador**. Neste caso, a equação 1 se torna:

$$(2) \quad E_{\text{cel}} = E_{\text{indicador}} - E_{\text{ref. ext.}}$$

onde $E_{\text{ref. ext.}} = \phi_A - \phi_B$. Os potenciais nas interfaces 1 e 4 são constantes nessa célula; a única variação de potencial ocorre através da membrana íon-seletiva, e esse potencial é dependente do pH da solução da amostra, se a membrana for sensível a variações dos valores de pH. A equação 2 pode ser então simplificada para:

$$(3) \quad E_{\text{cel}} = K_{\text{cel}} + \Delta\phi_M$$

onde E_{cel} é a soma de todos os potenciais constantes das interfaces na célula, ou seja, $\Delta\phi_1$ e $\Delta\phi_4$, e $\Delta\phi_M = \Delta\phi_3 + \Delta\phi_2$ ou $\phi_D - \phi_B$. Princípios termodinâmicos governam a magnitude de $\Delta\phi_M$.

Existem várias maneiras de derivar o valor de $\Delta\phi_M$. A mais rigorosa delas trata $\Delta\phi_M$ como a soma de potenciais de interface de duas fases, $\Delta\phi_3 + \Delta\phi_2$, mais o potencial de difusão adicional dentro da membrana. O mesmo resultado, contudo, é obtido se a membrana é considerada como uma junção seletiva muito fina entre as soluções da amostra e a interna. Assim, considerando a mais simples de todas as expressões de potencial de junção (junção tipo 1):

$$(4) \quad \Delta\phi_M + (t_+ - t_-) \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_1(B)}{a_1(D)}$$

onde t_+ e t_- são os números de transferência para as espécies catiônicas e aniônicas, com atividade a_i , em contato com os dois lados da junção. Se a membrana é seletiva a cátion para o íon i , $t_+ = 1$ e $t_- = 0$. Isto é, se a corrente tiver de passar através da membrana, toda a corrente será carregada pelo cátion em análise,

$$(5) \quad \Delta\phi_M = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_i(B)}{a_i(D)}$$

onde R é a constante dos gases (8315 mV/Kmol), T é a temperatura em Kelvin, z é a carga do íon, F é a constante de Faraday (98,485 C/mol) e a_i é a atividade do íon em análise em solução. Assim, a equação 3 se torna:

$$(6) \quad E_{\text{cel}} = K_{\text{cel}} + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_j(B)}{a_i(D)}$$

Porque $a_i(D)$ é fixada pela composição da solução interna do eletrodo, a equação 6 pode ser reescrita:

$$(7) \quad E_{\text{cel}} = K'_{\text{cel}} + \frac{RT}{zF} \ln a_i(B)$$

onde $a_i(B)$ é a atividade do íon em análise na solução da amostra. Esta equação é conhecida como equação de Nernst. A 25°C, para o eletrodo de pH usado como exemplo, isto resulta na equação 8

$$(8) \quad E_{\text{cel}} = K'_{\text{cel}} - 0,0591 \cdot \text{pH}$$

Naturalmente, o tratamento do potencial de membrana como uma junção simples não proporciona um quadro exato do processo que resulta na separação de cargas e o ϕ_M medido. Isto é particularmente verdadeiro para membranas de vidro sensíveis a variações nos valores de pH onde os íons analisados não difundem para a fase membrana, e um mecanismo mais complexo originado do processo de geração de cinco potenciais separados é envolvido. Contudo, a derivação mais simples de potencial de junção é válido para todos os tipos de eletrodos ion-seletivos.

Enquanto a equação 4 prediz que o potencial de membrana deve ser zero quando a atividade do íon em análise é igual nos dois lados da membrana, na prática isso raramente acontece. A constante de equilíbrio para a reação dos íons com a superfície da membrana é frequentemente levemente diferente em cada lado da membrana, gerando um potencial denominado **potencial assimétrico**. Esses potenciais podem ser causados pela adsorção de componentes da amostra na superfície mais externa da membrana do eletrodo ion-seletivo, p. ex. proteínas, e pela não homogeneidade da composição da membrana. O potencial assimétrico é frequentemente considerado constante em determinações analíticas, contudo, essa suposição pode nem sempre ser válida, principalmente quando se utiliza eletrodos ion-seletivos em amostras muito complexas, onde extração e/ou adsorção de várias espécies na superfície mais externa da membrana podem ocorrer.

A equação 7 é a equação geral utilizada como base para as curvas de calibração de eletrodos. Essas curvas devem ser obtidas experimentalmente porque o ângulo de inclinação teórico de 59,2 mV por década de concentração é, na prática, raramente exatamente obtido (62). A resposta de um eletrodo é considerada nernstiana enquanto o potencial do eletrodo for proporcional ao logaritmo da atividade do íon em análise ($\ln a_i$), mesmo que a constante de proporcionalidade não é exatamente RT/zF . Para $z = 1$, RT/zF é igual a 59 mV a 25°C, mas valores baixos como 55 mV são frequentemente considerados como sendo nernstianos, embora isto seja incorreto (8). A calibração através de dois pontos, geralmente utilizada para medidas de pH, é um meio instrumental de correção para esse desvio da resposta teórica.

No exemplo de medida de pH, o eletrodo de referência externa foi considerado um fio Ag/AgCl diretamente imerso na solução da amostra. Na prática isso não é muito adequado porque requer que a atividade do íon cloreto permaneça constante em todas as amostras e padrões. Por essa razão, o eletrodo de referência contém sua própria solução. Essa solução de referência externa está em contato elétrico com a solução da amostra, através de um dispositivo poroso ou outra junção dentro do eletrodo. Eletrodo de calomelano saturado é frequentemente utilizado como eletrodo de referência com essa configuração. Contudo, o uso desse eletrodo introduz um outro fator no cálculo do potencial da célula (62). Na junção entre duas soluções de eletrólitos, íons de uma solução difundem para a outra e vice-versa. Diferentes íons têm mobilidades diferentes e se difundem com velocidades diferentes. Por exemplo, o íon hidrogênio é o íon com maior mobilidade e se difundirá mais rapidamente que os outros íons. Uma separação de cargas irá ocorrer e dependerá da diferença de mobilidade dos ânions e cátions nas duas soluções. Essa separação de cargas produz uma diferença de potencial através da junção, chamado de **potencial de junção líquido** (E_j) (8,62). Esse potencial de junção extra, E_j , deve ser incluído no potencial total da célula e a equação 7 se torna:

$$(9) \quad E_{\text{cel}} = K'_{\text{cel}} + \frac{RT}{zF} \ln a_{i,\text{amostra}} + E_j$$

A magnitude de E_j depende da natureza e atividade de todos os íons nos dois lados, ou seja, nas soluções de referência externa e da amostra. O valor de E_j absoluto não é importante mas é imperativo que ele seja mantido constante durante as determinações analíticas a fim de que o E_{cel} reflita a $a_{i,\text{amostra}}$ com precisão. A implicação prática deste fato é que amostras e padrões devem ter matriz semelhantes ou, no mínimo, força iônica semelhantes, para minimizar variações de E_j quando um eletrodo de referência com essa configuração estiver sendo usado. Por essa razão, a importância de se considerar a matriz da amostra em análises realizadas com eletrodos íon-seletivos é muito grande. Na prática, o potencial total

da célula, E_{cel} , é medido com um voltímetro de alta impedância. A impedância necessária pode ser estimada considerando que membranas ion-seletivas comuns exibem resistências da ordem de 1 a 250 MΩ. A célula pode ser vista como um circuito divisor de tensão simples, no qual

$$(10) \quad E_{\text{medido}} = (E_{\text{cel}}) \frac{R_x}{R_x + R_{\text{mem}}}$$

onde R_x é a resistência do aparelho usado para a medida. A fim de que E_{medido} seja igual ao E_{cel} real, R_x deve ser significativamente maior que a resistência da membrana. É prática comum se utilizar instrumentos com impedâncias de entrada maiores ou iguais a $10^{12} \Omega$. A resistência da membrana, contudo, aumenta dramaticamente com a diminuição do tamanho da membrana. Assim, para microeletrodos, equipamentos especialmente desenhados, com impedâncias de entrada maiores devem ser usados.

2.2.2 - SELETIVIDADE

Nenhuma membrana é tão idealmente seletiva quanto a do modelo usado. A equação de Nernst para eletrodos de membrana pode ser modificada para considerar essa seletividade imperfeita. Pela multiplicação da atividade do íon interferente (a_j) por um coeficiente determinado experimentalmente, o efeito do interferente no potencial do eletrodo pode ser previsto:

$$(11) \quad E_{\text{cel}} = K_{\text{cel}} + \frac{RT}{zF} \ln \left[a_i + k^{\text{pot}}_{ij} (a_j)^{z/x} \right]$$

onde k^{pot}_{ij} é o **coeficiente de seletividade potenciométrica** do eletrodo quando ele estiver sendo usado para medir a_i na presença do íon interferente j de carga x . Esta equação é conhecida como equação de Nicolsky. O coeficiente de seletividade deve ser determinado em

condições experimentais muito próximas daquelas que serão usadas para a determinação de i , porque k^{pot}_{ij} pode variar com as condições da análise, p. ex. força iônica, teor de proteínas, etc.

Esses princípios de seletividade devem ser considerados por duas razões. Primeiro, o baixo limite de detecção de i na presença de j será determinado pelo k^{pot}_{ij} do eletrodo.

Considerando a análise de uma amostra aquosa, com j na concentração de 1 mmol/L, com um eletrodo que apresenta um k^{pot}_{ij} de 10^{-3} . O menor limite de detecção de i será da ordem de $(10^{-3}) \times 1$ mmol/L = 1 μ mol/L. A níveis de a_i próximos de 1 μ mol/L, o potencial do eletrodo será severamente afetado por a_j e o coeficiente de inclinação será significativamente menor que 59,2 mV por década de a_i . Quando a_i é significativamente menor que $k^{pot}_{ij} \cdot a_j$ (uma ou duas ordens de magnitude), mudanças em a_i serão impossíveis de detectar. A partir desse exemplo fica claro que os eletrodos com k^{pot}_{ij} menores são os mais desejáveis.

O segundo aspecto das considerações de seletividade que se deve ter em mente é o da matriz da amostra constante. O termo seletividade na equação de Nicolsky pode também ser escrito como $\sum_i k^{pot}_{ij} \cdot (a_j)^{z/x}$, ou seja, todos os íons na amostra têm algum efeito sobre o E_{cel} , em maior ou menor grau. Enquanto o termo seletividade permanece constante entre amostras e padrões, o potencial do eletrodo reflete a_i . Quando a atividade de outros íons interferentes é variável, contudo haverá variações no potencial do eletrodo não relacionadas a a_i , causando resultados não precisos.

Há uma razão adicional para a padronização das matrizes. Até esse momento, foi utilizado a atividade do íon da amostra e não sua concentração, para explicar o comportamento do eletrodo. A atividade está relacionada à concentração, $[i]$, pelo **coeficiente de atividade** γ_i

$$(12) \quad a_i = \gamma_i [i]$$

O termo γ_i é dependente da força iônica da solução. Assim, se um eletrodo íon-seletivo é utilizado para determinar a concentração de um íon i , a matriz, em termos de força iônica, dos padrões de calibração deverá ser a mais próxima possível da das amostras.

2.2.3 - ELETRODOS DE VIDRO

O eletrodo íon-seletivo mais comumente utilizado é o eletrodo de vidro para pH, cujo comportamento básico foi descrito por Cremer em 1906. A incomum alta seletividade, larga faixa dinâmica e confiabilidade desse eletrodo o tornam um paradigma para o projeto e performance de outros eletrodos íon-seletivos com outros tipos de membrana. A resposta a variações dos valores de pH dessa membrana ocorre devido à presença de sítios de troca iônica SiO^- fixos na superfície hidratada do vidro, os quais são altamente sensíveis à atividade do íon hidrogênio. Esta membrana exibe extraordinário coeficiente de seletividade sobre outros cátions, o qual é devido ao equilíbrio favorável da reação envolvida:



assim como a mobilidade relativa do H^+ versus outros cátions na camada mais externa hidratada do vidro. Os valores de k^{Pot}_{ij} variam com a composição exata do vidro. Por exemplo, o eletrodo seletivo para sódio é uma membrana de vidro com teor de Al_2O_3 aumentado. É importante salientar que embora esse eletrodo apresente sensibilidade aumentada para Na^+ , ele é ainda um eletrodo de pH porque $k^{\text{Pot}}_{\text{Na}, \text{am}} > 1$. Assim, qualquer amostra a ser analisada para teor de metais alcalinos com um eletrodo de vidro deverá estar a pH alcalino ou neutro. O eletrodo para Na^+ de vidro tem, contudo, encontrado larga utilização em análises clínicas para a determinação de sódio em sangue total, soro ou plasma, apresentando resultados confiáveis na presença de concentrações variáveis de cálcio e potássio.

As maiores limitações dos eletrodos de vidro são sua alta

resistência e fragilidade. Esses fatores criam graves problemas práticos na fabricação de eletrodos miniaturizados, p. ex., para determinações contínuas *in vivo* ou intracelulares de pH e sódio. Devido a alta resistividade, quando comparado com outros eletrodos ion-seletivos de membrana, microeletrodos geralmente requerem sistemas amplificados especializados com impedância de entrada mais elevada.

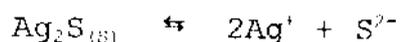
2.2.4 - ELETRODOS BASEADOS EM SAIS INORGÂNICOS

Esses eletrodos possuem membranas no estado sólido, que são aquelas que utilizam sais inorgânicos praticamente insolúveis. Por exemplo, o eletrodo de membrana seletiva a fluoreto atualmente utilizado é um cristal único de fluoreto de lantânio dopado com európio-II para reduzir a resistência. Esse cristal age como um condutor iônico puro para íons fluoreto. Quando o cristal é montado em eletrodo, ele responde à atividade de íons fluoreto da seguinte maneira:

$$E_{\text{cel}} = K_{\text{cel}} - (59,2 \text{ mV}) \log a_{\text{F}^-} \quad (\text{a } 25^\circ\text{C})$$

O eletrodo pode ser usado para medir níveis de pF de 0 a 6 com excelente seletividade sobre outros ânions comuns. O principal interferente é a hidroxila, devido a insolubilidade de $\text{La}(\text{OH})_3$, o qual interfere com a superfície do cristal, quando a concentração de hidroxilas for maior ou igual a concentração do íon fluoreto. Essa interferência pode ser controlada através do tamponamento das amostras para valores médios de pH. Valores baixos de pH também devem ser evitados porque o íon fluoreto protona em pH abaixo de 5, diminuindo a atividade desses íons livres. Para determinações de F^- com eletrodos ion-seletivos, geralmente um tampão de ajuste de força iônica total é adicionado à amostra. Essa solução tampona o pH ao redor de 5 e 6 e contém agentes complexantes, como citrato, para remover cátions como alumínio e ferro que poderiam complexar com fluoreto.

Outro eletrodo de membrana no estado sólido largamente utilizado baseia-se em discos prensados de sulfeto de prata. Essa membrana age como um condutor de cátions prata e é empregado na determinação de Ag^+ em baixíssimas concentrações. Esse eletrodo também mostra sensibilidade para íons sulfeto porque mudanças na atividade de S^{2-} afetam a atividade de Ag^+ na superfície do eletrodo:



Essa membrana teve seu uso ampliado pela inclusão de sais de sulfeto ou de prata mais solúveis. Essas membranas de precipitado misto podem ser desenvolvidas para serem sensíveis a uma larga faixa de íons. Por exemplo, uma membrana $\text{Ag}_2\text{S}/\text{CuS}$ é sensível a Cu^{2+} , uma membrana $\text{Ag}_2\text{S}/\text{AgCN}$ responde a CN^- . O padrão de seletividade de tais eletrodos é ditado pela solubilidade relativa do íon analisado versus os íons interferentes com Ag^+ ou S^{2-} . Por exemplo, uma membrana $\text{Ag}_2\text{S}/\text{AgBr}$ utilizada para determinações de Br^- mostra considerável seletividade sobre Cl^- ($\log k_{\text{Br}^-\text{Cl}^-} = -2,6$); contudo, como AgI é menos solúvel que AgBr , ele influencia a atividade de Ag^+ na superfície da membrana em maior extensão que AgBr , o que torna o I^- um sério interferente ($\log k_{\text{Br}^-\text{I}^-} = 3,7$). Membranas preparadas com Ag_2S ou com cristais mistos são sempre mais sensíveis a Ag^+ e S^{2-} do que ao próprio íon analisado. Infelizmente, espécies que complexam com prata, como os tióis ou moléculas contendo grupos sulfidríla, diminuem o desempenho da membrana.

2.2.5 - ELETRODOS COM MEMBRANA POLÍMERO/LÍQUIDO

As membranas de eletrodos polímero/líquido em uso hoje em dia, principalmente em determinações clínicas e biomédicas, têm sua origem no fenômeno de transporte iônico de células biológicas. Agentes presentes nas paredes das células lipofílicas podem transportar íons específicos entre as soluções aquosas dentro e fora da célula. Essa separação de íons vai gerar um potencial elétrico e é nesse potencial que se baseia o princípio dos eletrodos de membrana polímero/líquido.

No eletrodo, um ionóforo lipofílico apropriado ou trocador iônico é dissolvido em uma fase orgânica e colocado entre duas fases aquosas, a solução da amostra e a solução de referência interna. O potencial de membrana que se desenvolve é indicativo da atividade do ion analisado na amostra.

Nas primeiras membranas desenvolvidas, a fase orgânica era simplesmente um solvente orgânico líquido colocado sobre membrana fina de celulose porosa ou vidro sinterizado ou outro suporte parecido. Foram descritas membranas desse tipo seletivas para os ions cálcio e potássio. À medida que os trabalhos com esse tipo de membrana foram desenvolvidos, outros suportes mais duráveis que celulose foram encontrados, como por exemplo, cloreto de podivinila ou borracha de silicone. Devido a sua facilidade de construção, estabilidade em uso e similaridade de resposta com as membranas líquidas verdadeiras, esses suportes são quase que universalmente utilizados para a fabricação desses eletrodos. Na prática, o agente de transferência de ions é dissolvido em tetrahidrofurano, junto com PVC e um plastificante adequado. Essa mistura é aplicada a um suporte plano ou tubular, o tetrahidrofurano é deixado evaporar, resultando em uma membrana de PVC plastificado. Como o polímero plastificado se comporta como líquido viscoso, os carregadores iônicos exibem coeficientes de difusão da ordem de 10^{-8} a 10^{-6} cm^2/s , por isso as propriedades dos eletrodos são bastante similares àquelas das membranas originais líquidas.

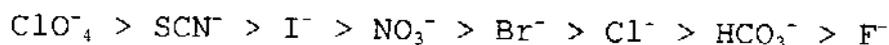
Nos últimos anos, consideráveis esforços têm sido destinados ao desenvolvimento de matrizes poliméricas alternativas para a construção de eletrodos deste tipo. Esses esforços tem sido focalizados primeiramente no aumento da adesão da membrana ao suporte. Igual interesse tem sido destinado à produção de matrizes poliméricas funcionalizadas as quais permitam a ligação covalente de enzimas, anticorpos e outras biomoléculas. A introdução de grupamentos hidrofílicos na matriz de PVC resultou em uma substancial redução do potencial assimétrico, comumente associado com membranas de PVC quando em contato com soluções contendo proteínas. Essa mesma matriz de PVC-OH usada em conjunção com poliuretano, assim como com borracha de silicone vulcanizada à temperatura ambiente, exibiram

adesão aumentada ao nitreto de silício e uma menor adsorção de proteínas do que PVC ou PVC hidroxilado.

As espécies ion-seletivas que podem ser usadas dentro das membranas poliméricas podem ser classificadas em três classes principais: trocadores iônicos, carregadores neutros e carregadores carregados.

- Trocadores Iônicos

Um cátion lipofílico como o tricaprilmetil amônio (Aliquat 336) dissolvido em uma membrana orgânica proporciona um excelente contra-íon para ânions na fase aquosa adjacente. Similarmente, um ânion orgânico como tetrafenilborato serve como contra-íon para cátions. Pela efetiva diminuição do potencial químico dos respectivos íons em análise na membrana, esses agentes iônicos induzem a partição dos íons da amostra através da interface membrana/amostra, gerando o potencial de fase que pode ser relacionado à atividade do íon da amostra aquosa. Esses tipos de membrana têm sido utilizados na preparação de eletrodos seletivos a uma grande quantidade de substâncias. A vantagem primária da sua ampla aplicação é também sua principal desvantagem: o trocador iônico exerce a mesma força de atração sobre todos os contra-íons presentes na amostra. A seletividade dessas membranas é governada somente pela habilidade desses vários íons em se distribuir pelas fases orgânica e aquosa. Contudo, o plastificante específico usado nessas membranas também afeta, em um certo grau, a sua seletividade. Como seria de esperar, uma membrana baseada em um trocador iônico exibe a maior resposta para íons orgânicos, seguida dos íons inorgânicos em ordem crescente de energia de hidratação. Para ânions, esse padrão de seletividade é conhecido como série de Hofmeister:



Um eletrodo do tipo trocador de íon aniônico construído com Aliquat 336 apresentará maior seletividade para ânions lipofílicos (perclorato, tiocianato) do que para os ânions fortemente hidratados, como o fluoreto. Um efeito similar é encontrado para os eletrodos

catiônicos, que geralmente possuem tetrafenilborato como trocador, os quais são mais seletivos para cátions orgânicos como íons de amônio quaternário de cadeia longa. Esses eletrodos catiônicos têm sido frequentemente utilizados como sensores para moléculas clinicamente importantes que se apresentam como cátions a pH baixos, como é o caso dos fármacos.

- Carregadores Neutros

Existe uma grande variedade de agentes complexantes iônicos neutros que podem ser incorporados em membranas poliméricas. Esses compostos têm sido descobertos ou desenvolvidos para exibirem complexação seletiva de um íon particular, geralmente um cátion, na presença de outros íons de mesma carga. Valinomicina e nonactina, por exemplo, são agentes complexantes que mostram afinidade particular para os cátions potássio e amônio, respectivamente. Um grande número de ionóforos tem sido desenvolvido para uso em membranas seletivas para os cátions mais comuns (Li^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e H^+).

Os métodos pelos quais tais ionóforos atingem suas seletividades pode variar. Éteres do tipo coroa e outros composto macrocíclicos, como a valinomicina e nonactina, fazem a discriminação dos cátions com base no seu tamanho, cátions que se encaixam bem no sítio de complexação serão mais fortemente complexados. Aminas de cadeia longa são bons sensores de H^+ devido a sua habilidade de se protonarem a valores de pH baixos, sua atração pelos outros cátions é mínima. Carregadores neutros são mais comumente aplicados para a determinação de cátions, com algumas notáveis exceções. Derivados de trifluoroacetofenona complexam ânions carbonato devido a participação única do ânion em uma reação íon/ionóforo reversível. Certas espécies organometálicas têm sido utilizadas tirando vantagem da afinidade de coordenação de um metal para um ânion particular. Membranas dopadas com certas metaloporfirinas com centro metal(II), por exemplo octaetil porfina rutênio(II) carbonila, exibem seletividades aniônicas que são significativamente diferentes daquelas da série de Hofmeister.

O mecanismo exato pelo qual as membranas com carregadores neutros operam ainda não está bem elucidado. A investigação da

existência e do papel desempenhado pelos sítios aniônicos dentro das membranas cátion-seletivas, a extensão da difusão dos complexos carregados dentro das membranas, a verificação da origem da seletividade das membranas e a elucidação do papel do plastificante estão sendo objeto de estudo.

- Carregadores com Carga

A terceira classe de carregadores ion-seletivos é a constituída pelos chamados trocadores associados a íons ou carregadores com carga. Essas espécies orgânicas estão na forma iônica dentro da membrana, como são os carregadores iônicos anteriormente descritos. Mas a seletividade dos carregadores com carga é estabelecida tanto pelo grau de associação da substância em análise com o carregador como com a partição do íon em análise no solvente da membrana. Os exemplos mais notáveis de tais agentes seletivos a íons são os alquil fosfatos originalmente utilizados na construção de eletrodos seletivos para cálcio. Neste caso, a seletividade para o cálcio é aumentada pelo uso de alquil fosfonatos como solvente da membrana. Mais recentemente, um derivado da vitamina B₁₂ demonstrou ter alta seletividade para nitrito. O mecanismo dessa seletividade foi explicado pela alta afinidade de coordenação do nitrito como um ligante axial para o complexo corrina-Co(III) positivamente carregado. Similarmente, a seletividade única de alguns eletrodos baseados em metaloporfirinas, na qual o centro metálico está no estado de oxidação +3 ou +4, parece ser baseado na coordenação desses íons como ligantes axiais para os seus respectivos complexos metal-ligantes positivamente carregados.

2.2.6 - Eletrodos Sensíveis a Gases

Por causa da necessidade de um método preciso para determinar CO₂ no sangue, em 1958 foi desenvolvida uma nova técnica para a determinação potenciométrica de gases. No que ficou conhecido como modelo SEVERINGHAUS (Figura 4), um filme fino de eletrólito é colocado entre uma membrana permeável a gás e um eletrodo de pH de vidro. A barreira permeável a gases geralmente é uma membrana de Teflon microporosa ou de borracha de silicone. O filme de eletrólito

está em contato com um reservatório no qual o eletrodo de referência é colocado. Como os dois eletrodos estão contidos em uma única unidade, o conjunto constitui uma célula galvânica completa. Quando esse sensor é colocado em uma amostra contendo CO_2 dissolvido, o gás difunde através da membrana para o filme de eletrólito até que a pressão parcial do gás no recipiente do eletrólito iguale à pressão parcial da amostra. O gás ácido, como por exemplo CO_2 , NO_x ou SO_x , ou básico, no caso do NH_3 , altera o pH do reservatório. Essa mudança de pH é observada pelo eletrodo de vidro e pode ser relacionada à pressão parcial do gás em análise na amostra.

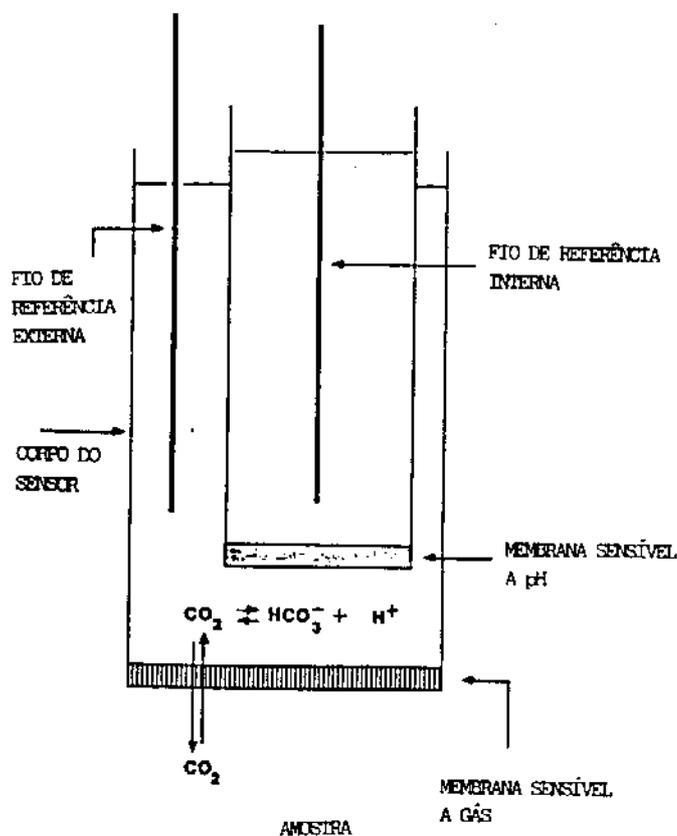


Figura 4 - Diagrama esquemático de um sensor para gases do tipo SEVERINGHAUS.

No caso do sensor para CO_2 , o pH do reservatório é determinado pela equação de HENDERSON-HASSELBACH, derivada do equilíbrio químico entre o dióxido de carbono solvatado e seus íons:

$$\text{pH} = \text{pK}_1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

Se a solução no reservatório contém uma grande concentração de bicarbonato, o pH será logaritmicamente proporcional a uma única variável, $[\text{H}_2\text{CO}_3]$, a qual por sua vez depende da quantidade de CO_2 que difundiu através da membrana permeável a gás. Assim, para um sensor de CO_2 :

$$E_{\text{cel}} = K_{\text{cel}} + S \log p\text{CO}_2,$$

onde **S** deve se aproximar de 59,2 mV por década de concentração e $p\text{CO}_2$ é a pressão parcial de CO_2 na amostra aquosa. Por essa razão, sensores para gases desse modelo contêm um filme de eletrólito tamponado para a forma iônica do gás em análise: HCO_3^- para sensores para CO_2 ou NH_4^+ para sensores para NH_3 . Os sensores para NO_x e SO_x operam pelo mesmo sistema.

A seletividade de sensores para gases do tipo Severinghaus é bastante alta. Íons inorgânicos simples não atravessam a membrana para gás e com isso não interferem nas medições. Variações no potencial de junção líquida entre amostras e padrões são eliminadas porque a meia célula de referência não é colocada diretamente na solução da amostra, ou seja, E_j é constante.

Não se deve, então, concluir que os sensores para gases não têm interferentes. Os mais óbvios deles são os gases ácidos e básicos que coexistem com o gás em análise na amostra. Um sensor para CO_2 do tipo Severinghaus também mostra sensibilidade para nitrito, sulfito e outros íons que formam gases em soluções ácidas, que atravessam a membrana e diminuem o pH da solução do reservatório. Da mesma forma,

aminas voláteis são interferentes em análises com sensor para o gás amônia. Além dos interferentes gasosos, espécies lipofílicas neutras, como por exemplo ácido salicílico ou ácido benzóico, presentes na amostra também podem migrar através da membrana de borracha de silicone atingindo a camada de eletrólito e, caso elas tenham caráter ácido, elas se dissociariam provocando uma mudança no pH.

A fim de eliminar essas interferências, um novo modelo de sensor para gases foi desenvolvido. Quando a membrana para pH de vidro é substituída por uma membrana polimérica que responde à forma iônica do gás em análise, consegue-se um sensor mais seletivo. Por exemplo, um sensor para NH_3 pode incorporar uma membrana polimérica seletiva para amônia baseada em nonactina (Figura 5). O sinal para esse sensor não depende do pH do filme de eletrólito, na verdade esse filme é tamponado, mas sim da concentração de equilíbrio de amônia resultante da amostra. O sinal do sensor não é afetado pela presença de amins voláteis uma vez que a membrana de nonactina exibe uma resposta muito pequena para as formas protonadas dessas amins. Da mesma forma, sensores para NO_x que utilizam membranas poliméricas sensíveis a nitrito ou nitrato não sofrem influência de outros gases ácidos presentes na amostra.

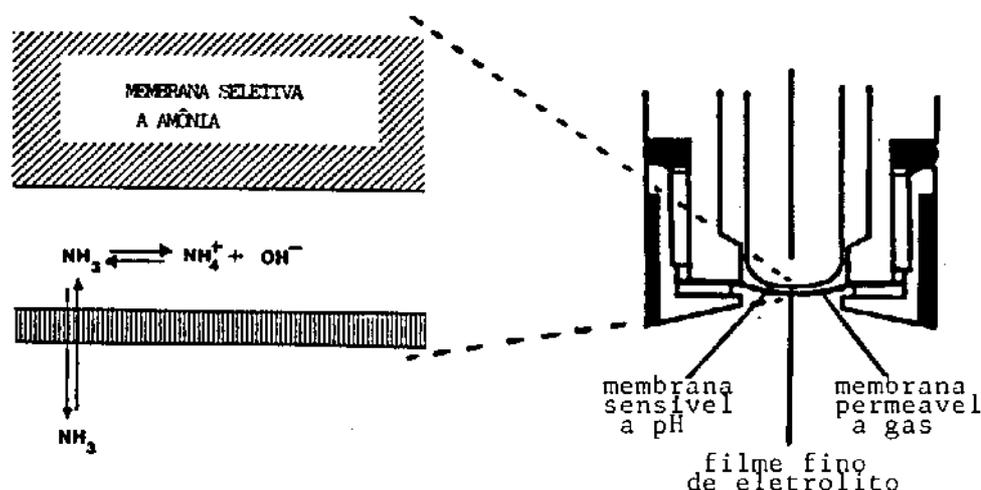


Figura 5 - Esquema de sensor para o gás amônia, o qual detecta a forma iônica (NH_4^+) do gás em análise ao invés de uma mudança inespecífica do pH.

Como já foi citado, o pH do filme de eletrólito nesses novos sensores é fixo. Isso provoca um efeito de tamponamento, ou seja, no equilíbrio com uma solução de teor de amônia conhecido, um nível muito mais alto de amônia é alcançado no filme tamponado do que naquele filme onde o pH pode aumentar à medida que o gás amônia difunde. Por essas razões, esses novos modelos de sensores para gases são muito mais sensíveis e seletivos que o sensor original.

2.2.7 - Eletrodos Miniaturizados

- Eletrodos Sólidos Revestidos

Como já discutido anteriormente, a configuração de célula potenciométrica mais comum inclui dois eletrodos de referência (interno e externo) imersos nas suas respectivas soluções e separados por uma membrana seletiva a íons. Existe uma classe de eletrodos seletivos a íons especialmente projetados que se desvia dessa construção. Membranas poliméricas seletivas a íons são fixadas diretamente em superfícies condutivas, como por exemplo, cabos metálicos, a fim de se obter eletrodos no estado sólido duráveis e muito pequenos. Não existindo solução interna, o fio de referência interna fica em contato direto com a membrana seletiva a íons, o que possibilita a construção de eletrodos miniatura com diâmetro de 0,5 a 2 mm.

A superfície externa desses eletrodos sólidos se comporta de maneira similar às membranas anteriormente descritas. Dependendo do agente seletivo ao íon presente dentro da membrana, a face externa da membrana desenvolve um potencial de acordo com a atividade a_i presente na amostra. Eletrodos desse tipo podem ser feitos para os íons para os quais já existe uma membrana polímero/líquido seletiva. O coeficiente angular e as características de seletividade dessas membranas são similares àsquelas obtidas com eletrodos de membrana polímero/líquido convencionais e têm utilidade na determinação de muitas espécies iônicas. Contudo, o potencial de fase da superfície interna é frequentemente não muito bem definido. Na maioria dos casos, é a presença de algum par redox na membrana, introduzido tanto intencionalmente (p. ex. ferrócenos/ferricenos) ou incidentalmente, que

define o potencial na interface membrana/cabo metálico. Exemplos do segundo caso incluem a difusão de oxigênio da amostra através da membrana ou impurezas redox no material da membrana. Embora medidas possam ser feitas com esses eletrodos, uma queda no potencial do eletrodo de uma série de medidas para outra pode ser observada, as condições na interface metal/membrana mudam, por isso esse tipo de eletrodo requer calibrações frequentes. Uma configuração modificada para esses eletrodos foi criada, nela gel muito fino de álcool polivinílico com KCl como eletrólito interno foi imobilizado entre um fio Ag/AgCl e uma membrana polimérica que responde a íons potássio. Variações no potencial desse eletrodo podem ocorrer se vapor de água se difundir para dentro ou para fora do gel interno. Isto pode ocorrer se houver variações na osmolaridade da amostra, resultando não só em mudança da atividade dos íons cloreto dentro da solução interna, mas também no encolhimento ou inchamento da membrana.

- Transistores de Efeito de Campo no Estado Sólido

Um eletrodo seletivo a íon pode ser montado colocando-se uma membrana polimérica em contato com um transistor de efeito de campo no estado sólido (TECES). Eles são baseados no princípio de que o potencial de fase da membrana externa afeta a voltagem do TECES. Quando o TECES está em um circuito que mede corrente, a corrente resultante deve ser indicativa do potencial da membrana e, conseqüentemente, da atividade do íon em análise na amostra. Esse tipo de dispositivo tem sido empregado no desenvolvimento de uma variedade de sensores no estado sólido (para Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc). Eles têm a vantagem de serem muito pequenos e terem baixo nível de ruído. O circuito de medição contendo a membrana, eletrodo de referência e os cabos de conexão podem ser incorporados dentro de um único chip eletrônico. Contudo, existem alguns problemas. Como não existe um potencial bem definido na interface membrana/transistor, esses sensores são sensíveis à queda de potencial causada pelas espécies que difundem da amostra para a membrana. Como no caso dos eletrodos metálicos mencionados anteriormente, eles são sensíveis a pares redox na superfície do metal e a superfície do transistor de efeito de campo, geralmente

óxido de silício ou nitrito de silício, é sensível a mudanças de pH na interface. Ácidos orgânicos e CO_2 presentes na amostra podem difundir através da membrana polimérica e atingir o transistor, alterando o potencial de fase na interface membrana/transistor. Além disso, há dificuldades de construção para evitar curto circuito em amostras aquosas.

- Cateteres

A maneira mais simples e mais confiável para construir sensores seletivos a íons miniaturizados, altamente estáveis, ainda é aquela onde existe um volume definido de eletrólito interno atrás da membrana seletiva. Esta tem sido a estratégia utilizada para a fabricação de eletrodos seletivos a íons apropriados para medidas contínuas *in vivo*. A Figura 6 ilustra um exemplo desses cateteres. Um tubo de PVC estreito com dois lúmens é fechado em uma das pontas com um disco de cerâmica poroso. Esta ponta fechada é mergulhada na solução da membrana polimérica contendo o carregador apropriado. Uma vez seco, o disco poroso serve como suporte físico para a membrana seletiva a íon, o que reduz a pulsação física da membrana durante a implantação no organismo do animal. Uma solução de referência interna apropriada é colocada no lúmen relativo ao eletrodo indicador. O contato do eletrodo de referência externa com o sangue do animal é conseguido pelo uso do segundo lúmen do cateter como ponte salina (62).

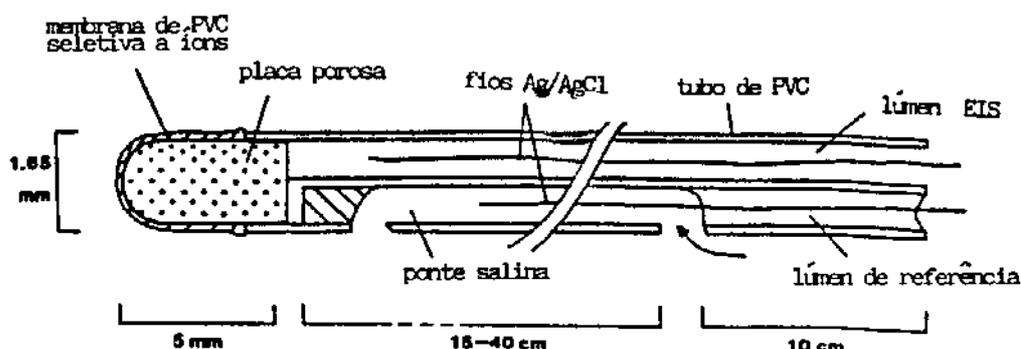


Figura 6 - Exemplo de cateter seletivo a íon.

2.2.8 - Eletrodos Seletivos a Fármacos

A maioria dos eletrodos seletivos para fármacos possui as seguintes características:

- seletividade para o composto de interesse;

- a faixa de linearidade do gráfico de calibração é relativamente grande, geralmente de 10^{-2} a 10^{-5} mol/L. Limites de detecção da ordem de 10^{-6} ou $10^{-6,5}$ mol/L têm sido relatados na literatura. Com prévia concentração da amostra, o limite de detecção da técnica potenciométrica empregando eletrodo seletivo pode igualar ou até mesmo ultrapassar aqueles encontrados com técnicas mais sofisticadas como radioimunoensaio, cromatografia gás-líquido, cromatografia líquida de alto desempenho e espectrometria de massa;

- com algumas exceções, os eletrodos seletivos para fármacos têm tempo de resposta rápido, geralmente ao redor de 30 s, dependendo da concentração da amostra. Entre as exceções estão os eletrodos enzimáticos e aqueles com tecido microbiano ou vegetal imobilizado;

- muitos eletrodos de membrana são passíveis de miniaturização, para facilitar, por exemplo, a inserção intravascular, e podem ser construídos com materiais que são fisiologicamente compatíveis, não tóxicos e facilmente esterilizáveis;

- o tempo e o custo de uma determinação com eletrodo seletivo para fármacos são reduzidos quando comparados com outras técnicas comumente empregadas (30).

Um dos princípios mais empregado para a construção de membranas seletivas para íons, sensíveis a fármacos, é a adição de complexo par iônico lipofílico em membrana altamente plastificada. Desde que, na década de 70, sucesso foi obtido na construção de eletrodo seletivo para acetilcolina, contendo borato de potássio-

tetrakis-(4-clorofenil) como trocador de ions e dioctilftalato como plastificante, muitos outros eletrodos seletivos para moléculas orgânicas têm sido desenvolvidos.

O desenvolvimento de eletrodos seletivos em análises farmacêuticas tornaram possível que a atividade de vários cátions e ânions orgânicos fosse medida direta e seletivamente e, em muitos casos, sem separação prévia da substância em análise contida na formulação farmacêutica. É possível o desenvolvimento de método para a determinação de fármacos em medicamentos que necessitam somente uma etapa de pré diluição, por exemplo no caso de soluções injetáveis, ou dissolução da forma sólida (comprimido, drágea ou granulado) no solvente empregado nas medições e do seu ajuste de pH e da força iônica (17,31).

Outra aplicação de eletrodos de membrana é na determinação da uniformidade do teor de comprimidos e em estudo de dissolução de formas sólidas.

Em muitos casos, o teste de uniformidade é preferível à determinação do teor do fármaco na amostra e o primeiro método pode ser realizado mais rapidamente que o segundo. Se a precisão do teste é satisfatória, o valor médio obtido no teste de uniformidade pode ser usado como resultado do teor do fármaco (31).

Está bem estabelecido que a eficácia clínica de um medicamento depende não somente da quantidade de substância ativa presente no produto, mas também da sua disponibilidade no organismo. No caso de formas sólidas de dosagem, particularmente aquelas com biodisponibilidade limitada pela velocidade de dissolução, os testes de dissolução podem servir como uma técnica simples, econômica e confiável para indicar a velocidade e a extensão da liberação do fármaco *in vivo* e também como uma ferramenta importante para a formulação, avaliação e controle de qualidade de medicamentos.

Numerosos sistemas de dissolução com amostradores e determinações automáticos têm sido desenvolvidos. Em geral, os

detectores empregados são espectrofotômetros. Reações químicas seletivas são empregadas a fim de evitar reações e interferências espectrais dos excipientes ou de outros fármacos contidos nessas formulações farmacêuticas. Eletrodos seletivos têm potencial de utilização muito grande em testes de dissolução devido à sua sensibilidade, seletividade, ampla faixa de concentração, insensibilidade às interferências ópticas. Essas qualidades os tornam adequados para análises de soluções coloridas e turvas e permitem flexibilidade na construção de sensores em fluxo para analisadores automáticos (31,59).

Muitos fármacos que atuam no sistema nervoso central podem causar dependência com graves consequências médicas e sociais. A detecção de tais fármacos na urina, os quais são geralmente quantificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa após etapas de extração e purificação, é um processo trabalhoso e demorado, que requer pessoal especialmente treinado. Os métodos potenciométricos que empregam sensores seletivos para fármacos são mais atraentes para análises de rotina. Dessa maneira, esses fármacos podem ser determinados facilmente sem os problemas associados à cor e à turbidez das amostras e não requerem pré tratamento das mesmas (29).

Devido ao grande sucesso dos eletrodos seletivos para fármacos, numerosos livros e revisões e artigos têm sido publicados (1,5,15,21-22,28,30,31,33,35,39,44-45,48,56-57,60-61,65,75-80).

2.2.9 - Mecanismo de Funcionamento dos Eletrodos

Os eletrodos seletivos a íons utilizados atualmente são baseados em membranas passivas, ou seja, regiões do espaço que separam duas fases de tal forma que o transporte de material entre as duas fases em contato é de alguma forma modificado ou inibido quando comparado com o transporte que ocorreria se as duas fases estivessem em contato direto. O transporte de material pode envolver complexos carregados ou neutros, simples íons ou elétrons, ou ainda "buracos".

A razão pela qual o transporte em membranas é interessante e útil em química analítica é que o transporte através de membranas modificadas pode levar ao desenvolvimento de diferença de potencial através da membrana. Esse potencial de membrana reflete a composição da fase externa, ou seja, da solução que está em contato com a membrana em ambos os lados e pode ser relacionado, na maioria dos casos, com a atividade dos íons na solução externa. Quando o potencial da membrana pode ser interpretado de uma maneira definitiva, em termos de atividade de íons, tem-se o fundamento básico da técnica analítica que pode ser usada para uma única determinação ou monitoração contínua da solução adjacente à membrana.

Membranas são frequentemente líquidas ou sólidas. Elas são suficientemente espessas para possuírem uma região interna e duas superfícies externas que separam a membrana das fases exteriores.

Para fins de entendimento do processo de geração de potencial, é conveniente considerar as membranas como sendo espessas o suficiente para terem uma região de composição única com relação às regiões externas. Esse conceito é muito importante para membranas utilizadas em eletrodos seletivos a íons.

Quando uma membrana é espessa o suficiente para proporcionar duas superfícies divisórias, considera-se que ela tem duas interfaces. Cada interface é uma superfície hipotética, a qual separa as propriedades físico-químicas da membrana das propriedades das fases externas, onde outro conjunto de propriedades físico-químicas existem. A localização das interfaces não é distinta porque propriedades importantes, tais como densidade de cargas e distribuição de potencial, variam continuamente de uma fase para outra. Existem vantagens em considerar membranas de eletrodos seletivos a íons como compostas de região interna homogênea ou heterogênea rodeada por fronteiras interfaciais. Este modelo enfatiza as similaridades no processo gerador de potencial, independente da composição da membrana, o que permite a separação dos processos que ocorrem em um lado de uma interface, geralmente o lado externo, dos processos envolvendo transferência de material através das outras interfaces e dos processos de transporte dentro da membrana. Assim,

as membranas não devem ser consideradas meramente como uma barreira geométrica com permeabilidade característica.

A espessura das membranas utilizadas como componentes ativos de eletrodos seletivos a íons é determinada por dois fatores: o circuito potenciométrico de medida e o longo tempo de resposta. Embora as membranas frequentemente utilizadas sejam finas, esta propriedade é operacional e não fundamental, uma vez que o transporte é realizado em uma dimensão, a de espessura mais fina.

As membranas para eletrodos seletivos a íons são imiscíveis ou, no mínimo, parcialmente imiscíveis, com as soluções circundantes ou com os contatos sólidos. Sólidos e líquidos orgânicos hidrofóbicos e sólidos inorgânicos com baixa solubilidade em água constituem os materiais principais para a construção de membranas. Contudo, as membranas não devem ser isolantes elétricos. Elas são permeáveis, em uma extensão facilmente mensurável, para espécies no ambiente que as circundam.

As membranas são frequentemente eletrólitos sólidos ou líquidos, porque são compostas de ácidos, bases, ou sais parcialmente ou completamente ionizados, ou porque contêm espécies potencialmente ionizáveis. Também devem ser consideradas as membranas de polieletrólitos (trocadores iônicos sintéticos sólidos), eletrólitos líquidos orgânicos imiscíveis com água e eletrólitos sólidos condutores iônicos.

Todos esses materiais contêm espécies iônicas ou grupos ionizáveis, cujo estado elétrico depende da constante dielétrica da membrana e da extensão da penetração do solvente. Trocadores de íons líquidos, tais como sais do ácido fosfônico e sais de amônio quaternário, possuem sítios móveis que são livres para mover mas permanecem presos na membrana.

Em eletroquímica de membranas e no desenvolvimento de eletrodos seletivos a íons, o tipo, localização e mobilidade de espécies com carga dentro da membrana e na fase exterior são de fundamental importância. É a distribuição de cargas que proporciona

o aumento do campo elétrico e os potenciais de membrana resultantes. Entre as espécies com carga dentro da membrana estão os sítios móveis e fixos. Além desses, e mais importantes, são os íons de sinal oposto aos dos sítios, considerando somente um tipo de sinal para os sítios. Esses íons, chamados de **contra-íons**, estão presentes para satisfazer os requisitos de eletroneutralidade, e podem ser incorporados junto com a membrana durante sua construção ou serem colocados por processo de troca iônica. Em contraste com os íons dos sítios, os contra-íons não são restritos à membrana, mas podem ser transportados, em condições de difusão neutra, da solução circundante para o interior da membrana ou vice-versa. As membranas também contêm alguns íons móveis da solução circundante com a mesma carga que os sítios, esses íons são chamados de **co-íons** (13).

Dentro da membrana, a carga devido à presença do íon em análise é balanceada por um igual número de cargas opostas, as quais podem ser móveis ou não na fase polimérica. Se elas são móveis, é necessário que, tanto por razões termodinâmicas como cinéticas, elas fiquem restritas à membrana se o comportamento nernstiano tenha que ser encontrado.

O sistema da membrana, incluindo a membrana e as fases externas, deve ser no total eletricamente neutro.

No caso de membranas de PVC, a eletroneutralidade está de fato contida na membrana, exceto nas regiões de carga espacial nas interfaces água/membrana (3).

A resposta de eletrodos seletivos a íons tem sido atribuída a processos entre fases adjacentes. A formação do potencial do eletrodo é o resultado do acúmulo de cargas livres e não simplesmente consequência de um simples processo de troca iônica. PUNGOR (64) estudou como se formam as cargas livres medindo a capacidade de troca iônica de membranas de PVC contendo o carregador valinomicina. Foi verificado que somente 5 a 10% da concentração total do carregador está complexada e compensando os sítios aniônicos da membrana e 90 a 95% do ligante livre está disponível para reagir com o íon em análise numa reação de complexação resultando em excesso de carga na

superfície da membrana. Para assegurar a eletroneutralidade na região da superfície da membrana, os co-íons são excluídos e localizados na camada de solução imediatamente ao lado da membrana, ou seja, a quimiosorção do íon em análise é responsável pela separação de cargas (64).

Troca iônica é um tipo de processo que descreve a transferência reversível e irreversível de íons de uma fase para outra. Troca iônica inclui transferência de íons através de fases divisórias como uma interface entre um metal e um eletrólito, entre dois líquidos imiscíveis, entre um metal e um cristal iônico, entre um cristal iônico e uma solução de eletrólitos, assim como entre membranas de resina de troca iônica sólida ou líquida e as soluções circundantes. A ampla classificação de trocadores de íons incluem fases com íons em comum, assim como fases que inicialmente continham íons diferentes. Geralmente, o processo de troca iônica ocorre a corrente zero. Contudo, mesmo quando um fluxo de corrente passa, o processo de troca iônica continua a funcionar, embora perturbado.

Possivelmente, o ponto mais característico da troca iônica a corrente zero, seja o equilíbrio de dois ou mais íons de mesma carga ou mesmo sinal de carga entre duas fases. O fenômeno é muito amplo e é uma propriedade de todos os sistemas de eletrodos de membrana e eletrodos clássicos. Contudo, troca iônica envolvendo íons de mais de um tipo só é observado com resinas de troca iônica.

Troca iônica a corrente zero é caracterizada por fluxos opostos e iguais de íons através de uma fase divisória. A medida quantitativa da troca iônica é a corrente de troca ou a densidade do fluxo de troca, que é o número de moles de íons que fluem em direções opostas por segundo por centímetro quadrado. Troca iônica reversível e rápida corresponde a valores de densidade de corrente de troca maiores que $0,1 \text{ A/cm}^2$, enquanto que troca iônica irreversível lenta ou limitada cineticamente corresponde a valores menores que 10^{-2} A/cm^2 . A extensão da troca iônica é medida pela constante de equilíbrio do processo.

Troca iônica é um processo que desenvolve potenciais.

Considerando uma fase orgânica contendo sais de cálcio de um diéster do ácido fosfônico solúvel em solvente apolar. Os ânions estarão presos na fase orgânica. Os íons cálcio estarão livres para trocas com os íons cálcio na solução aquosa circundante. Em pouco tempo após o contato das fases, íons cálcio serão tanto perdidos para ou ganhos da fase aquosa, criando uma carga espacial e um potencial interfacial será desenvolvido, o qual aumentará positivamente com o aumento da atividade do íon cálcio na solução circundante.

Um potencial interfacial é produzido quando um único sal se divide entre duas fases líquidas imiscíveis, tais como, por exemplo, água/nitrobenzeno ou água/PVC. Quando membranas hidrofóbicas espessas estão em contato com eletrólitos aquosos, a partição de um sal resulta, no equilíbrio, em duas fases neutras, desde que a quantidade desse sal nas duas fases não seja excessivamente pequena. O potencial interfacial é determinado principalmente pelo coeficiente de partição relativo de um único íon. Para um dado sal, um íon será mais solúvel em uma dada fase que o outro íon. Devido a diferença no potencial químico iônico padrão para o cátion e o ânion em cada fase, um íon do sal tenderá a se distribuir através da interface em uma extensão relativa diferente do outro íon, ou seja, o íon com maior afinidade para a fase apolar terá uma concentração maior na fase com características apolares. Esse processo cria um desequilíbrio real de cargas nos dois lados de uma interface, com o resultado de que um campo e um potencial são gerados assim que o processo parar por si próprio e a diferença de potencial interfacial é estabelecida (13).

Potenciais aparecem nas interfaces em sistemas de membranas devido a diferença nos potenciais químicos de um único íon, mudanças bruscas de concentração e acúmulo de íons adsorvidos e dipolos alinhados. Os potenciais surgem devido à movimentação de cargas, as quais, por causa das diferenças de mobilidade entre os íons, criam campos locais e conseqüentemente potenciais. Todos esses efeitos podem ser interpretados em termos de potencial eletroquímico de espécies carregadas e esse processo é geralmente aplicável a todos os tipos de eletrodos, mesmo semicondutores e isolantes, nos quais cargas tenham sido injetadas.

Uma das questões mais intrigantes com relação a membranas seletivas a íons é a origem e natureza da sua seletividade potenciométrica, ou seja, sua habilidade em diferenciar potenciometricamente vários íons.

Desde a introdução de eletrodos seletivos com trocadores neutros, tem sido sempre difícil correlacionar o coeficiente de seletividade de um eletrodo seletivo a íon (K_{IJ}^{pot}) com as propriedades físico-químicas de uma membrana de PVC plastificada. Baseado em trabalhos teóricos relacionados a membranas bilaminares, foi deduzida uma correlação entre a seletividade potenciométrica e as constantes de estabilidade de diferentes complexos trocadores neutros, resultando a seguinte equação:

$$K_{M-I}^{pot} \sim \frac{\beta_{IS}^W}{\beta_{MS}^W}$$

onde **S** é o carregador neutro, β_{IS}^W é a constante de estabilidade do complexo íon interferente-carregador neutro na fase aquosa e β_{MS}^W é a constante de estabilidade do complexo íon em análise-carregador neutro na fase aquosa.

Isto significa que o coeficiente de seletividade potenciométrica pode ser expresso como a relação entre as constantes de estabilidade de **MS** e **IS** na fase aquosa. A verificação experimental dessa teoria se tornou um problema. Como a solubilidade desses complexos em água é muito baixa, é difícil encontrar uma técnica analítica que possibilite medições a fim de que as constantes de estabilidades β_{IS}^W e β_{MS}^W possam ser calculadas.

A fim de se tentar resolver esse problema foi adicionado um solvente orgânico, por exemplo etanol, à fase aquosa, com isso alguns resultados puderam ser obtidos. Concluiu-se que a relação das constantes de estabilidade encontradas têm boa correlação com a constante de seletividade potenciométrica. Os valores de K_{M-I}^{pot} podem ser relacionados à seletividade de transporte da membrana de PVC. Foi

provado em experimentos de eletrodialise que a razão do número de transportes de diferentes íons através da membrana está intimamente relacionada à seletividade potenciométrica (13).

A seletividade da membrana tem origem cinética. Foram realizados experimentos para provar que a transferência de íons através da interface membrana/água é cineticamente mais dificultada para os íons interferentes que para o íon que está sendo medido. Os resultados encontrados mostram uma boa correlação entre a seletividade potenciométrica e os parâmetros cinéticos medidos. HORVATH e HORVAI (37) encontraram evidências experimentais que mostram que o coeficiente de seletividade potenciométrica de um eletrodo seletivo a íons com membrana de PVC pode ser intimamente correlacionada com a seletividade do processo de troca iônica entre a membrana e a solução circundante. Essas membranas se comportam como trocadores de íons de baixa capacidade, a capacidade de troca iônica está entre 1×10^{-4} e 2×10^{-4} M. O processo de troca iônica é seletivo, ou seja, a membrana dá maior preferência ao íon em análise que ao íon interferente se suas concentrações na solução aquosa circundante são iguais.

Trabalhando com membranas de PVC seletivas a K^+ , NH_4^+ , Na^+ e Ca^{2+} e soluções aquosas contendo os marcadores radioativos ^{137}Cs e ^{85}Sr , aqueles autores observaram que o equilíbrio de troca iônica é alcançado dentro de toda a espessura da membrana e este processo demora de 1 a 2 dias. Contudo, em determinações de seletividade potenciométrica, o tempo de resposta é muito mais rápido, geralmente após segundos. Isso mostra que para a resposta potenciométrica pode ser suficiente que uma camada superficial muito fina da membrana atinja o equilíbrio de troca iônica. É interessante notar que, embora a troca iônica continue no interior da membrana após os primeiros segundos, as leituras de potencial permanecem constantes (13).

Esses resultados que correlacionam a seletividade potenciométrica com seletividade de troca iônica não estão necessariamente em contradição com o modelo cinético de seletividade. Nos casos onde a velocidade de troca iônica na interface está ela mesma em uma relação funcional com a constante de equilíbrio de troca

iônica, pode-se esperar uma relação entre diferenças de velocidade de troca e seletividade para diferentes íons. Uma relação mais próxima entre velocidade de reação e constante de equilíbrio de reações similares são frequentemente observadas em reações químicas. Se isso puder ser aplicado às membranas, parece ser mais apropriado relacionar a seletividade potenciométrica diretamente com a constante de equilíbrio de troca iônica do que com um parâmetro de velocidade de troca iônica. Esses experimentos com marcadores radioativos mostraram que a membrana de matriz de PVC plastificado é um trocador de íons de capacidade pequena. Os contaminantes hidrofílicos do PVC se comportam como sítios trocadores de cátions, provavelmente imobilizados em pequenas gotículas de água na membrana. O processo de troca iônica é facilitado pelo carregador neutro (37).

Membranas que funcionam como sensores de íons mostram um conjunto relativamente pequeno de características comuns, as quais são atributos indispensáveis tanto teórica como experimentalmente. São elas:

1 - uma distribuição de equilíbrio de íons em cada interface. Um íon é mais favorecido em cada uma das fases, membrana e solução circundante.

2 - troca iônica ocorre em uma ou mais interfaces para membranas que são permeáveis.

3 - a membrana transmite um campo tanto por espaço de cargas interno, no caso dos isolantes, como por condutividade iônica e eletrônica.

4 - uma interface pode envolver mais equilíbrio eletrônico que iônico.

5 - membranas altamente seletivas combinam troca iônica favorável e mobilidade (alta permeseletividade) favorável ao íon em questão.

6 - a combinação de informação iônica com potenciais eletrônicos não é restrita aos sistemas de contato ôhmicos, mas também podem envolver acoplamentos capacitivos (13).

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 - HIDROGENOFUMARATO DE TIAMULINA

Neste trabalho foram utilizadas amostras de hidrogenofumarato de tiamulina, gentilmente fornecidas pelas Indústrias Químicas Resende S. A.

3.1.2 - REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram de grau "para análise". As soluções foram preparadas em água destilada.

Solução aquosa de tetrafenilborato de sódio 0,010 mol/L

Solução aquosa de nitrato de sódio 0,10 mol/L

Solução aquosa de cloreto de sódio 0,10 mol/L

Solução aquosa de sulfato de sódio 0,10 mol/L

Solução aquosa de ácido acético 0,10 mol/L

Solução aquosa de hidróxido de sódio concentrado (10 mol/L)

Solução aquosa de ácido fosfotúngstico 0,010 mol/L

Soluções aquosas de hidrogenofumarato de tiamulina $1,0 \times 10^{-2}$, $1,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

Solução de carbonato de sódio 1,0% p/v em água.

Mistura hexano-acetato de etila 3:1 (v/v).

Solução de ácido tartárico 0,10% p/v em água.

Solução aquosa de hidróxido de sódio 1,0 Eq/L.

Tampão acetato pH 6,0:

acetato de amônio	320,0 g
ácido acético glacial	5,0 ml
água destilada q.s.p.	1000 ml

Tampão fosfato/hidróxido de sódio pH 7,0:

fosfato de potássio monobásico 0,10 mol/L	50,00 ml
hidróxido de sódio 0,10 mol/L	29,63 ml
água destilada q.s.p.	100,00 ml

Tampão fosfato/hidróxido de sódio pH 6,0:

fosfato de potássio monobásico 0,10 mol/L	50,00 ml
hidróxido de sódio 0,10 mol/L	5,70 ml
água destilada q.s.p.	100,00 ml

3.1.3 - PREPARAÇÕES VETERINÁRIAS

Foram utilizadas as seguintes formulações disponíveis comercialmente, gentilmente cedidas por Biochimie G. m. b. H.:

Formulação A

Para cada 1,00 ml:

hidrogenofumarato de tiamulina	0,1250 g
propil hidroxibenzoato	0,0001 g
metil hidroxibenzoato	0,0009 g
ácido cítrico monohidratado	0,0126 g
hidrogeno fosfato dissódico dihidratado	0,02031 g
etanol	0,10000 g
água purificada	0,76509 g

Aliquotas de 1,00 ml da Formulação A foram transferidas para 16 balões volumétricos de 100 ml. O volume de 8 dos balões foi completado com água destilada e o volume dos outros 8 foi completado com sulfato de sódio 0,10 M. A concentração teórica final de hidrogenofumarato de tiamulina obtida foi $2,05 \times 10^{-3}$ M.

Extração Segundo AOAC (49): 2,00 ml da Formulação A foram transferidos para erlenmeyer de 500 ml com tampa. Foram adicionados 250 ml de solução de carbonato de sódio 1,0% e o frasco foi mantido sob agitação, em agitador magnético, por 30 minutos. Foram adicionados 250 ml da mistura hexano-acetato de etila (3:1) v/v e mantido sob agitação por mais 60 minutos. Após a separação das fases, 10,00 ml da fase orgânica (fase superior) foram transferidos para funil de separação. Foram adicionados 30,0 ml de solução de ácido tartárico 0,10%. Após agitação, a fase inferior foi separada e alíquotas de 1,00 ml foram transferidas para balões volumétricos de 100 ml e diluídas segundo o mesmo procedimento anteriormente descrito.

Extração Segundo AOAC modificada: a extração foi feita segundo o procedimento acima descrito mas, ao invés de 250 ml de solução de carbonato de sódio 1,0%, foram utilizados 30,0 ml de hidróxido de sódio 1,0 N e 100 ml de água destilada.

Formulação B

Para cada 1,00 g:

grânulos de hidrogeno fumarato de tiamulina revestidos*	0,5625 g
dióxido de silício	0,0010 g
sacarose	0,4365 g

*1,0 g de grânulos revestidos contém:

hidrogenofumarato de tiamulina	0,8000 g
ácido sórbico	0,0002 g
gelatina	0,1998 g

Desta formulação foram pesadas duas tomadas de ensaio de 1,3551 g e transferidas para balões volumétricos de 100 ml. O volume de um dos balões foi completado com água destilada e o do outro balão completado com sulfato de sódio 0,10 M. De cada um desses balões, 8 alíquotas de 10,00 ml foram transferidas para 8 balões volumétricos de 100 ml e os volumes completados com os mesmos solventes. A concentração teórica final de hidrogenofumarato de tiamulina obtida foi de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

3.1.4 - EQUIPAMENTOS

Potenciômetro digital marca DIGIMED, modelo DMPH-3.

Potenciômetro analógico marca METROHM, modelo F 520.

Eletrodo de ponte eletrolítica marca INGOLD, modelo 373-90-W-TE-K7.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - PREPARAÇÃO DO PAR IÔNICO TETRAFENILBORATO DE TIAMULINA

A preparação do par iônico tetrafenilborato de tiamulina (Figura 7) foi baseada no método utilizado por COSOFRET & BUCK (29). Solução aquosa de hidrogenofumarato de tiamulina $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L foi adicionada à solução aquosa de tetrafenilborato de sódio $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L, sob agitação constante. Formou-se um precipitado branco que foi filtrado através de filtro G4, lavado com água destilada e seco em estufa a vácuo a 50°C por cerca de 6 horas.

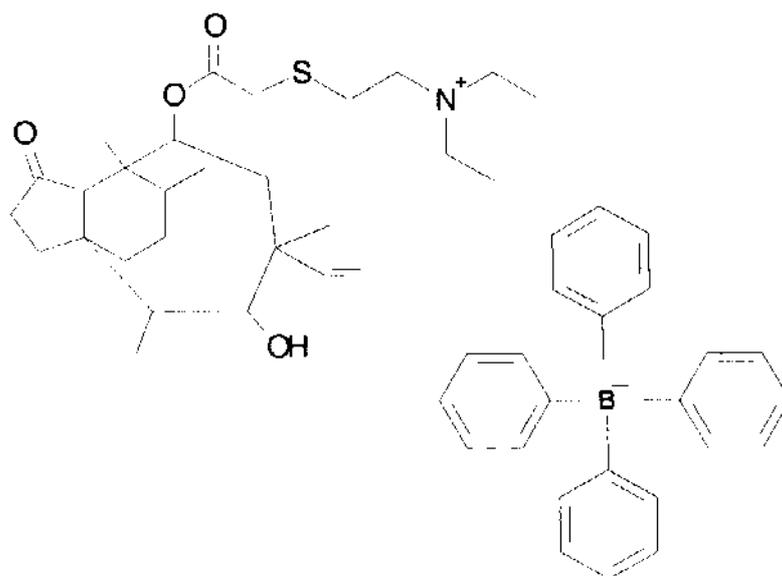


Figura 7 - Estrutura do tetrafenilborato de tiamulina.

3.2.2 - PREPARAÇÃO DO PAR IÔNICO FOSFOTUNGSTATO DE TIAMULINA

Este par iônico (Figura 8) foi preparado segundo método descrito por BOUKLOUZE e colaboradores (12), a partir da adição de solução aquosa de hidrogenofumarato de tiamulina $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L à solução aquosa de ácido fosfotúngstico $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L. Houve a formação de precipitado branco, que foi filtrado através de filtro G4, lavado com água e seco em estufa a vácuo a 50°C , por cerca de 6 horas.

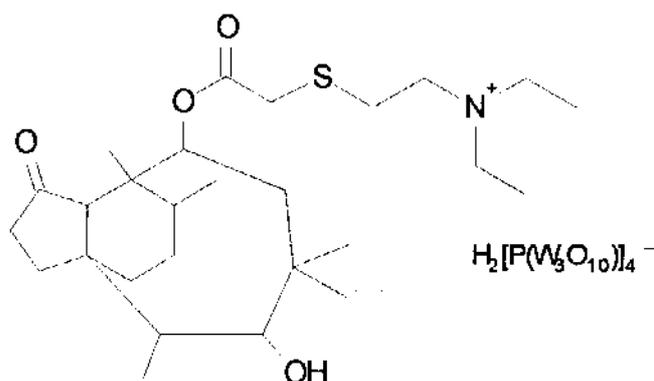


Figura 8 - Fosfotungstato de tiamulina.

3.2.3 - PREPARAÇÃO DO PAR IÔNICO ALIQUAT-TIAMULINA

A preparação do par iônico Aliquat-tiamulina foi feita de dois modos diferentes. No primeiro, 8,0 ml de dibutilftalato, 12,0 ml de Aliquat e 10,0 ml de solução aquosa de hidrogenofumarato de tiamulina $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L foram transferidos para béquer. Após homogeneização em agitador magnético por 10 minutos, esta mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi desprezada e a extração foi repetida por mais 9 vezes, sucessivamente.

No segundo modo de preparação (81), 8,0 ml de clorofórmio, 12,0 ml de Aliquat e 10,0 ml de solução aquosa de hidrogenofumarato de tiamulina $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L foram transferidos para béquer. Foi repetido o processo de extração anteriormente descrito, por 10 vezes consecutivas. O clorofórmio foi evaporado em banho-maria.

3.2.4 - PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS

MEMBRANA 1

tetrafenilborato de tiamulina	0,08 g
dibutilftalato	0,36 g
PVC	0,17 g
tetrahidrofurano	5,0 ml

Sua preparação e a montagem do eletrodo foram feitas segundo técnica descrita no item 3.2.5.

MEMBRANA 2

par Aliquat-tiamulina em dibutilfatalato	0,40 g
PVC	0,17 g
tetrahidrofurano	6,0 ml

Sua preparação e a montagem do eletrodo foram as mesmas da membrana 1.

MEMBRANA 3

tetrafenilborato de tiamulina	0,030 g
PVC	0,350 g
nitrobenzeno	1,0 ml
dioctilftalato	1,0 ml
tetrahidrofurano	4,0 ml

A mistura foi feita com auxílio de agitador magnético. Após completa homogeneização, a ponta de uma pipeta descartável foi mergulhada cerca de 2 cm nesta mistura, deixada escorrer e seca ao ar por 24 horas. O eletrodo foi montado como descrito em 3.2.6

Todas as membranas descritas a seguir foram montadas como a membrana 3, o mesmo acontecendo com os eletrodos.

MEMBRANA 4

fosfotungstato de tiamulina	0,030 g
PVC	0,350 g
nitrobenzeno	1,0 ml
dioctilftalato	1,0 ml
tetrahidrofurano	4,0 ml

MEMBRANA 5

par iônico Aliquat-tiamulina (clorofórmio)	0,40 g
PVC	0,350 g
nitrobenzeno	1,0 ml
dioctilftalato	1,0 ml
tetrahidrofurano	4,0 ml

MEMBRANA 6

Esta membrana foi preparada com a mesma composição da membrana 5 mas utilizando o par iônico Aliquat-tiamulina em dibutilftalato.

MEMBRANA 7

fosfotungstato de tiamulina	0,08 g
dibutilftalato	0,36 g
PVC	0,17 g
tetrahidrofurano	5,0 ml

MEMBRANA 8

fosfotungstato de tiamulina	0,08 g
dibutilftalato	0,36 g
PVC	0,35 g
tetrahidrofurano	4,0 ml

MEMBRANA 9

tetrafenilborato de tiamulina	0,08 g
dibutilftalato	0,36 g
PVC	0,35 g
tetrahidrofurano	4,0 ml

MEMBRANA 10

fosfotungstato de tiamulina	0,04 g
éter de 2-nitrofenil octila	0,64 g
PVC	0,32 g
tetrahidrofurano	4,0 ml

MEMBRANA 11

tetrafenilborato de tiamulina	0,04 g
éter de 2-nitrofenil octila	0,64 g
PVC	0,32 g
tetrahidrofurano	4,0 ml

MEMBRANA 12

acetato de celuloose	0,20 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,20 g
acetona	5,0 ml
nitrobenzeno	0,1 ml

MEMBRANA 13

acetato de celuloze	0,20 g
fosfotungstato de tiamulina	0,20 g
acetona	5,0 ml
nitrobenzeno	0,1 ml

MEMBRANA 14

acetato de celuloze	0,40 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,20 g
acetona	6,0 ml
nitrobenzeno	0,1 ml

MEMBRANA 15

acetato de celuloze	0,40 g
fosfotungstato de tiamulina	0,20 g
acetona	6,0 ml
nitrobenzeno	0,1 ml

MEMBRANA 16

acetato de celuloze	0,20 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,40 g
acetona	5,0 ml
nitrobenzeno	0,1 ml

MEMBRANA 17

acetato de celuloze	0,20 g
fosfotungstato de tiamulina	0,40 g
acetona	5,0 ml
nitrobenzeno	0,1 ml

MEMBRANA 18

Nafion 1% em etanol absoluto	5,0 ml
fosfotungstato de tiamulina	0,08 g

MEMBRANA 19

Nafion 1% em etanol absoluto	5,0 ml
tetrafenilborato de tiamulina	0,08 g

MEMBRANA 20

Nafion 1% em etanol absoluto	5,0 ml
hidrogenofumarato de tiamulina	0,08 g

MEMBRANA 21

Nafion 2% em etanol 93%	5,0 ml
hidrogenofumarato de tiamulina	0,04 g

MEMBRANA 22

Nafion 2% em etanol 93%	5,0 ml
fosfotungstato de tiamulina	0,04 g

MEMBRANA 23

Nafion 2% em etanol 93%	5,0 ml
tetrafenilborato de tiamulina	0,04 g

MEMBRANA 24

copolímero etileno/acetato de vinila	0,350 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,085 g
clorofórmio	6,0 ml

MEMBRANA 25

copolímero etileno/acetato de vinila	0,350 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,085 g
clorofórmio	4,0 ml
diociltalato	1,0 ml
nitrobenzeno	1,0 ml

MEMBRANA 26

copolímero etileno/acetato de vinila	0,350 g
fosfotungstato de tiamulina	0,085 g
clorofórmio	6,0 ml

MEMBRANA 27

copolímero etileno/acetato de vinila	0,350 g
fosfotungstato de tiamulina	0,085 g
clorofórmio	4,0 ml
diocetilftalato	1,0 ml
nitrobenzeno	1,0 ml

MEMBRANA 28

copolímero etileno/acetato de vinila	0,350 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,085 g
éter de 2-nitrofenil octila	0,640 g
clorofórmio	5,0 ml

MEMBRANA 29

copolímero etileno/acetato de vinila	0,350 g
fosfotungstato de tiamulina	0,085 g
éter de 2-nitrofenil octila	0,640 g
clorofórmio	5,0 ml

MEMBRANA 30

copolímero etileno/acetato de vinila	0,35 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,08 g
dibutilftalato	0,36 g
clorofórmio	6,0 ml

MEMBRANA 31

copolímero etileno/acetato de vinila	0,35 g
fosfotungstato de tiamulina	0,08 g
dibutilftalato	0,36 g
clorofórmio	6,0 ml

MEMBRANA 32

1ª Camada

acetato de celulose	0,40 g
fosfotungstato de tiamulina	0,10 g
acetona	5,0 ml

2ª Camada

Nafion 2% em etanol 93%	5,0 ml
fosfotungstato de tiamulina	0,04 g

MEMBRANA 33

1ª Camada

acetato de celulose	0,40 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,10 g
acetona	5,0 ml

2ª Camada

Nafion 2% em etanol 93%	5,0 ml
tetrafenilborato de tiamulina	0,04 g

MEMBRANA 34

1ª Camada

acetato de celulose	0,40 g
fosfotungstato de tiamulina	0,10 g
acetona	5,0 ml

2ª Camada

Nafion 2% em isopropanol	5,0 ml
fosfotungstato de tiamulina	0,04 g

MEMBRANA 35

1ª Camada

acetato de celulose	0,40 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,10 g
acetona	5,0 ml

2ª Camada

Nafion 2% em isopropanol	5,0 ml
tetrafenilborato de tiamulina	0,04 g

MEMBRANA 36

acetato de celulose	0,20 g
acetona	5,0 ml

sobre eletrodo de pasta de grafite

MEMBRANA 37

acetato de celulose	0,20 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,08 g
acetona	5,0 ml

sobre eletrodo de pasta de grafite

MEMBRANA 38

acetato de celulose	0,20 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,04 g
acetona	5,0 ml

sobre eletrodo de pasta de grafite

MEMBRANA 39

acetato de celulose	0,20 g
tetrafenilborato de tiamulina	0,04 g
acetona	5,0 ml
nitrobenzeno	0,1 ml

sobre eletrodo de pasta de grafite

MEMBRANA 40

Nafion 2% em etanol 93%	5,0 ml
-------------------------	--------

sobre eletrodo de pasta de grafite

MEMBRANA 41

Nafion 2% em etanol 93%	5,0 ml
tetrafenilborato de tiamulina	0,04 g
sobre eletrodo de pasta de grafite	

MEMBRANA 42

tetrafenilborato de tiamulina	0,08 g
diocetilfenilfosfonato	0,64 g
PVC	0,32 g
tetrahidrofurano	5,0 ml

MEMBRANA 43

fosfotungstato de tiamulina	0,04 g
diocetilfenilfosfonato	0,64 g
PVC	0,32 g
tetrahidrofurano	5,0 ml

3.2.5 - MONTAGEM DO ELETRODO

a - Montagem Convencional

A membrana foi preparada pela evaporação controlada do solvente segundo técnica descrita por MOODY & THOMAS (54). A solução de PVC e demais componentes em tetrahidrofurano foi colocada em um anel de vidro sobre uma placa de vidro (Figura 9a). O solvente foi então evaporado à temperatura ambiente sob condições controladas (Figura 9b) por alguns dias. Discos de diâmetro apropriado foram cortados da membrana obtida e colados na ponta de um tubo de PVC, utilizando solução de PVC em tetrahidrofurano como adesivo (Figura 10). O outro lado do tubo de PVC foi então conectado ao tubo de vidro que é o corpo do eletrodo. O eletrodo seletivo após sua montagem é ilustrado na Figura 11.

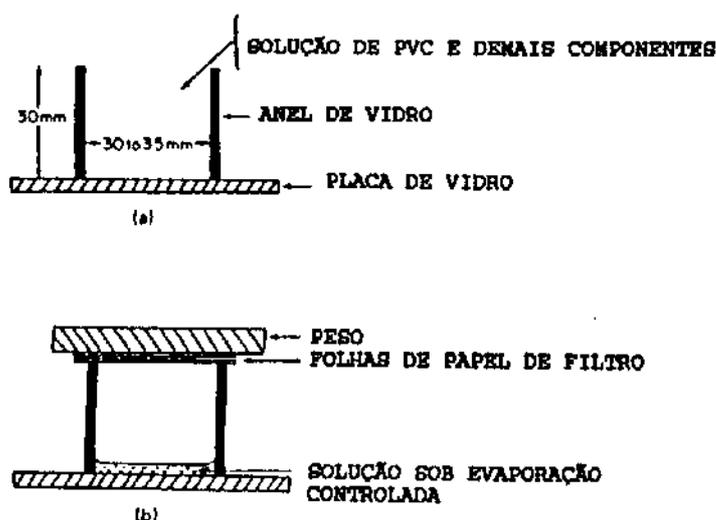


Figura 9 - Formação da membrana de PVC.

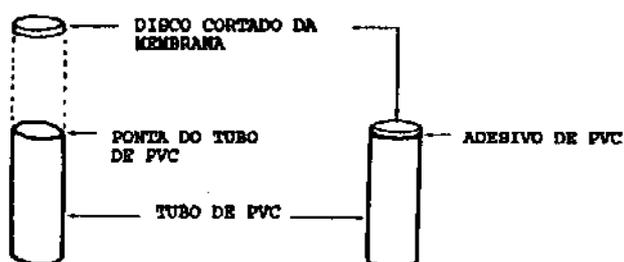


Figura 10 - Montagem da membrana de PVC.

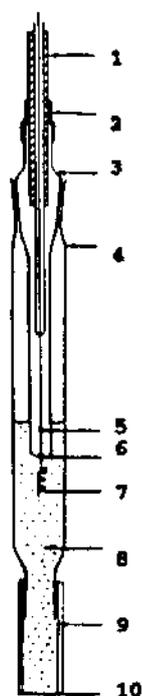


Figura 11 - Diagrama esquemático de eletrodo seletivo com membrana de PVC segundo MOODY & THOMAS. (1) cabo coaxial, (2) anel de borracha, (3) cone de vidro, (4) tubo de vidro, (5) solda metálica, (6) Araldite, (7) fio Ag/AgCl, (8) solução interna, (9) tubo de PVC, (10) membrana de PVC.

Como solução interna de todos os eletrodos montados, foi empregada a mistura de cloreto de sódio $1,0 \times 10^{-1}$ mol/L e hidrogenofumarato de tiamulina $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

Todos os eletrodos foram condicionados em solução de hidrogenofumarato de tiamulina $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L por 24 horas e armazenados nesta mesma solução.

Todas as determinações feitas neste trabalho foram realizadas a 25°C .

b - Montagem Utilizando Ponta de Pipeta Descartável

Esta montagem do eletrodo seguiu a técnica descrita por EL-JAMMAL e colaboradores (32). Seu esquema simplificado é mostrado na Figura 12.

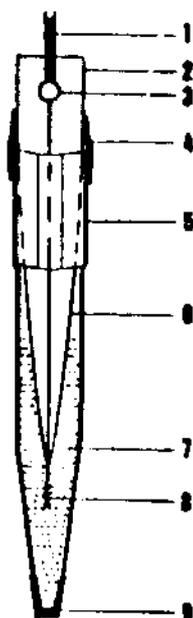


Figura 12 - Diagrama esquemático do eletrodo segundo EL-JAMMAL. (1) cabo coaxial, (2) tubo de vidro, (3) junção do cabo, (4) Parafilm, (5) ponta de micropipeta descartável, (6) tubo de vidro, (7) solução interna, (8) fio de Ag/AgCl, (9) membrana plástica.

c - Montagem do Eletrodo de Pasta de Grafite

O eletrodo foi construído segundo técnica descrita por LIMA & MACHADO (46-47), utilizando-se um corpo plástico com uma camada de grafite numa das pontas, na qual foi fixado um cabo elétrico coaxial. A camada de grafite, depois de seca, foi desgastada de modo a deixar uma cavidade cilíndrica de cerca de 0,5 mm de profundidade e de fundo plano. Nesta cavidade foi depositada a solução da membrana (Figura 13), que foi evaporada ao ar por 24 horas.

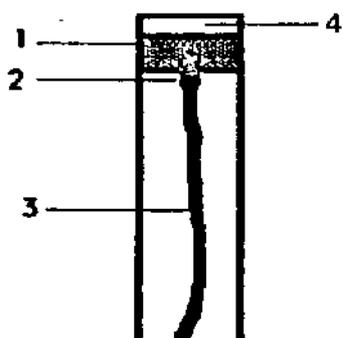


Figura 13 - Diagrama do eletrodo de pasta de grafite. (1) pasta de grafite, (2) contato elétrico, (3) cabo elétrico e (4) membrana seletiva.

3.2.6 - EFEITO DO pH

O efeito do pH foi investigado utilizando-se soluções aquosas de hidrogenofumarato de tiamulina $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L preparadas com a mistura hidróxido de sódio-ácido acético nos diferentes valores de pH. O pH foi ajustado em potenciômetro, através da adição de pequenos volumes de solução de hidróxido de sódio concentrado (10 mol/L) à solução de ácido acético 0,10 mol/L, para se obter soluções de pH 2 até 12.

3.2.7 - EFEITO DO MEIO UTILIZADO NO PREPARO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NAS MEDIÇÕES

O efeito do meio foi estudado realizando-se as medições utilizando água destilada, sulfato de sódio 0,10 mol/L, tampão acetato pH 6,0, tampão fosfato 0,1 mol/L/hidróxido de sódio 0,10 mol/L pH 6,0 e 7,0.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em 1967, foi construído o primeiro eletrodo seletivo com membrana líquida. Este eletrodo foi utilizado para a medida da atividade do íon cálcio e tinha como material eletroativo didecilsulfato de cálcio dissolvido em dioctilfenilfosfonato. Esse eletrodo gerou imediato interesse no campo da pesquisa biomédica porque permitia a medição da atividade dos íons cálcio diretamente no soro sanguíneo (8,54). Contudo, esse eletrodo de membrana líquida era afetado pelo seu tempo de vida útil curto e pela indefinição da interface entre a membrana e a solução em análise (72). O grande interesse neste eletrodo foi incentivado pela disponibilidade comercial de um modelo refinado mas com eficiência similar, com a membrana contendo o sensor tenciltrifluoroacetona e o plastificante tributilfosfato impregnados em PVC.

O considerável interesse nas possibilidades que esse eletrodo abriu impulsionou o desenvolvimento de eletrodos de membrana líquida trocadora de íons, levando ao aparecimento de uma grande gama de eletrodos de membrana com matriz de PVC. Essas membranas baseavam-se no simples princípio de dissolver PVC e a solução do trocador iônico em tetrahydrofurano, removendo o solvente por evaporação controlada à temperatura ambiente.

Membranas com matriz de PVC possuem comportamento similar ao das membranas líquidas mas com vida útil maior e utilizam menor quantidade de ionóforo (54), além de oferecerem boa resistência mecânica aos efeitos de pressão e agitação e, embora outros materiais para a matriz venham sendo estudados, PVC continua sendo o suporte mais comumente utilizado (72).

Os eletrodos de membrana com matriz de PVC são geralmente montados segundo os princípios dos eletrodos de vidro convencionais (Figura 11, p. 60).

As membranas são preparadas pela incorporação do trocador iônico e do plastificante no PVC com a ajuda de um solvente como tetrahydrofurano ou ciclohexanona. O solvente é evaporado, originando

uma membrana flexível com seus componentes presos em uma matriz de PVC (Figura 9, p. 59). O principal foco de desenvolvimento na área de eletrodos de membrana nos últimos 20 anos tem sido a pesquisa de melhores sistemas de membranas líquidas. Isso tem sido estimulado pela conveniência das matrizes de PVC em conter e suportar membranas líquidas (72).

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos com os eletrodos construídos neste trabalho.

Como a maioria dos eletrodos seletivos para fármacos utiliza membranas de PVC, este polímero foi o primeiro a ser utilizado na preparação de membranas seletivas à tiamulina.

As membranas 1, 2 e 3 foram preparadas com a montagem do eletrodo segundo MOODY & THOMAS (54).

Foi observado que utilizando esse processo, o tempo de evaporação do solvente, que era de cerca de 3 dias quando se utilizava dibutilftalato como plastificante, aumentava para mais de uma semana no caso da mistura nitrobenzeno/dioctilftalato. A fim de otimizar a preparação das membranas, passou-se a se utilizar a montagem do eletrodo segundo EL-JAMMAL e colaboradores (32). Nesta preparação, uma ponta de pipeta descartável é mergulhada na solução PVC/plastificante/ionóforo/solvente e deixada evaporar à temperatura ambiente. Após 24 horas de secagem, a membrana já pode ser utilizada, independente do plastificante empregado. Para efeitos de padronização, todas as membranas foram utilizadas após 24 horas da sua preparação.

Para um eletrodo que responde seletivamente ao íon i de atividade a_i e carga z , na presença de um íon interferente j de atividade a_j e carga x , o potencial da célula E é obtido pela equação de Nicolsky, derivada da equação de Nernst (Eq. 11, página 18)

O termo RT/zF é chamado de coeficiente angular da curva de calibração, cujo valor ideal é $59/z$ mV a 25°C (23,50,56). Para a determinação das retas de calibração foram empregadas soluções de

hidrogenofumarato de tiamulina nas concentrações de $1,0 \times 10^{-2}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L. Solução contendo $1,0 \times 10^{-1}$ mol/L de hidrogenofumarato de tiamulina não foi utilizada, porque nesta concentração este fármaco é praticamente insolúvel em água. Os coeficientes angulares das retas de calibração obtidos com os eletrodos montados neste trabalho estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades dos eletrodos seletivos à tiamulina

MEMBRANA	FILME	PLASTIFICANTE	PAR IÔNICO	LIMITE NERNSTIANO (mol/L)	LIMITE DE DETECÇÃO (mol/L)	COEFICIENTE ANGULAR (mV/década de concentração)
1*	PVC	dibutilftalato	TFB	$1,0 \times 10^{-5}$	$7,9 \times 10^{-6}$	57,2
1**	PVC	dibutilftalato	TFB	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	56,8
2	PVC	dibutilftalato	Aliquat	ND	ND	ND
3*	PVC	nitrobenzeno/dioctilftalato	TFB	$1,0 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-6}$	55,7
3**	PVC	nitrobenzeno/dioctilftalato	TFB	$1,4 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$	56,8
*	PVC	nitrobenzeno/dioctilftalato	fosfotungstato	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	58,9
4**	PVC	nitrobenzeno/dioctilftalato	fosfotungstato	$1,0 \times 10^{-5}$	$8,9 \times 10^{-6}$	54,8
5*	PVC	nitrobenzeno/dioctilftalato	Aliquat	ND	ND	ND
6*	PVC	dibutilftalato	Aliquat	ND	ND	ND
7*	PVC	dibutilftalato	fosfotungstato	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	57,8
7**	PVC	dibutilftalato	fosfotungstato	$1,0 \times 10^{-5}$	$6,3 \times 10^{-6}$	55,3
8*	PVC	dibutilftalato	fosfotungstato	$2,5 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$	58,7
9*	PVC	dibutilftalato	TFB	$3,2 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-5}$	57,2
9**	PVC	dibutilftalato	TFB	$6,3 \times 10^{-5}$	$6,3 \times 10^{-5}$	56,9

ND = não foi possível determinar

* determinações realizadas em água destilada

** determinações realizadas em sulfato de sódio $0,10 \text{ mol/L}$

TFB = tetrafenilborato de tiamulina

Tabela 1 cont. - Propriedades dos eletrodos seletivos à tiamulina

MEMBRANA	FILME	PLASTIFICANTES	PAR IÔNICO	LIMITE NERNSTIANO (mol/L)	LIMITE DE DETECÇÃO (mol/L)	COEFICIENTE ANGULAR (mV/década de concentração)
10*	PVC	nitrofeniloctila	fosfotungstato	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	60,6
10**	PVC	nitrofeniloctila	fosfotungstato	$1,6 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	60,1
11*	PVC	nitrofeniloctila	TFB	$1,0 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-6}$	57,9
11**	PVC	nitrofeniloctila	TFB	$3,9 \times 10^{-6}$	$3,9 \times 10^{-6}$	57,6
12*	celulose	nitrobenzeno	TFB	ND	ND	ND
12**	celulose	nitrobenzeno	TFB	ND	ND	ND
12***	celulose	nitrobenzeno	TFB	$1,0 \times 10^{-5}$	$6,3 \times 10^{-5}$	55,0
13*		nitrobenzeno	fosfotungstato	ND	ND	ND
13**	celulose	nitrobenzeno	fosfotungstato	ND	ND	ND
14*	celulose	nitrobenzeno	TFB	ND	ND	ND
14**	celulose	nitrobenzeno	TFB	ND	ND	ND
15*	celulose	nitrobenzeno	fosfotungstato	ND	ND	ND
15**	celulose	nitrobenzeno	fosfotungstato	ND	ND	ND
16*	celulose	nitrobenzeno	TFB	ND	ND	ND
16**	celulose	nitrobenzeno	TFB	ND	ND	ND
16***	celulose	nitrobenzeno	TFB	$1,0 \times 10^{-5}$	$7,1 \times 10^{-6}$	44,3

ND = não foi possível determinar

* determinações realizadas em água destilada

** determinações realizadas em sulfato de sódio 0,10 mol/L

*** determinações realizadas com solução interna: sol. de TFB de tiamulina em nitrobenzeno/KCl 0,1 mol/L

TFB = tetrafenilborato de tiamulina

HfU = hidrogenofumarato de tiamulina

Tabela 1 cont. - Propriedades dos eletrodos seletivos à tiamulina

MEMBRANA	FILME	PLASTIFICANTE	PAR IÔNICO	LIMITE NERNSTIANO (mol/L)	LIMITE DE DETECÇÃO (mol/L)	COEFICIENTE ANGULAR (mV/década de concentração)
17*	celulose	nitrobenzeno	fosfotungstato	ND	ND	ND
17**	celulose	nitrobenzeno	fosfotungstato	ND	ND	ND
18*	Nafion	-	fosfotungstato	ND	ND	ND
19*	Nafion	-	TFB	ND	ND	ND
20*	Nafion	-	HFU	ND	ND	ND
21*	Nafion	-	HFU	ND	ND	ND
22*	Nafion	-	fosfotungstato	ND	ND	ND
23*	Nafion	-	TFB	ND	ND	ND
24*	EVA	-	TFB	$1,0 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-6}$	35,5
25*	EVA	nitrobenzeno/ dioctilftalato	TFB	$1,9 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	52,9
26*	EVA	-	fosfotungstato	ND	ND	ND
27*	EVA	nitrobenzeno/ dioctilftalto	fosfotungstato	$4,5 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-5}$	61,9
28*	EVA	nitrofeniloctila	TFB	$1,0 \times 10^{-5}$	$7,9 \times 10^{-6}$	51,3
29*	EVA	nitrofeniloctila	fosfotungstato	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	58,9

ND = não foi possível determinar

* determinações realizadas em água destilada

** determinações realizadas em sulfato de sódio 0,10 mol/L

*** determinações realizadas com solução interna: sol. de TFB de tiamulina em nitrobenzeno/KCl 0,10 mol/L

TFB = tetrafenilborato de tiamulina

HFU = hidrogenofumarato de tiamulina

EVA = copolímero etileno/acetato de vinila

Tabela 1 cont. - Propriedades dos eletrodos seletivos à tiamulina

MEMBRANA	FILME	PLASTIFICANTE	PAR IÔNICO	LIMITE NERNSTIANO (mol/L)	LIMITE DE DETECÇÃO (mol/L)	COEFICIENTE ANGULAR (mV/década de concentração)
30*	EVA	dibutilftalato	TFB	$1,0 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-6}$	57,6
31*	EVA	dibutilftalato	fosfotungstato	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	61,8
32*	Nafion/ celulose	-	fosfotungstato	ND	ND	ND
33*	Nafion/ celulose	-	TFB	ND	ND	ND
34*	Nafion/ celulose	-	fosfotungstato	ND	ND	ND
35*	Nafion/ celulose	-	TFB	ND	ND	ND
36*	celulose ⁺	-	-	ND	ND	ND
37*	celulose ⁺	-	TFB	ND	ND	ND
38*	celulose ⁺	-	TFB	ND	ND	ND
39*	celulose ⁻	nitrobenzeno	TFB	ND	ND	ND
40*	Nafion ⁺	-	-	ND	ND	ND
41*	Nafion ⁺	-	TFB	ND	ND	ND
42	PVC	dioctilfenilfosfonato	TFB	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-5}$	51,6
43	PVC	dioctilfenilfosfonato	fosfotungstato	$7,9 \times 10^{-4}$	$7,9 \times 10^{-4}$	52,4

ND = não foi possível determinar
 * determinações realizadas em água destilada
 TFB = tetrafenilborato de tiamulina
 - sobre eletrodo de grafite

Embora eletrodos respondam à atividade iônica, na prática os resultados são geralmente expressos em concentração (25). A atividade iônica está relacionada à concentração $[i]$, pelo coeficiente de atividade, γ_i :

$$a_i = \gamma_i [i]$$

O termo γ_i é dependente da força iônica da solução (62). Os valores de atividade são mais ou menos proporcionais à concentração em condições de força iônica constante. Para soluções do íon em análise, com concentração menor que 10^{-4} mol/L, o coeficiente de atividade é próximo à unidade e diferenças entre atividade e concentração podem ser ignoradas. Contudo, para concentrações maiores que 10^{-4} mol/L, o coeficiente de atividade diminui e essas diferenças se tornam progressivamente maiores. Assim, uma reta de calibração, obtida de concentrações do padrão preparadas por uma série de diluições, apresentará uma ligeira curvatura nas concentrações maiores. Quando as soluções padrão são tratadas pela adição de uma alta concentração de um eletrólito inerte, que produzirá uma força iônica constante, o coeficiente de atividade é estabilizado e uma linha reta será obtida no gráfico de calibração, permitindo que concentrações sejam medidas diretamente (8). Por essa razão, quando fazendo medições com eletrodos seletivos, deve-se adicionar um eletrólito inerte, chamado de ajustador da força iônica a todas as soluções do padrão e da amostra (25,62).

Geralmente, as amostras têm baixa força iônica e as concentrações determinadas também são baixas, menores que 10^{-2} mol/L. Nesses casos é recomendável limitar a concentração do eletrólito ajustador da força iônica a cerca de 10^{-1} mol/L, a fim de minimizar os problemas com o potencial de junção líquida e com a diluição da amostra (8,14).

O primeiro eletrólito ajustador da força iônica utilizado neste trabalho foi NaNO_3 0,10 mol/L. Os coeficientes angulares obtidos não foram próximos aos esperados cerca de 59 mV, mas utilizando-se Na_2SO_4 0,10 mol/L conseguiu-se valores ao redor do teórico determinado pela equação de Nernst. Ficou assim, evidenciado

que o íon nitrato interfere nas determinações com eletrodos seletivos à tiamulina.

A fim de se verificar a influência do pH, medições do potencial do eletrodo montado com as membranas 3 e 4, cuja composição era PVC, nitrobenzeno, dioctilftalato e o par iônico tetrafenilborato de tiamulina para a membrana 3 e fosfotungstato de tiamulina para a membrana 4, foram realizadas utilizando-se soluções de hidrogenofumarato de tiamulina $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L preparadas com a mistura de hidróxido de sódio/ácido acético com valores de pH ajustados de 2 até 12.

Os resultados obtidos com as membranas 3 e 4 podem ser vistos na Figura 14. A partir de pH 8 começa a ocorrer a precipitação de tiamulina base, impossibilitando as determinações. A diminuição gradual no potencial observado a valores de pH altos é devido a diminuição na concentração da forma protonada de tiamulina. Como de pH 2 até próximo ao pH 8, as variações nos potenciais medidos não são significativas, decidiu-se trabalhar na faixa de pH neutro por facilitar a execução das medições que podem ser feitas diretamente em água destilada ou Na_2SO_4 sem necessidade de ajuste do pH.

Uma vez estabelecida a faixa ideal de pH, foi estudado o efeito do meio utilizado no preparo das soluções nos potenciais medidos. Tampão acetato promove o aparecimento de um precipitado branco, cuja natureza não foi investigada. Por esse motivo esse tampão não foi utilizado como solvente nas medições. Os resultados obtidos com a membrana 3 podem ser vistos na Figura 15 e os da membrana 4 na Figura 16. Nos dois casos, o limite de detecção foi menor utilizando-se água destilada, $4,5 \times 10^{-6}$ mol/L para a membrana 3 e $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L para a membrana 4. Mas as leituras de potencial se estabilizaram mais rapidamente com a utilização de Na_2SO_4 0,10 mol/L, o que é importante quando se analisa formulações veterinárias, onde os excipientes podem influir e as quantidades a serem analisadas são muito pequenas.

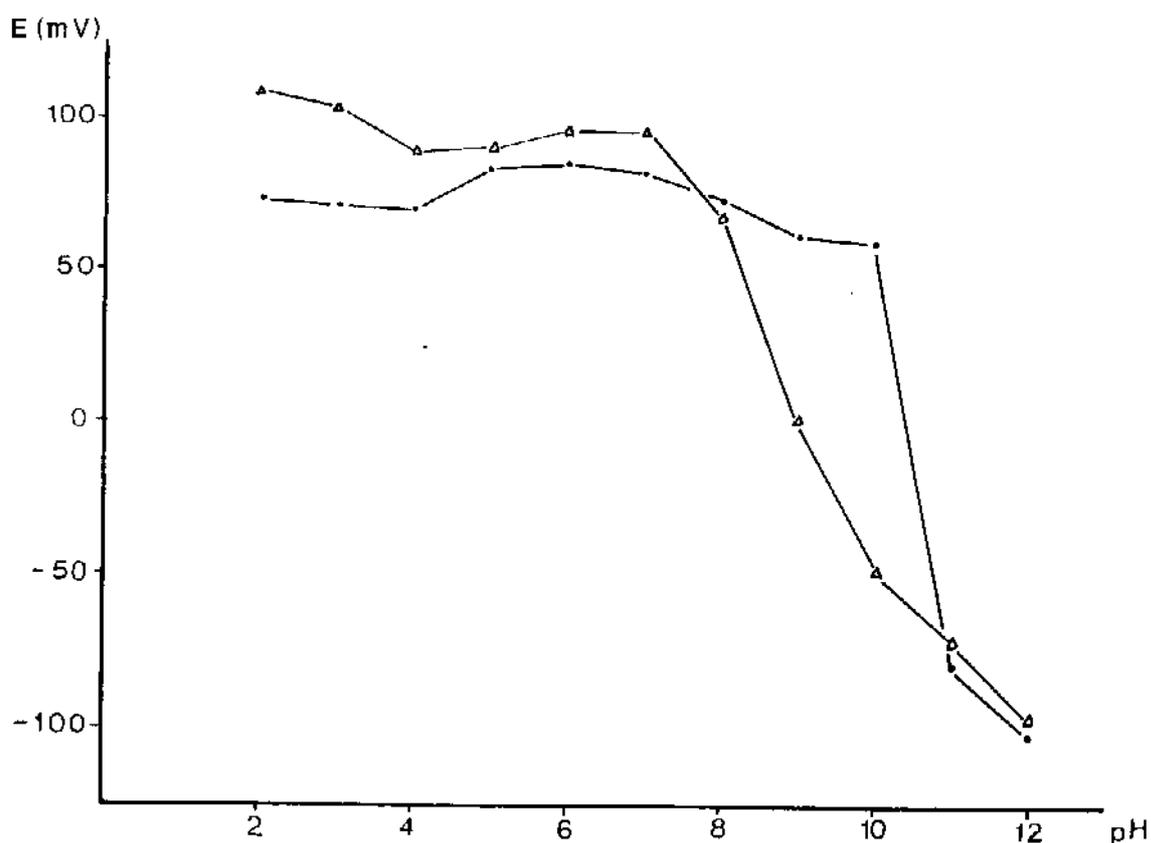


Figura 14 - Influência do pH no potencial medido utilizando soluções de hidrogenofumarato de tiamulina $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L preparadas com a mistura hidróxido de sódio concentrado (10 mol/L)/ácido acético 0,10 mol/L com pH ajustados de 2 até 12. (—•—•—) eletrodo montado com **membrana 3** (tetrafenilborato de tiamulina 0,03 g, PVC 0,35 g, nitrobenzeno 1,0 ml, dioctilftalato 1,0 ml, tetrahidrofurano 4,0 ml). (—Δ—Δ—) eletrodo montado com **membrana 4** (fosfotungstato de tiamulina 0,03 g, PVC 0,35 g, nitrobenzeno 1,0 ml, dioctilftalato 1,0 ml, tetrahidrofurano 4,0 ml).

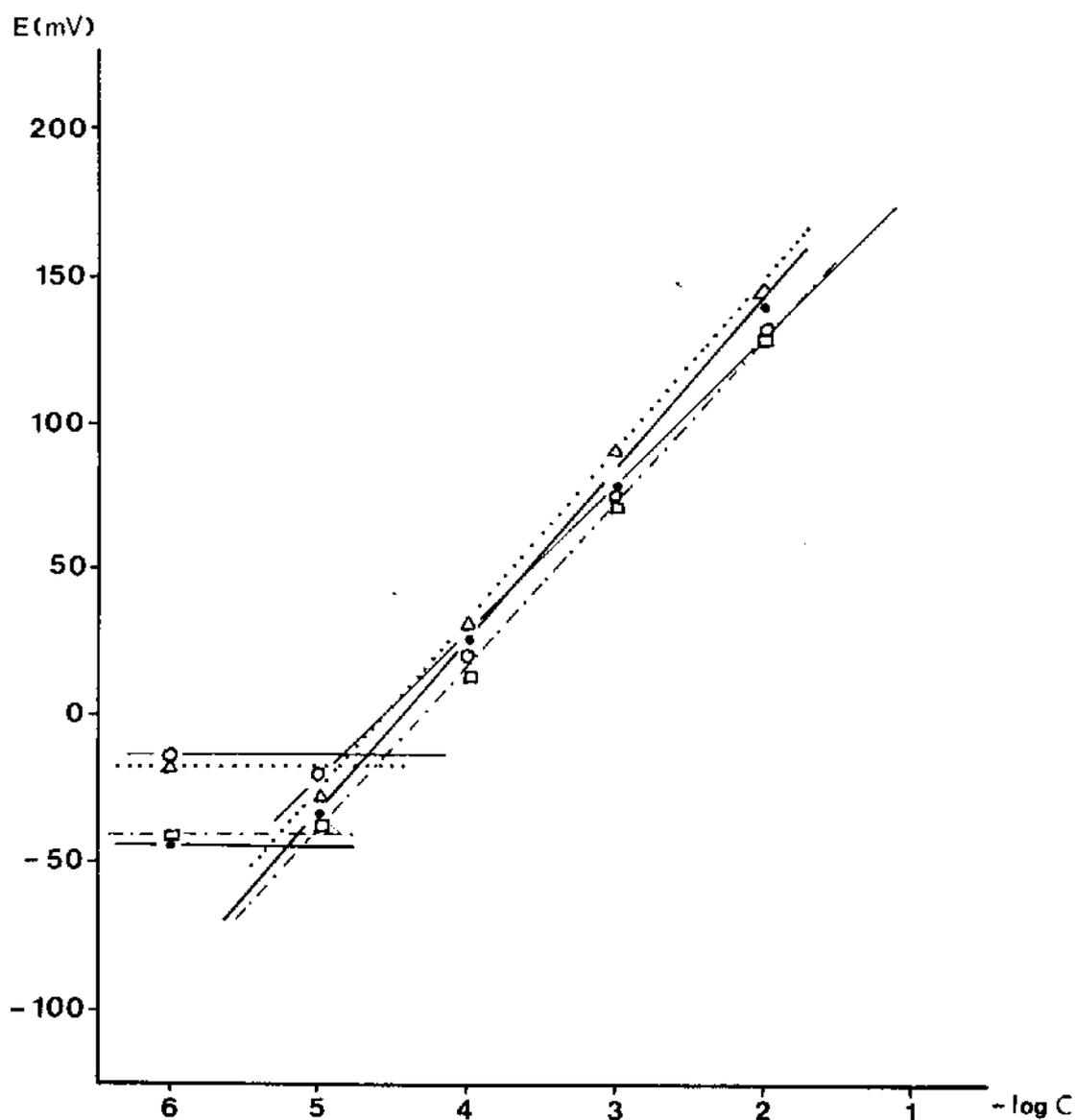


Figura 15 - Efeito do meio utilizado para o preparo das soluções nas curvas de calibração da **membrana 3** (tetrafenilborato de tiamulina 0,03 g, PVC 0,35 g, nitrobenzeno 1,0 ml, dioctilftalato 1,0 ml, tetrahidrofurano 4,0 ml) utilizando soluções de hidrogenofumarato de tiamulina preparadas em (—•—) água destilada; (...Δ...) sulfato de sódio 0,10 mol/L; (-□-) tampão fosfato/hidróxido de sódio pH 7,0 e (—○—) tampão fosfato/hidróxido de sódio pH 6,0, nas concentrações $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

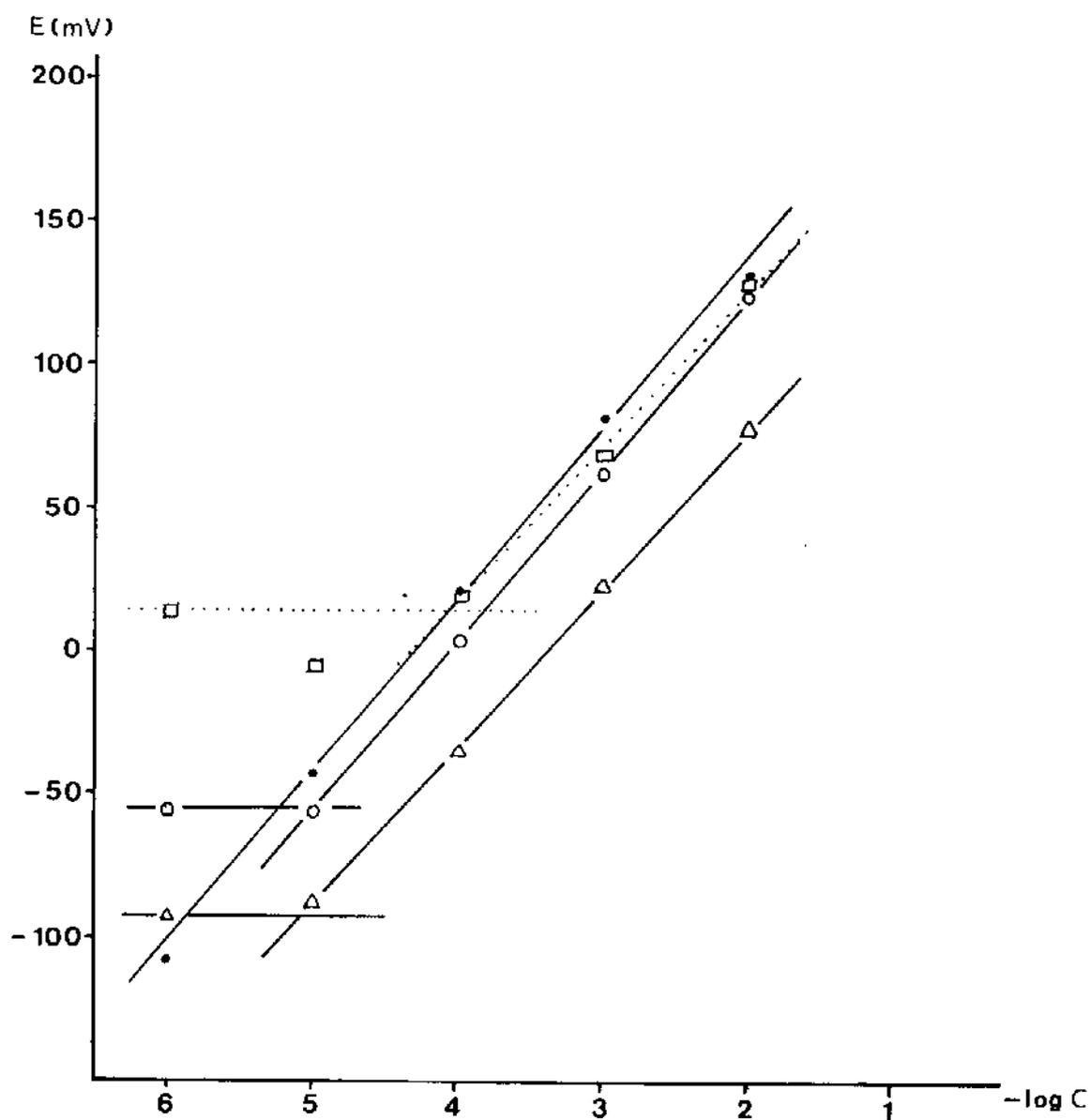


Figura 16 - Efeito do meio utilizado para o preparo das soluções nas curvas de calibração da **membrana 4** (fosfotungstato de tiamulina 0,03 g, PVC 0,35 g, nitrobenzeno 1,0 ml, dioctilftalato 1,0 ml, tetrahidrofurano 4,0 ml) utilizando soluções de hidrogenofumarato de tiamulina preparadas em (—•—) água destilada; (—Δ—) sulfato de sódio 0,10 mol/L; (—○—) tampão fosfato/hidróxido de sódio pH 7,0 e (.....□.....) tampão fosfato/hidróxido de sódio pH 6,0, nas concentrações $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

O **limite nernstiano** é a menor atividade do íon em análise i na qual a reta obtida no gráfico potencial do eletrodo versus $-\log a_i$ começa a se desviar da linearidade. Ele é determinado diretamente na curva de calibração. O limite nernstiano é um dos critérios mais importantes na avaliação da performance de um eletrodo, porque ele especifica o limite inferior da faixa de utilização do eletrodo. Abaixo desse limite, a resposta do eletrodo se torna progressivamente mais e mais irreprodutível e o uso regular do eletrodo na região entre o limite nernstiano e o limite de detecção é menos satisfatório. Inevitavelmente, quando o gráfico de calibração do eletrodo se torna curvo, mais pontos de calibração serão necessários para definir o formato da curva e a calibração deverá ser repetida com maior frequência.

A TUPAC recomenda que o limite de detecção seja definido como a concentração do íon em análise, na qual a porção linear extrapolada do gráfico de calibração na menor diluição do íon intersepta a parte nernstiana extrapolada do gráfico, isto corresponde ao ponto T na Figura 17.

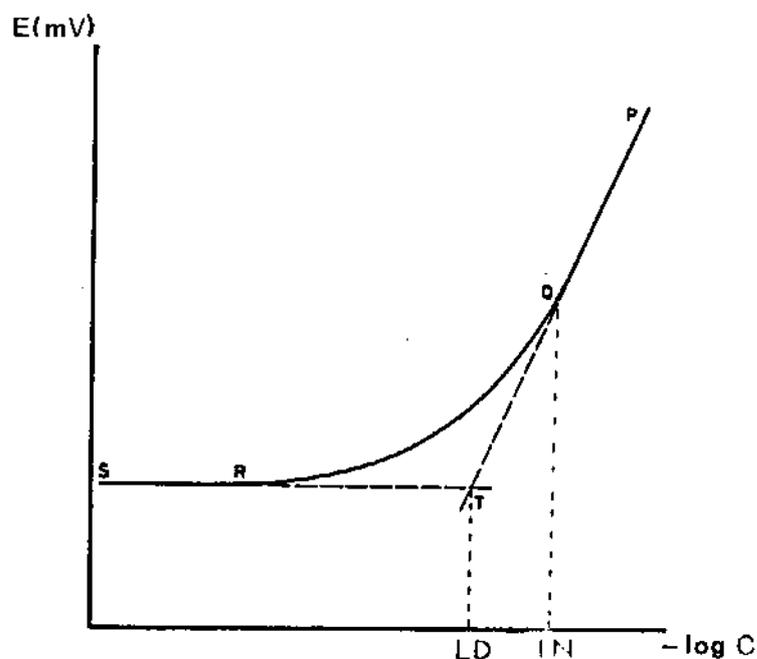


Figura 17 - Exemplo de curva de calibração de um eletrodo seletivo, mostrando o limite nernstiano (LN) e o limite de detecção (LD).

O limite de detecção e o limite nernstiano dependem tanto das propriedades do eletrodo como das condições de análise. O limite de detecção também pode ser afetado pelos íons adsorvidos na superfície da membrana ou na superfície das partículas do material eletroativo da membrana durante sua preparação.

Os limites de detecção e nernstiano foram determinados para todos os eletrodos construídos neste trabalho e são mostrados na Tabela 1.

Os limites de resposta medidos de um eletrodo dependem muito das condições de análise. Eles serão facilmente afetados pela eficiência com a qual a água e os reagentes utilizados podem ser purificados, eliminando traços de interferentes. O limite aparente de detecção dos eletrodos quando usados em tampões é frequentemente muitas ordens de magnitude maior do que quando os eletrodos são utilizados em soluções diluídas em série.

Os limites de resposta também são dependentes da temperatura e do solvente utilizado, porque esses dois fatores têm influência do produto de solubilidade do íon em análise.

Diferentes eletrodos para o mesmo íon em análise podem ter limites de detecção substancialmente diferentes (8).

Nas primeiras membranas líquidas para eletrodos, a fase orgânica era simplesmente um solvente orgânico líquido colocado sobre membrana fina de celulose porosa, vidro sinterizado ou outro suporte parecido. À medida que trabalhos com esse tipo de membrana foram sendo desenvolvidos, outros suportes mais duráveis que celulose foram encontrados, como por exemplo, PVC ou borracha de silicone. Devido à sua facilidade de construção, estabilidade em uso e similaridade de resposta com as membranas líquidas verdadeiras, esses suportes são quase que universalmente utilizados para a fabricação de eletrodos seletivos.

Nos últimos anos, consideráveis esforços têm sido destinados ao desenvolvimento de matrizes poliméricas alternativas para a construção de eletrodos de membrana. Esses esforços têm sido focalizados primeiramente no aumento da adesão da membrana ao suporte. Igual interesse tem sido destinado à produção de matrizes poliméricas funcionalizadas, as quais permitem a ligação covalente de enzimas, anticorpos e outras biomoléculas (62).

Das membranas estudadas, contêm PVC as de número 1 a 11 e 42 a 43. Nelas variou-se o tipo e a quantidade de plastificante e de par iônico utilizados.

Na Figura 18 é feita a comparação das curvas de calibração das membranas 1, 7, 8 e 9. As membranas 1 e 7 possuem a mesma composição, o plastificante foi dibutilftalato, mas com pares iônicos diferentes, na membrana 1, tetrafenilborato de tiamulina e na membrana 7, fosfotungstato de tiamulina. Nas membranas 8 e 9 a quantidade de PVC utilizada foi maior do que a utilizada nas duas primeiras membranas a fim de facilitar sua manipulação, mas os outros componentes foram mantidos nas mesmas quantidades. As quatro membranas mostraram comportamento nernstiano, com coeficiente angular médio de 57,7 mV/década de concentração. A membrana 7 apresentou o menor limite de detecção, $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L, enquanto que a membrana 9 apresentou o maior, $3,2 \times 10^{-5}$ mol/L.

Das membranas estudadas contendo PVC, não se conseguiu resultados que obedecessem à equação de Nernst com as membranas 2, 5 e 6. Nelas foi utilizado Aliquat 336 como contra-íon no trocador iônico da membrana. Aliquat, cloreto de tricaprilmetilamônio, apresenta maior seletividade para ânions (62), conseqüentemente não houve formação de par iônico com tiamulina, enquanto que tetrafenilborato e fosfotungstato são mais seletivos a cátions. Eletrodos catiônicos têm sido frequentemente utilizados como sensores para moléculas clinicamente importantes, que se apresentam como cátions a pH baixos, como é o caso da maioria dos fármacos (28) e, entre eles, tiamulina.

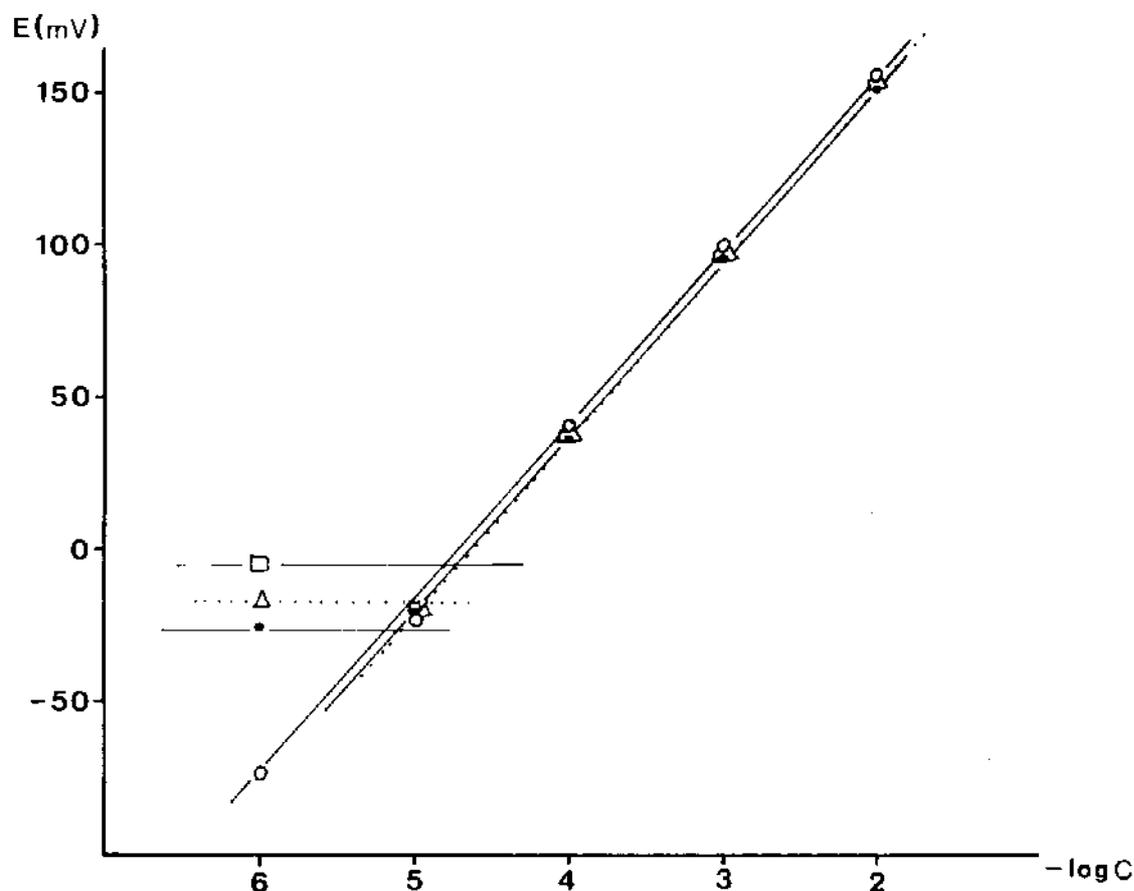


Figura 18 - Comparação entre as curvas de calibração da **membrana 1** (—•—) (tetrafenilborato de tiamulina 0,08 g, dibutilftalato 0,36 g, PVC 0,17 g e tetrahidrofurano 5,0 ml), **membrana 7** (—o—) (fosfotungstato de tiamulina 0,08 g, dibutilftalato 0,36 g, PVC 0,17 g e tetrahidrofurano 5,0 ml), **membrana 8** (···Δ···) (fosfotungstato de tiamulina 0,08 g, dibutilftalato 0,36 g, PVC 0,35 g e tetrahidrofurano 4,0 ml) e **membrana 9** (—□—) (tetrafenilborato de tiamulina 0,08 g, dibutilftalato 0,36 g, PVC 0,35 g e tetrahidrofurano 4,0 ml). Utilizando soluções de hidrogenofumarato de tiamulina preparadas em água destilada nas concentrações $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

A composição das membranas 3 e 4 foi baseada nos trabalhos de BOUKLOUZE e colaboradores (12) e EL-JAMMAL e colaboradores (32). Esses autores utilizaram como plastificantes dioctilftalato e nitrobenzeno em membranas de copolímero etileno/acetato de vinila (EVA). BOUKLOUZE comparou os desempenhos de eletrodos para anestésicos locais, utilizando como material eletroativo tetrafenilborato, silicotungstato e fosfotungstato. As melhores respostas foram obtidas com membranas de fosfotungstato. Já EL-JAMMAL construiu eletrodos para cálcio e comparou sua performance com eletrodos com mesmo par iônico e plastificantes, mas utilizando PVC como suporte. O eletrodo construído com membrana de EVA exibiu comportamento similar ao do eletrodo com membrana de PVC, mas o primeiro se mostrou mais estável na presença de cátions inorgânicos, principalmente zinco, que o segundo eletrodo.

A comparação das curvas de calibração das membranas 3 e 4 é mostrada na Figura 19. A membrana 4, contendo par iônico fosfotungstato de tiamulina apresentou coeficiente angular mais próximo do teórico, 58,9 mV/década de concentração, e limite de detecção mais baixo, $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L. Seu desempenho foi muito similar ao das membranas contendo dibutilftalato como plastificante.

As curvas de calibração das membranas 42 e 43 estão comparadas na Figura 20. Nestas membranas foi empregado o plastificante dioctilfenilfosfonato, o qual tem sido largamente utilizado em eletrodos seletivos a cálcio (3,32,54,72-73). As membranas contendo esse plastificante e os pares iônicos tetrafenilborato de tiamulina e fosfotungstato de tiamulina, respectivamente, tiveram coeficientes angulares muito semelhantes, 51,6 mV/década de concentração e 52,4 mV/década de concentração, respectivamente. O limite de detecção para a membrana 42 foi $1,3 \times 10^{-5}$ mol/L e para a membrana 43 foi $7,9 \times 10^{-4}$ mol/L.

BUNACIU e colaboradores (16) construíram eletrodos de membrana seletivos a tetrafenilborato e perclorato onde o plastificante empregado foi éter de 2-nitrofeniloctila. Baseado nos bons resultados obtidos por esses autores, foram feitas as membranas 10 e 11, contendo par iônico fosfotungstato de tiamulina e

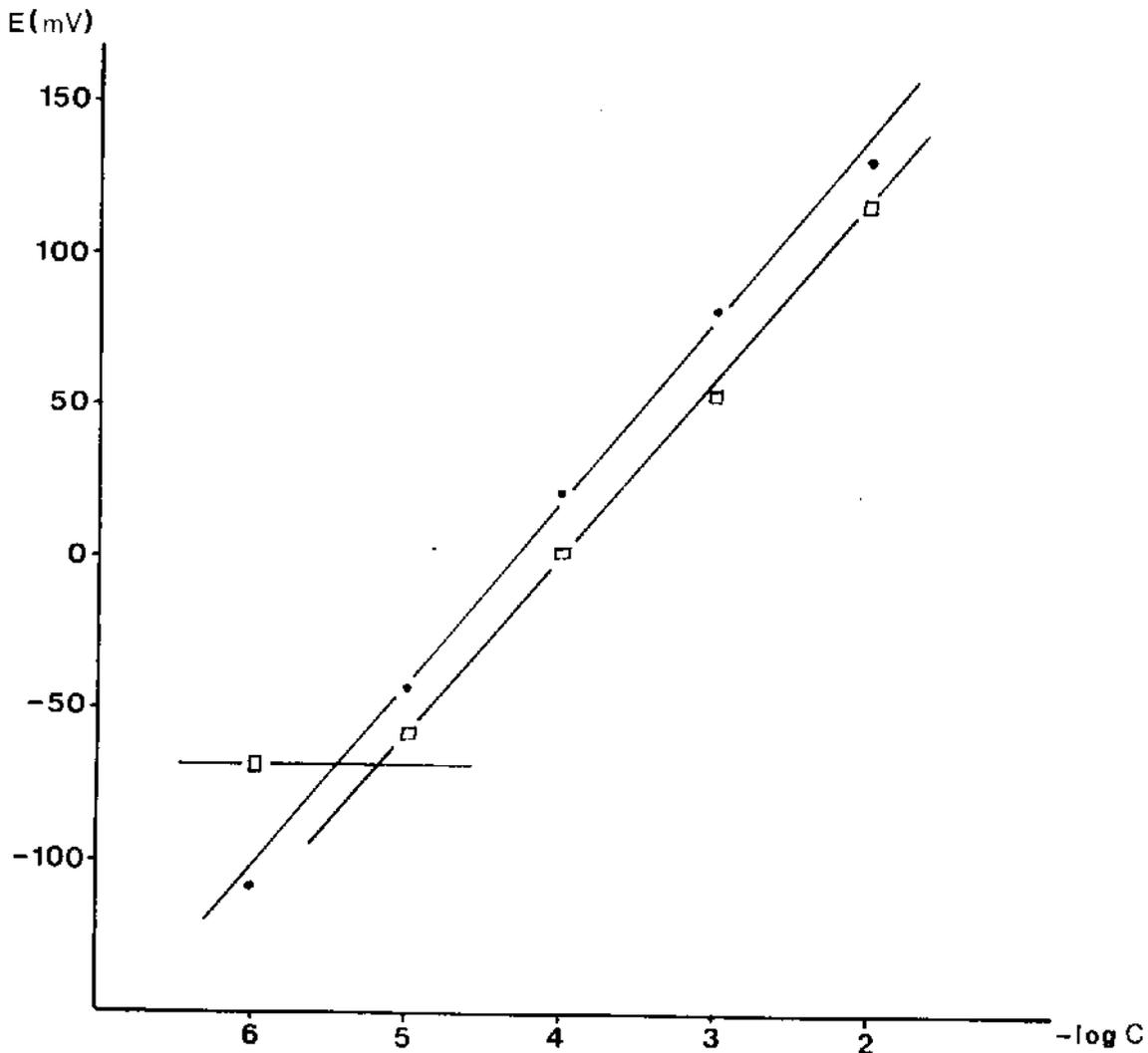


Figura 19 - Comparação entre as curvas de calibração da **membrana 3** (—□—) (tetrafenilborato de tiamulina 0,03 g, PVC 0,35 g, nitrobenzeno 1,0 ml, dioctilftalato 1,0 ml e tetrahidrofurano 4,0 ml) e **membrana 4** (—•—) (fosfotungstato de tiamulina 0,03 g, PVC 0,35 g, nitrobenzeno 1,0 ml, dioctilftalato 1,0 ml e tetrahidrofurano 4,0 ml). Utilizando soluções de hidrogenofumarato de tiamulina preparadas em água destilada nas concentrações $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

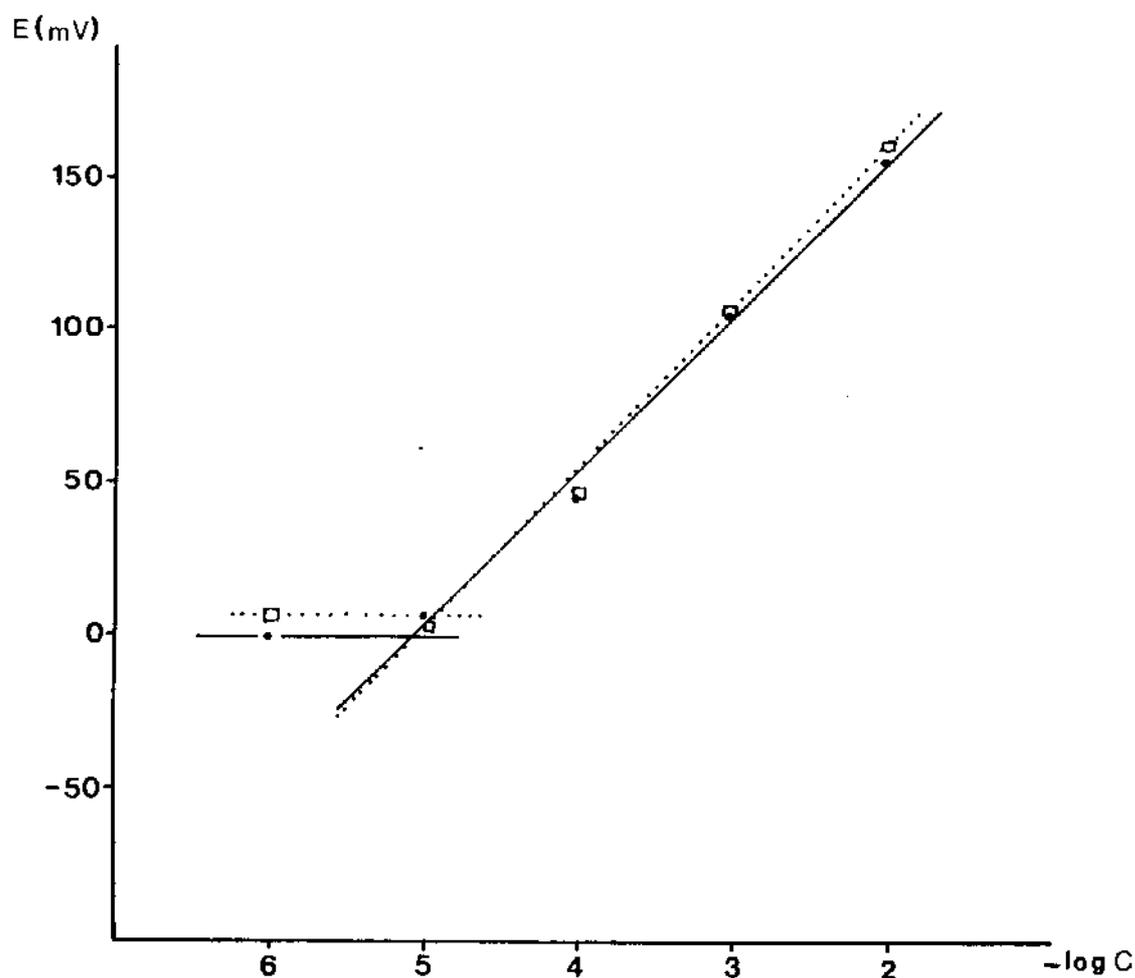


Figura 20 - Comparação entre as curvas de calibração da **membrana 42** (—•—) (tetrafenilborato de tiamulina 0,08 g, dioctilfenilfosfonato 0,64 g, PVC 0,32 g e tetrahidrofurano 5,0 ml) e **membrana 43** (···□···) (fosfotungstato de tiamulina 0,08 g, dioctilfenilfosfonato 0,64 g, PVC 0,32 g e tetrahidrofurano 5,0 ml). Utilizando soluções de hidrogenofumarato de tiamulina preparadas em água destilada nas concentrações $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

tetrafenilborato de tiamulina, respectivamente. As curvas de calibração dessas membranas são mostradas na Figura 21. Com a membrana 10 foi obtido coeficiente angular de 60,6 mV/década de concentração e limite de detecção de $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L, e com a membrana 11, coeficiente angular de 57,9 mV/década de concentração e limite de detecção de $3,9 \times 10^{-6}$ mol/L.

Comparando-se as membranas de PVC, verifica-se que limites de detecção maiores são obtidos quando se emprega fosfotungstato de tiamulina como par iônico. Eletrodos com esse par iônico mostram resposta cujo coeficiente angular é mais próximo de 59 mV/década de concentração do que eletrodos com tetrafenilborato de tiamulina provavelmente porque pares iônicos contendo fosfotungstato são mais hidrofóbicos do que os que contêm tetrafenilborato (12).

Um grande número de eletrodos seletivos a íons construídos com membranas poliméricas requerem a adição de sais lipofílicos para uma boa performance. Esses aditivos alteram a troca iônica através de interação eletrostática. Além disso, a presença de sítios aniônicos lipofílicos em eletrodos de membrana seletivos a cátions tem um efeito benéfico em vários parâmetros do sensor. Em geral, a resistência ôhmica e o limite de detecção são mais baixos, com menor interferência dos ânions em amostras com alta atividade iônica, a seletividade é aumentada e, nos casos onde o ionóforo tem capacidade de extração ruim, a sensibilidade do sensor é aumentada. Paralelamente, sítios aniônicos podem catalizar processos de transferência de fase em casos onde a cinética na interface membrana/amostra é limitada. Em analogia, sais de cátions lipofílicos são usados como aditivos em eletrodos seletivos a ânions principalmente para neutralizar impurezas aniônicas presentes na fase membrana e assim induzir permeseletividade para ânions. Mesmo que a influência de aditivos no comportamento de eletrodos seletivos a ânions não tenha sido investigada tão completamente como no caso de eletrodos seletivos a cátions, efeitos análogos podem ser esperado (72).

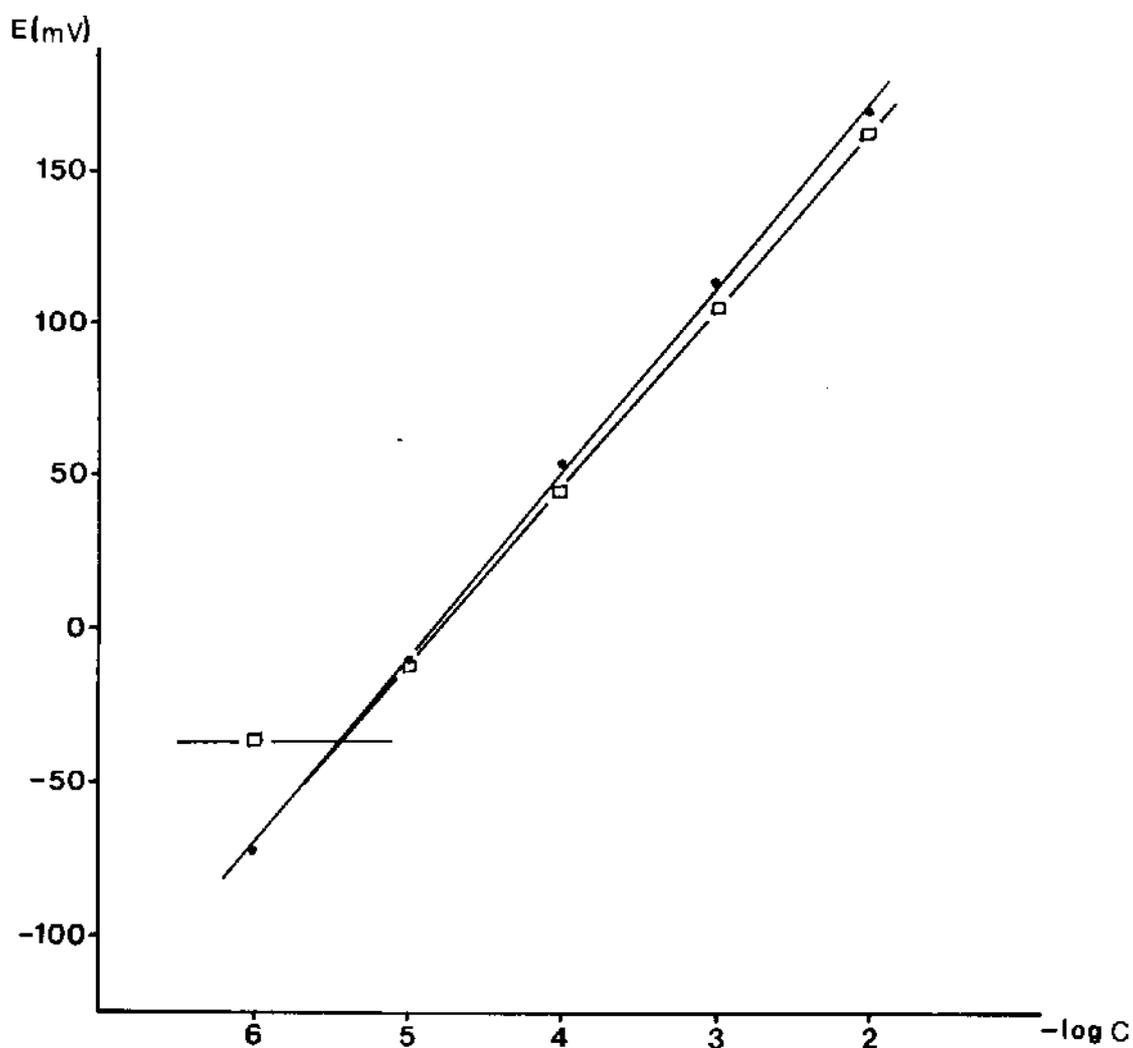


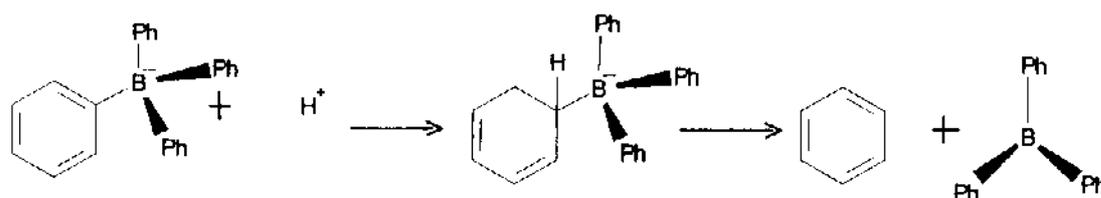
Figura 21 - Comparação entre as curvas de calibração da **membrana 10** (—•—) (fosfotungstato de tiamulina 0,04 g, éter de 2-nitrofenil octila 0,64 g, PVC 0,32 g e tetrahydrofurano 4,0 ml) e **membrana 11** (—□—) (tetrafenilborato de tiamulina 0,04 g, éter de 2-nitrofenil octila 0,64 g, PVC 0,32 g e tetrahydrofurano 4,0 ml). Utilizando soluções de hidrogenofumarato de tiamulina preparadas em água destilada nas concentrações $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

Nos eletrodos, a membrana deve estar em equilíbrio termodinâmico com a amostra, por isso uma transferência de massa do íon em análise para a membrana é necessária. Neste caso, um aditivo aniônico é utilizado em eletrodos seletivos a cátions contendo cromóforo neutro (sistema de troca iônica) enquanto que um aditivo catiônico é incorporado a eletrodos seletivos a ânions baseados em cromoionóforo carregado (sistema de coextração).

A fim de aumentar o tempo de vida de sensores baseados em membranas poliméricas, esforços têm sido dirigidos na lipoficidade dos componentes neutros das membranas, tais como ionóforos, cromoionóforos e plastificantes. Assim como todos os outros componentes da membrana, aditivos têm um tempo de vida determinado, devido à sua decomposição química e ao processo de lixiviação. ROZATZIN e colaboradores (66) investigaram o uso e a estabilidade desses aditivos aniônicos na membrana e a sua influência na seletividade de eletrodos seletivos a cátions.

Nos últimos anos, diversos derivados de sais de tetrafenilborato têm sido utilizados com sucesso como aditivos aniônicos em membranas poliméricas em eletrodos seletivos a cátions. Aproveitando sua habilidade em formar sais lipofílicos com diferentes cátions, esses compostos foram originalmente utilizados como agentes na precipitação e em processos de extração líquido-líquido de cátions orgânicos e inorgânicos, em soluções aquosas.

Contudo, a estabilidade química de tetrafenilborato é limitada, especialmente na presença de ácidos, oxidantes e luz, com o íon hidrogênio provavelmente atacando um substituinte fenila (Ph):



A decomposição de derivados de tetrafenilborato sob condições ácidas é diminuída pela substituição dos anéis fenila por grupos que retiram elétrons nas posições meta e para. Assim, sua estabilidade em meio protonado é aumentada. A velocidade de decomposição é determinada pela concentração de tetrafenilborato e pela concentração de íons hidrogênio livres na fase orgânica.

Assumindo-se que o íon para o qual a membrana é seletiva forma complexos mais estáveis que os íons interferentes, nas membranas contendo ionóforos com alta estabilidade de complexo, os pares iônicos entre íons da amostra não complexados e sítios aniônicos têm uma influência menor que em membranas com complexos com baixa estabilidade. Conseqüentemente, a dependência da seletividade da membrana de um eletrodo na estabilidade do complexo com o ionóforo pode ser conseguida desde que a associação de espécies carregadas não seja negligenciada.

ROZATZIN e colaboradores (66) observaram que a estabilidade química de tetrafenilborato está relacionada com a basicidade do cromoionóforo incorporado na membrana. Foi verificado que a velocidade de decomposição não é afetada pelo pH da solução da amostra desde que o cromoionóforo na membrana esteja completamente protonado. Os sais de tetrafenilborato altamente substituídos são muito mais estáveis que tetrafenilborato de sódio.

Sob condições ácidas, a estabilidade de diferentes sais de borato em membranas poliméricas mostrou-se seriamente limitada na presença de substâncias com caráter ácido ou base fraca. Contudo, boratos altamente substituídos mostraram um tempo de vida útil mais longo.

Embora não se tenha dados sobre a estabilidade dos sais de fosfotungstato, as informações discutidas na literatura levam a crer que a provável razão para os resultados encontrados com os eletrodos contendo fosfotungstato serem melhores dos que os obtidos com tetrafenilborato é que aquele par iônico, além de apresentar maior hidrofobicidade, tem estabilidade maior quando comparado com

tetrafenilborato.

Os plastificantes usados para preparar membranas de eletrodos seletivos a íons representam um grupo de substâncias capazes de sofrerem várias interações com íons orgânicos e inorgânicos. A capacidade de extração de plastificantes líquidos depende de sua polaridade (71).

Há muita especulação no papel relativo dos trocadores iônicos e plastificantes nos eletrodos de membrana. As qualidades de seletividade de trocadores de íons líquidos em membranas de eletrodos são atribuídas à maior seletividade desses trocadores para o contra-íon quando comparadas com trocadores de íons resinosos (54).

A seletividade de um eletrodo frequentemente depende não somente da natureza do sensor, mas também do sinergismo do plastificante (32).

O plastificante usado para dissolver o sensor trocador de íons tem um papel suplementar no ajuste de: 1 - permeação relativa na fase orgânica final; 2 - mobilidade dos sítios trocadores de íons de acordo com a viscosidade do plastificante e 3 - densidade dos sítios pela variação da concentração do trocador de íons e possivelmente afetando a tendência de dimerização que pode ocorrer em alguns sensores do tipo dialquilfosfato.

Estes ajustes podem influenciar a extensão do aumento sinérgico do coeficiente de partição do íon com consequentes efeitos na seletividade do eletrodo. Por exemplo, com trocadores do tipo dialquilfosfatos, o plastificante dioctilfenilfosfonato produz um eletrodo seletivo a íons cálcio, enquanto que o uso de 1-decanol produz um eletrodo seletivo a cálcio, magnésio ou outros íons divalentes. Há, contudo, ocasiões onde a resposta seletiva a um íon é obtida na ausência de plastificantes. Exemplos incluem resposta ao íon cálcio com o ácido livre ou sais de cálcio do ácido di-(2-etilhexil)fosfórico e ácido dioctilfosfórico, onde esses materiais têm, ele próprios, algumas propriedades plastificantes.

Estudos explicando a preferência de carregadores neutros por íons monovalentes ao invés de divalentes indicam que plastificantes de constantes dielétricas baixa favorecem essa preferência. Isto é atribuído à energia livre de Born, uma medida de interação eletrostática entre um complexo carregado positivamente e o solvente da membrana, se tornando menos negativa quando a permeação relativa do meio solvatado diminui e pelo valor absoluto da energia livre de Born sendo proporcional ao quadrado da carga do complexo. Qualquer diminuição na constante dielétrica irá diminuir drasticamente a estabilidade do complexo carregado. Este efeito, contudo, é controlado pela necessidade em permitir que mudanças de energia livre associadas ao desengajamento dos sítios de coordenação no carregador, pela destruição das ligações intermoleculares solvente-carregador, mas uma vez que isso não é dependente da carga iônica e do raio, a sequência de seletividade dos carregadores deve permanecer inalterada.

Para a discriminação entre cátions dentro de um dado grupo da tabela periódica, a influência do plastificante sobre carregadores neutros é considerada de menor importância. Mas isso não se aplica a todos os sensores, por exemplo, dioctilfenilfosfonato é mais seletivo a cálcio do que aos outros cátions alcalinos terrosos.

Qualquer que seja o papel do plastificante, o uso de matrizes de PVC cria a necessidade de plastificação e coloca restrições na escolha do plastificante. Contudo, há ocasiões, como por exemplo com o plastificante 1-decanol, onde eletrodos de membrana com matriz de PVC são obtidos com um solvente de propriedades plastificantes pobres. Infelizmente, em tais casos, a imiscibilidade de solventes que não são bons plastificantes, como é o caso do 1-decanol, resulta na exsudação de líquido da membrana de PVC.

Resumindo o papel do solvente/plastificante em matrizes de PVC, além da função de plastificantes, eles devem ser imiscíveis com água, relativamente não voláteis, um bom solvente para o sal trocador de íons e promover a seletividade iônica desejada, além de serem líquidos de suficientemente alta viscosidade (54).

Em geral, as membranas de PVC para eletrodos seletivos a íons contêm cerca de 66% de plastificantes e a performance do eletrodo diminui com a diminuição do teor de plastificante.

Foi mostrado que eletrodos de membrana polimérica são funcionais somente acima da temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero, temperatura de transição similar ao ponto de fusão dos sólidos. Isto demonstra claramente que PVC plastificado está em um estado semelhante ao líquido, com as moléculas do plastificante e as cadeias de PVC formando uma solução verdadeira, termodinamicamente estável, com mistura a nível molecular, na qual ionóforo e sais estão dissolvidos. Uma vez que se trata de uma única T_g , o sistema tem somente uma fase. Apesar dessas conclusões, muitos autores têm considerado o componente PVC como um suporte inerte e o plastificante como líquido livre. Ao lado disso, PVC plastificado tem sido considerado como uma matriz suficientemente pura e inerte com o único objetivo de ser um solvente insolúvel em água imobilizado.

Estudos recentes mostraram que essas observações não são corretas. Tanto a estrutura física como as contaminações químicas do PVC plastificado são importantes para a explicação de diversas observações experimentais. Deve ser ressaltado que os aspectos particulares que explicam o comportamento do PVC plastificado podem não ser necessariamente observados em outros tipos de membranas de eletrodos seletivos a íons. É possível construir eletrodos seletivos a íons sem matriz polimérica e esses eletrodos podem funcionar de uma maneira diferente.

O papel das impurezas na matriz de PVC parece ser pouco importante quando sais são deliberadamente adicionados à membrana.

A constante dielétrica do PVC plastificado é obviamente importante quando se considera esse material para uso em membranas de eletrodos seletivos a íons. Por exemplo, um material de constante dielétrica baixa é desejável quando íons monovalentes devem ser analisados em presença de íons divalentes. A constante dielétrica do polímero é uma função da proporção PVC/plastificante e da natureza deste último. Uma vez que a maioria das membranas utilizadas em

eletrodos seletivos a íons contêm entre 60 e 70% em peso de plastificante, deve-se esperar que as constantes dielétricas dessas membranas sejam similares às dos plastificantes líquidos puros, especialmente porque o PVC plastificado estará acima da sua T_g à temperatura ambiente e se comportará essencialmente como um líquido viscoso.

Para membranas seletivas a cátions divalentes, geralmente são utilizados plastificantes com alta constante dielétrica, por exemplo éter de nitrofenil octila. Moléculas menores como nitrobenzeno não são adequadas porque, embora elas plastifiquem o PVC, elas saem facilmente da membrana quando em contato com soluções aquosas. Desse modo, parece ser difícil obter membranas de PVC com constante dielétrica alta uma vez que: 1 - elas devem conter, no mínimo, 20% de PVC para serem mecanicamente estáveis; 2 - a molécula do plastificante deve ser suficientemente grande para não sair para a solução aquosa.

A mobilidade iônica no PVC que é cerca de 1000 vezes menor que na água. Essa mobilidade é muito sensível à quantidade de PVC na membrana. Assim, de uma membrana com 33% de PVC para uma membrana com 40% de PVC, a mobilidade dos íons diminui de um fator de 10.

A maioria dos sais quando dissolvidos em PVC plastificado se comportam como eletrólitos fracos com uma grande proporção de pares iônicos sendo formados. A constante de dissociação de vários sais foi medida em membranas de PVC(33%)-di-octil sebacato, os valores foram encontrados geralmente entre 10^{-4} e 3×10^{-3} mol/L. Isso significa que se um sal for dissolvido nesta membrana em um nível milimolar, a concentração de íons será, no mínimo, de 3×10^{-4} mol/L. Quando o plastificante é éter de nitrofenil octila, a 2/3 em peso, concentrações de sais de 1 mmol/L estarão completamente dissociados devido à constante dielétrica maior.

Desse modo, para qualquer membrana de PVC plastificado contendo sais nela dissolvidos, os quais podem ser impurezas, a condutividade dependerá de: 1 - grau de dissociação do sal em íons e 2 - da mobilidade dos íons formados.

O grau de dissociação assim como as mobilidades iônicas são sensíveis à relação PVC/plastificante.

A condutividade de PVC plastificado ao qual nenhum íon foi deliberadamente adicionado é uma função do grau de impurezas iônicas do PVC e do plastificante. Em muitos casos, o nível de impurezas iônicas pode ser aproximadamente 10^{-4} mol/L, embora este nível possa ser reduzido pela purificação do PVC.

É importante conhecer o coeficiente de difusão de ionóforos neutros incorporados em membranas de PVC. Recentemente foi desenvolvida uma técnica na qual esses coeficientes de difusão podem ser avaliados, a qual baseia-se em medidas das curvas corrente-voltagem. Foi observado que com o aumento da quantidade de PVC, os coeficiente de difusão diminuem drasticamente.

Quando PVC está em contato com água, moléculas de água devem entrar no polímero. Há pouca informação na literatura sobre a concentração de equilíbrio de moléculas de água em PVC plastificado quando em contato com soluções aquosas. A maior parte das análises realizadas com membranas de PVC citadas na literatura se relacionam a membranas saturadas com água a níveis de $0,6$ mol/dm³. Membranas que não estão em contato com soluções aquosas conterão uma concentração menor de água, como resultado do contato com a umidade do ar.

No passado, membranas seletivas a íons potássio eram preparadas somente utilizando valinomicina como carregador e sem a adição de sais. Essas membranas dependiam da presença de impurezas no PVC ou no plastificante. Em geral, é necessário condicionar esses eletrodos pelo contato com soluções aquosas contendo íons potássio para permitir que um grau de troca ocorra. Foi mostrado que PVC plastificado com um plastificante apolar e contendo valinomicina como material eletroativo absorvia íons potássio de uma solução de KCl 10^{-3} mol/L enquanto que a absorção de íons cloreto dessa mesma solução era negligenciável. Esses autores concluíram que a membrana se comportava como um trocador iônico de baixa capacidade, da ordem de 10^{-4} mol/L. Não havia, contudo, nenhuma razão óbvia para esta observação. Um estudo recente sugere um mecanismo diferente. Foi observado que sais

inorgânicos como KCl ou CsCl, quando deliberadamente incorporados em membrana de PVC/valinomicina, aumentam a capacidade de troca de cátions sem afetar a performance do eletrodo seletivo a ions. Este efeito é devido à provável imobilização de sais dentro da membrana. Água da solução aquosa circundante se difunde facilmente pela membrana e solvata as impurezas aonde elas estiverem. Inclusões coloidais de soluções salinas aquosas são aparentemente formadas e são virtualmente imóveis. Troca iônica ocorre entre essas inclusões e a fase aquosa. Baseado nessas observações, esses autores sugeriram que a capacidade de troca iônica intrínseca da membrana pode também ser devido a impurezas iônicas.

Espera-se que qualquer substância alcance, após um certo tempo, uma distribuição de equilíbrio entre membrana e fase aquosa. Sais hidrofílicos não são lixiviados da membrana para a solução aquosa, é a água que penetra na membrana e solvata esses ions *in situ*. Ionóforos e plastificantes são lixiviados lentamente, e esse processo limita a vida útil do eletrodo. A lixiviação de substâncias neutras é um processo de exsudação.

Em membranas de PVC plastificado típicas, de espessura 0,1 mm, a região de cargas espaciais se espalha somente uma pequena distância no interior da membrana. Há, contudo, uma diferença significativa entre interfaces líquido/líquido e polímero/água. No caso de polímeros, tanto o polímero como o plastificante podem se acumular na interface, com isso a composição da interface é diferente da composição da membrana. Além disso, impurezas presentes no polímero também podem se acumular na interface (3).

A fim de se tentar entender melhor o papel dos plastificantes, SVANCARA & VYTPAS (71) construíram eletrodos de pasta de grafite aonde plastificantes (tricresilfosfato, dioctilftalato e éter de 2,4-dinitrofenil n-octila) foram utilizados para a formação da pasta e comparados com pastas feitas com Nujol e óleo de silicone. Esses eletrodos mostraram algumas propriedades interessantes: 1 - o plastificante pode cobrir sítios de absorção ativos das partículas de grafite; 2 - eletrodos com pasta feita com plastificantes têm tempo de vida menor provavelmente devido à alta volatilidade dos

plastificantes utilizados; 3 - foi observado que eletrodos de pasta de grafite com plastificante exibem comportamento de extração, enquanto que pastas com Nujol ou óleo de silicone têm comportamento de adsorção; e 4 - eletrodos de pasta de grafite com plastificante apresentam caráter de extração porque há acúmulo no eletrodo do íon em análise após sucessivas varreduras (71).

O tempo da vida das membranas pode também ser limitado pela volatilidade do plastificante (8).

BOUKLOUZE e colaboradores (12) compararam as respostas de eletrodos seletivos a íons para anestésicos locais, utilizando os plastificantes dioctilftalato e nitrobenzeno juntos e separados. Os melhores resultados foram encontrados com o uso da mistura dos dois plastificantes e não com cada um separadamente. Embora a linearidade das respostas e o limite de detecção tivessem sido melhorados usando um só plastificante, esses eletrodos mostraram baixa reprodutibilidade e leituras de potencial instáveis e, além disso, os seus tempos de vida útil não excederam um dia. Esses autores não encontraram nenhuma evidência de que os plastificantes utilizados estivessem envolvidos na determinação da seletividade dos eletrodos com relação aos anestésicos locais estudados.

Resultados de outros autores indicaram que o uso de um plastificante com deficiência de elétrons como o nitrobenzeno faz com que a membrana responda somente a ânions. Mas os eletrodos montados por BOUKLOUZE e colaboradores para os fármacos tetracaína, lidocaína e procaína contendo somente nitrobenzeno mostraram excelente resposta para esses cátions. Outros autores, utilizando nitrobenzeno ou dimetilftalato como plastificante para eletrodo seletivo à nicotina, encontraram melhores resultados com nitrobenzeno.

Por outro lado, éter de nitrofenil octila e éter de nitrofenil fenila, que também são classificados como plastificantes deficientes em elétrons, são frequentemente utilizados em eletrodos seletivos a cátions, assim como a ânions. Ao lado disso, dioctilftalato, considerado doador de elétrons e útil para propiciar especificidade somente a cátions, foi usado para plastificar

eletrodos seletivos aos ânions tetrafenilborato e hexadecilpiridínio (12).

Para a preparação das membranas de PVC utilizadas neste trabalho, foram utilizados os plastificantes dibutilftalato, a mistura nitrobenzeno e dioctilftalato, éter de 2-nitrofeniloctila e dioctilfenilfosfonato.

A Tabela 2 mostra a comparação entre essas membranas.

Tabela 2 - Comparação entre a performance das membranas de PVC preparadas com diferentes plastificantes e pares iônicos

PLASTIFICANTE	PAR IÔNICO	LIMITE DE DETECÇÃO (mol/L)	COEFICIENTE ANGULAR (mV/década de concentração)
DBF	TFB	$7,9 \times 10^{-6}$	57,2
NB + DOF	TFB	$4,5 \times 10^{-6}$	55,7
NFO	TFB	$3,9 \times 10^{-6}$	57,9
DOFF	TFB	$1,0 \times 10^{-5}$	51,6
DBF	FOSFO	$1,0 \times 10^{-6}$	57,8
NB + DOF	FOSFO	$1,0 \times 10^{-6}$	58,9
NFO	FOSFO	$1,0 \times 10^{-6}$	60,6
DOFF	FOSFO	$7,9 \times 10^{-4}$	52,4

DBF = dibutilftalato

NB + DOF = mistura nitrobenzeno e dioctilftalato

NFO = éter de 2-nitrofeniloctila

DOFF = dioctilfenilfosfonato

TFB = tetrafenilborato de tiamulina

FOSFO = fosfotungstato de tiamulina

Das membranas que continham tetrafenilborato de tiamulina, os coeficientes angulares que mais se aproximam do teórico esperado foram obtidos com os plastificantes dibutilftalato e éter de 2-nitrofeniloctila. Já com os eletrodos com membrana contendo o par iônico fosfotungstato de tiamulina, os melhores resultados foram obtidos com a mistura de plastificantes nitrobenzeno/dioctilftalato

e com éter de 2-nitrofeniloctila. Mas, o que tem maior influência na resposta desses eletrodos é a natureza do par iônico. Quando se utilizou fosfotungstato de tiamulina, os coeficientes angulares foram mais próximos dos 59,2 mV/década de concentração, considerado ideal, do que com tetrafenilborato de tiamulina.

Acetato de celulose forma membrana à temperatura ambiente sem o uso de plastificantes (40). Este formador de filme foi utilizado nas membranas 12 a 17. Destas, só obedeceram à equação de Nernst as de número 12⁺⁺⁺ e 16⁺⁺⁺ (Figura 22), porque nessas duas membranas se utilizou como solução interna uma fase contendo solução saturada de tetrafenilborato de tiamulina em nitrobenzeno, a qual ficava em contato com a solução da amostra, e a segunda fase contendo solução de KCl 0,1 M, onde ficava imerso o fio de Ag/AgCl.

Como membrana de acetato de celulose é semipermeável, a solução interna contendo nitrobenzeno exsudou, indo para a solução em análise. Este fato traz vários inconvenientes: 1 - o eletrodo não pode ser usado em controles de processo, em análises em fluxo ou em monitorações no campo; 2 - a solução da amostra não pode ser reaproveitada e 3 - atenção deve ser dada ao nível de solução interna no corpo do eletrodo a fim de que ele seja mantido mais ou menos constante para não influir nas medições.

Matrizes de acetato de celulose, etil celulose e colódio têm se mostrado totalmente insatisfatórias para uso como membranas em eletrodos seletivos a íons devido ao seu caráter hidrofílico (54).

A membrana de acetato de celulose atua somente como um separador físico inerte para conter a solução interna do eletrodo. Esta membrana não tem papel efetivo nos processo de geração de potencial, uma vez que as determinações realizadas com eletrodos com membrana feita com esse formador de filme contendo como solução interna a mistura cloreto de sódio 0,10 mol/L e hidrogenofumarato de tiamulina $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L não deram leituras de potencial. Só foi possível realizar medições quando a solução interna continha nitrobenzeno. Neste caso, a membrana seletiva do eletrodo é formada pelo nitrobenzeno, originando a interface água/nitrobenzeno, onde

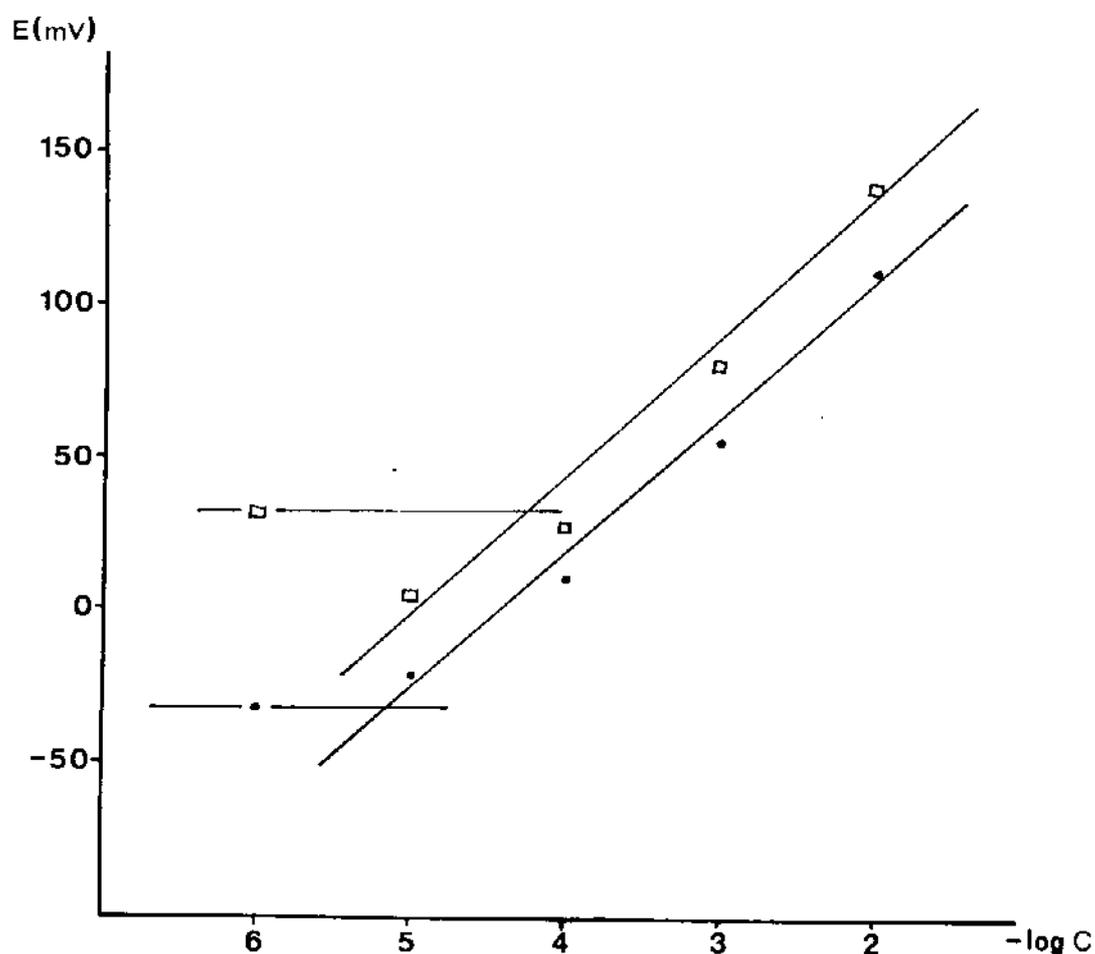


Figura 22 - Comparação entre as curvas de calibração da **membrana 12⁺⁺⁺** (—□—) (acetato de celulose 0,20 g, tetrafenilborato de tiamulina 0,20 g, acetona 5,0 ml, nitrobenzeno 0,1 ml) e **membrana 16⁺⁺⁺** (—•—) (acetato de celulose 0,20 g, tetrafenilborato de tiamulina 0,40 g, acetona 5,0 ml, nitrobenzeno 0,1 ml). Utilizando soluções de hidrogenofumarato de tiamulina preparadas em água destilada nas concentrações $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

ocorrem os processos de troca iônica e geração de potencial discutidos anteriormente.

O fato de que acetato de celulose é um suporte inerte também ficou evidenciado quando se montou membranas desse material sobre eletrodo de pasta de grafite (Figura 13), membranas 36 a 37. Os eletrodos obtidos não mostraram resposta nerstiana mesmo quando 0,1 ml de nitrobenzeno foi adicionado à solução da membrana antes da sua solidificação (membrana 29).

Nafion (Figura 23) é um sal polimérico, ou seja, é uma cadeia polimérica contendo núcleos aniônicos e contra-íons móveis, que possui condutividade iônica, devido ao movimento das cargas iônicas.

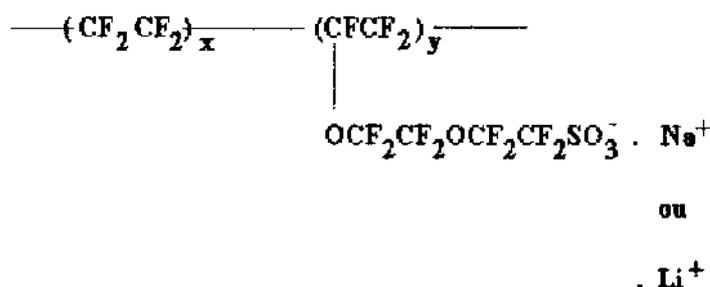


Figura 23 - Estrutura do Nafion.

Este tipo de polímero tem uma condutividade extremamente baixa devido à agregação dos íons em grupos. Sua condutividade pode ser melhorada quando os contra-íons estão solvatados. Assim, Nafion tem condutividade menor que 10^{-13} S/cm, mas se torna um condutor muito melhor, com condutividade menor que 10^{-8} S/cm, quando umedecido com polietileno glicol (58).

Nafion é um polímero de troca iônica sulfonado e perfluorinado fabricado pela DuPont. Ele é, tanto química como termodinamicamente, estável em solução aquosa (53,82). O grupo

hidrofilico sulfonato carregado negativamente do Nafion torna-o capaz de pré concentrar cátions por interação eletrostática, enquanto que seu esqueleto fluor-carbono hidrofóbico confere-lhe seletividade iônica para cátions orgânicos, através de interação hidrofóbica. Esses dois fatores fazem com que o Nafion seja seletivo a cátions, especialmente aqueles hidrofóbicos orgânicos (43,82). Filmes de Nafion têm-se mostrado úteis na preparação de eletrodos modificados, principalmente em voltametria e amperometria (2,4,7,43,53,82).

Como Nafion tem alta seletividade para cátions, tentou-se montar eletrodos seletivos a tiamulina utilizando membranas construídas com esse polímero. Sempre que Nafion é citado na literatura, sua utilização é em eletrodos sólidos - platina, pasta de grafite e outros. A primeira tentativa de emprego de Nafion neste trabalho foi com montagem do eletrodo segundo EL-JAMMAL (Figura 12). As membranas obtidas, de números 18 a 23, foram de difícil manipulação, se rompendo facilmente, o que impediu a determinação dos potenciais.

Como membranas de acetato de celulose são semipermeáveis, foi feita a tentativa de se sobrepor à membrana de Nafion uma membrana de celulose, a fim de aumentar sua resistência física. As membranas resultantes, de números 32 a 35, embora mais resistentes, não apresentaram resposta nerstiana.

A terceira tentativa foi a montagem da membrana de Nafion sobre um eletrodo de pasta de grafite (Figura 13). A solução da membrana foi depositada sobre o eletrodo várias vezes, com secagem ao ar entre elas, até a formação de um filme contínuo. Foi feita a deposição somente de Nafion a 2% em etanol (membrana 40) e a deposição dessa mesma solução contendo tetrafenilborato de tiamulina (membrana 41). Nos dois casos não houve resposta nerstiana.

Eletrodos de membrana polimérica seletivos a íons baseados em pares iônicos apresentam dificuldades como interferências e perda do trocador e do plastificante da matriz polimérica. Essa perda, a qual causa a deterioração da resposta do eletrodo e resulta em um tempo de vida do eletrodo limitado, depende principalmente da

natureza (lipoficidade) do plastificante e do componente ativo da membrana. A fim de minimizar esses problemas, tem sido sugerido o uso de alternativas ao PVC como matriz polimérica (12,32,54).

Tem sido sugerido que polímeros com temperatura de transição vítrea (T_g) baixa são boas matrizes para eletrodos com membrana polimérica (32).

Plastificantes são eficientes na redução da temperatura de transição vítrea de polímeros, a qual para o PVC é 81°C . Tem sido sugerido que polímeros como poliuretano e borracha de silicone com transição vítrea menor que a temperatura ambiente são matrizes adequadas para a formação da membrana. Poli(metilmetacrilato) e poliestireno se mostraram não apropriados para o uso como membranas de eletrodos devido às suas altas temperaturas de transição vítrea, 105°C e 100°C , respectivamente. Além da T_g alta, também devem ser considerados a baixa solubilidade dos trocadores nesses polímeros e a sua incompatibilidade com os outros componentes da membrana (54).

Em testes com eletrodos com membrana de poliestireno, cuja T_g é 100°C , não se conseguiu nenhuma resposta, enquanto que bons resultados foram obtidos, tanto para cátions orgânicos como inorgânicos, com eletrodos com matriz do copolímero etileno/acetato de vinila (EVA), cuja T_g é baixa (-50°C), menor que a temperatura ambiente (32).

Contudo, dependendo do polímero utilizado, o eletrodo pode exibir pior desempenho. Assim, o uso de copolímero acetato de vinila/cloreto de vinila hidrolizado em eletrodos seletivos a cálcio não oferece vantagem, enquanto que poli(vinil isobutil éter) exibe o mesmo comportamento de um eletrodo de PVC contendo o mesmo material eletroativo (12,32).

O uso do copolímero etileno/acetato de vinila (EVA) em eletrodos seletivos a cálcio aumenta suas seletividades em presença de outros íons, principalmente cobre e metais alcalinos (32).

Baseado nos resultados positivos obtidos com o uso de EVA, foram construídos eletrodos com membrana contendo esse material.

Este copolímero forma membranas duráveis e manipuláveis à temperatura ambiente com e sem o auxílio de plastificantes. A membrana 24, contendo o par tetrafenilborato de tiamulina, e a membrana 26, contendo fosfotungstato de tiamulina, foram preparadas com EVA sem o uso de plastificantes. Com a primeira membrana conseguiu-se fazer medições de potenciais mas o coeficiente angular encontrado, 35,5 mV/década de concentração, está muito abaixo dos 59 mV/década de concentração considerado ideal. Já com a segunda membrana não se conseguiu fazer nenhuma medição.

Mas com o uso dos plastificantes dibutilftalato, nitrobenzeno e dioctilftalato em conjunto e éter de 2-nitrofenil octila, conseguiu-se resultados que estão de acordo com a equação de Nernst.

A Figura 24 mostra a comparação entre as curvas de calibração das membranas 24, sem plastificante e com tetrafenilborato de tiamulina como par iônico, 25 e 27, contendo a mistura de nitrobenzeno e dioctilftalato como plastificante e os pares iônicos tetrafenilborato de tiamulina e fosfotungstato de tiamulina, respectivamente. A membrana 25 apresentou coeficiente angular de 52,9 mV/década de concentração e a membrana 27, 61,9 mV/década de concentração. Com a membrana 24 conseguiu-se o menor limite de detecção, $2,5 \times 10^{-6}$ mol/L, e com a membrana 27 o maior, $4,5 \times 10^{-5}$ mol/L.

Os resultados conseguidos com a membrana de EVA plastificada com éter de nitrofenil octila são mostrados na Figura 25. A membrana 28, contendo tetrafenilborato de tiamulina como par iônico, apresentou coeficiente angular de 51,3 mV/década de concentração, enquanto que a membrana 29, contendo fosfotungstato de tiamulina, apresentou 58,9 mV/década de concentração. O maior limite de detecção foi obtido com a primeira membrana, $7,9 \times 10^{-6}$ mol/L.

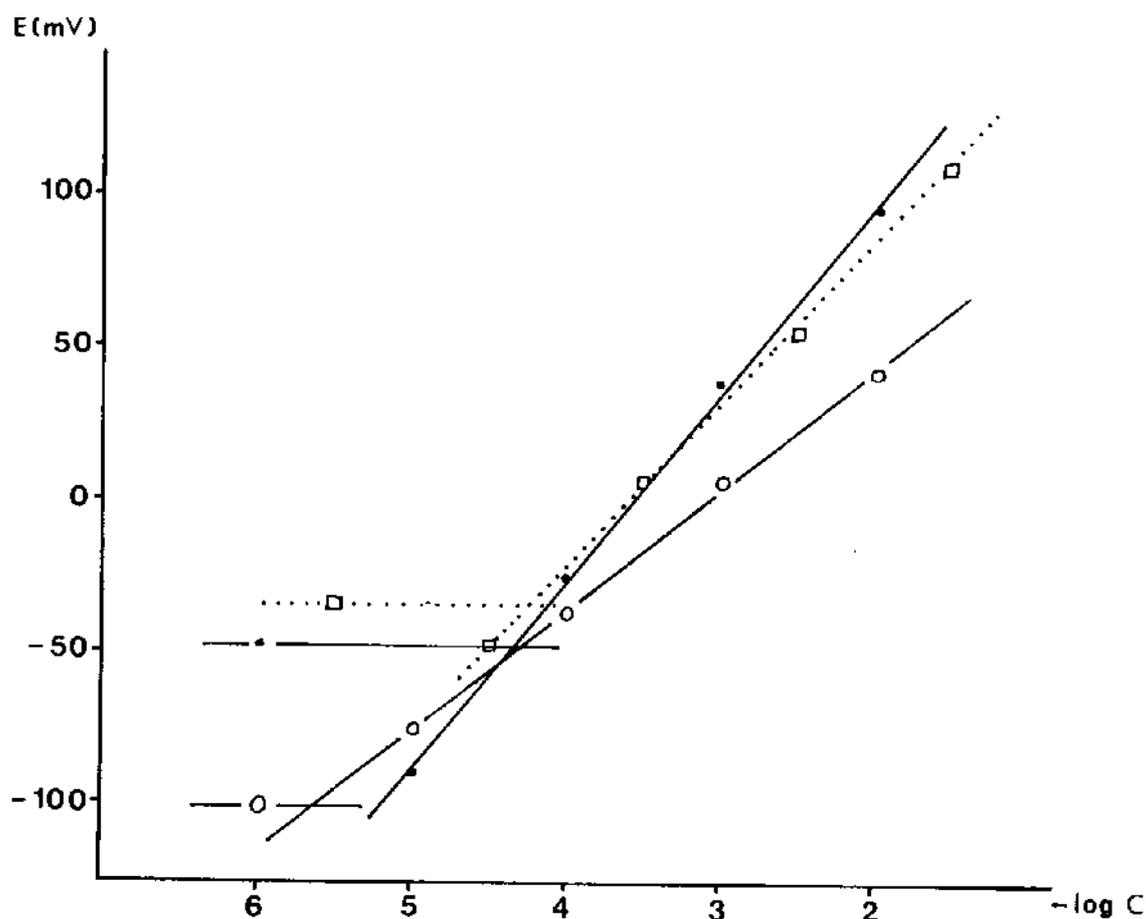


Figura 24 - Comparação entre as curvas de calibração da **membrana 24** (— o — o —) (copolímero etileno/acetato de vinila 0,35 g, tetrafenilborato de tiamulina 0,085 g, clorofórmio 6,0 ml), **membrana 25** (..... □ □) (copolímero etileno/acetato de vinila 0,35 g, tetrafenilborato de tiamulina 0,085 g, clorofórmio 4,0 ml, dioctilftalato 1,0 ml, nitrobenzeno 0,1 ml) e **membrana 27** (— • —) (copolímero etileno/acetato de vinila 0,35 g, fosfotungstato de tiamulina 0,085 g, clorofórmio 4,0 ml, dioctilftalato 1,0 ml, nitrobenzeno 1,0 ml). Utilizando soluções de hidrogenofumarato de tiamulina preparadas em água destilada nas concentrações $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

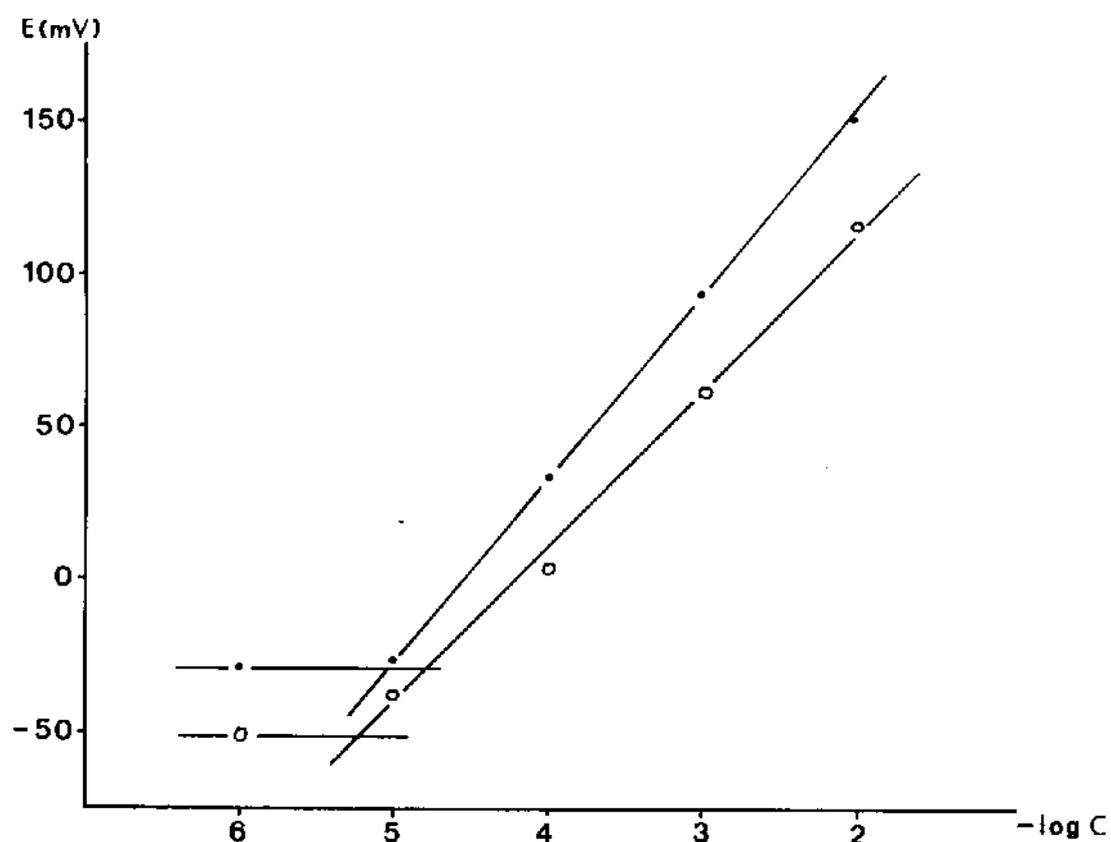


Figura 25 - Comparação entre as curvas de calibração da **membrana 28** (— o — o —) (copolímero etileno/acetato de vinila 0,35 g, tetrafenilborato de tiamulina 0,085 g, éter de 2-nitrofeil octila 0,64 g, clorofórmio 5,0 ml) e **membrana 29** (— • — •) (copolímero etileno/acetato de vinila 0,35 g, fosfotungstato de tiamulina 0,085 g, éter de 2-nitrofenil octila 0,64 g, clorofórmio 5,0 ml). Utilizando soluções de hidrogenofumarato de tiamulina preparadas em água destilada nas concentrações $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

As curvas de calibração das membranas 30 e 31 são comparadas na Figura 26. Nessas membranas foi utilizado dibutilftalato como plastificantes e os pares iônicos foram tetrafenilborato de tiamulina e fosfotungstato de tiamulina, respectivamente. Com a membrana 30 foi encontrado coeficiente angular de 57,6 mV/década de concentração e limite de detecção de $3,9 \times 10^{-6}$ mol/L. Já com a membrana 31, o coeficiente angular foi de 61,8 mV/década de concentração e $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L como limite de detecção.

Como pode ser observado na Tabela 3, a maior influência no desempenho das membranas de EVA estudadas é o par iônico. Os melhores coeficientes angulares foram conseguidos com a utilização de fosfotungstato de tiamulina. Os plastificantes empregados não tiveram grande influência nos resultados mas, embora EVA forme filmes sem a utilização de plastificantes, no caso dos eletrodos avaliados, eles devem estar presentes.

Uma das vantagens do copolímero EVA é que ele pode ser dissolvido em uma gama grande de solventes, o que permite o uso de alternativas ao tetrahidrofurano e ciclohexanona comumente utilizados com PVC. EVA pode ser dissolvido em tetracloreto de carbono, clorofórmio, diclorometano, p-xileno, tetrahidrofurano e tolueno.

Do ponto de vista de estabilidade de resposta, o uso de EVA ao invés de PVC causa uma excessiva susceptibilidade do eletrodo à eletricidade estática quando a membrana fica muito dura. Este problema pode ser contornado pelo controle do nível de secagem da membrana. Excelente estabilidade de potencial pode ser obtida limitando-se a secagem a um nível suficiente para garantir o mínimo de resistência mecânica da membrana no eletrodo, o que é geralmente conseguido após 3 horas de secagem (32).

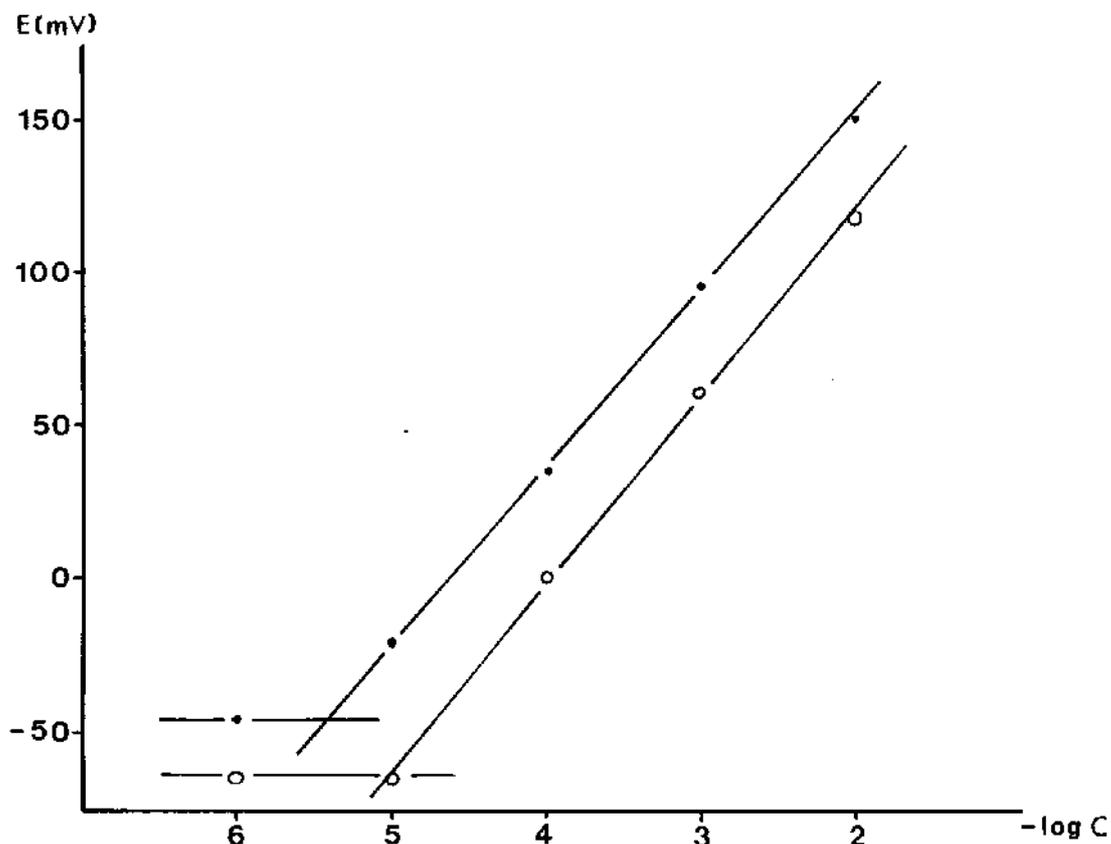


Figura 26 - Comparação entre as curvas de calibração da **membrana 30** (— ● — ● —) (copolímero etileno/acetato de vinila 0,35 g, tetrafenilborato de tiamulina 0,08 g, dibutilftalato 0,36 g, clorofórmio 6,0 ml) e **membrana 31** (— ○ — ○ —) (copolímero etileno/acetato de vinila 0,35 g, fosfotungstato de tiamulina 0,08 g, dibutilfatalato 0,36 g, clorofórmio 6,0 ml). Utilizando soluções de hidrogenofumarato de tiamulina preparadas em água destilada nas concentrações $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

Tabela 3 - Comparação entre a performance das membranas de EVA preparadas com diferentes plastificantes e pares iônicos

PLASTIFICANTE	PAR IÔNICO	LIMITE DE DETECÇÃO (mol/L)	COEFICIENTE ANGULAR (mV/década de concentração)
-	TFB	$2,5 \times 10^{-6}$	35,5
DBF	TFB	$3,9 \times 10^{-6}$	57,6
NB + DOF	TFB	$1,9 \times 10^{-5}$	52,9
NFO	TFB	$7,9 \times 10^{-6}$	51,3
-	FOSFO	-	-
DBF	FOSFO	$1,0 \times 10^{-5}$	61,8
NB + DOF	FOSFO	$4,5 \times 10^{-5}$	61,9
NFO	FOSFO	$1,0 \times 10^{-5}$	58,9

DBF = dibutilftalato

NB + DOF = mistura nitrobenzeno e dioctilftalato

NFO = éter de 2-nitrofeniloctila

TFB = tetrafenilborato de tiamulina

FOSFO = fosfotungstato de tiamulina

De todas as membranas preparadas, foram escolhidas a membrana 10 (PVC, fosfotungstato de tiamulina, éter de 2-nitrofenil octila e tetrahydrofurano) e membrana 30 (EVA, tetrafenilborato de tiamulina, dibutilftalato e clorofórmio) para serem empregadas nas análises das formulações veterinárias e terem seus resultados comparados estatisticamente com aqueles obtidos pelos métodos comumente utilizados em análise de rotina: titulação em meio não aquoso para hidrogenofumarato de tiamulina puro e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para as formulações comerciais.

A formulação A, solução aquosa contendo 12,5% de hidrogenofumarato de tiamulina, foi analisada por potenciometria direta. Através da Tabela 4 é possível observar que com a membrana 30 e sulfato de sódio 0,10 M, consegue-se os mesmos resultados do que com HPLC mas com estimativa de desvio padrão menor. Já com as outras membranas houve diferença significativa, provavelmente devido à interferência dos excipientes empregados nesta formulação.

Tabela 4 - Comparação entre os resultados obtidos com os métodos cromatografia líquida de alto desempenho e potenciometria direta com eletrodo seletivo a tiamulina na análise da Formulação A

	MÉTODO				
	HPLC	EIS membr 10*	EIS membr 30*	EIS membr 10**	EIS membr 30**
Conc. real (% do teórico)	97,1	84,4	109,3	109,3	97,1
Desvio Padrão Abs.	0,39	0,12	0,64	0,25	0,21
Desvio Padrão Relativo	0,40%	0,10%	0,75%	0,21%	0,20%
Limite de Confiança Superior (P = 0,95, f = 7)	0,70	0,22	1,15	0,52%	0,43

n = 8

* determinações realizadas em água destilada

** determinações realizadas em Na₂SO₄ 0,10 M

EIS = eletrodo ion-seletivo

A fim de se tentar eliminar a interferência causada pelos excipientes, dois métodos de extração foram testados. Utilizando o método de extração da AOAC (49) conseguiu-se teor de $7,1 \times 10^{-5}$ mol/L e com o método da AOAC modificado $6,3 \times 10^{-5}$ mol/L para teor teórico de $3,3 \times 10^{-4}$ mol/L.

Nenhum eletrodo seletivo a íons responde exclusivamente ao íon para o qual ele foi desenvolvido para medir, embora o eletrodo tenha melhor resposta para o íon primário do que para os outros íons presentes. Se um outro íon, interferente, estiver presente em grande concentração quando comparado com o íon primário, a resposta do eletrodo terá contribuição tanto do íon primário como do íon interferente. O grau de seletividade do eletrodo para o íon primário *i*, com relação ao íon interferente *j* é expresso pelo coeficiente de seletividade potenciométrico, K_{ij}^{pot} , que é definido pela equação geral do potencial do eletrodo (pag. 18).

O valor de K^{pot}_{ij} nunca é constante para todas as atividades de i e j , embora ele seja algumas vezes constante para uma dada relação de atividade de i e j . Essas variações no K^{pot}_{ij} estão associadas com o mecanismo de resposta do eletrodo e com mudanças no ambiente dos íons em solução. Esses fatores fazem com que K^{pot}_{ij} dependa do método utilizado para sua determinação.

Vários métodos têm sido descritos para a determinação do coeficiente de seletividade. Os métodos se enquadram em duas categorias: a - método das soluções separadas e b - método das soluções misturadas.

No método das soluções separadas, o potencial do eletrodo é medido primeiro na solução contendo o íon primário i (sem a presença do interferente j) e depois em solução do interferente j (sem i presente). O K^{pot}_{ij} é calculado a partir das atividades de i e j nas diferentes soluções e do potencial do eletrodo. Embora este método seja simples de realizar, ele não é recomendado porque os resultados não são confiáveis. Os processos que determinam o potencial na superfície da membrana do eletrodo são tais que resultados substancialmente diferentes são frequentemente obtidos em soluções puras separadas de i e j dos obtidos com a mistura das duas soluções. Este método também não é satisfatório porque as condições de determinação do K^{pot}_{ij} não reproduzem as condições das amostras, as quais contém i e j .

Por estas razões, o método das soluções misturadas é preferível. A medida de potencial do eletrodo é feita em soluções contendo diferentes atividades de i e j . A fim de simplificar a interpretação dos resultados, normalmente se prepara soluções com a_j constante e varia-se a_i ou mantém-s a_i constante e se varia a_j . Convencionalmente, o primeiro método é o preferível porque corresponde à situação encontrada nas amostras.

Se soluções com a_j variável são preparadas e os potenciais do eletrodo são medidos nessas soluções, o gráfico potencial do eletrodo versus $-\log C$ será similar ao da Figura 17 (pag.76). O limite

menor de a_i , nessas soluções deverá ser definido em função do limite nerstiano do eletrodo em uma solução pura de i , caso contrário os resultados serão duvidosos. Na região PQ do gráfico, a resposta do eletrodo ao íon primário é nerstiana. À medida que a_i diminui, o potencial do eletrodo é mais afetado pela atividade de j e na região QR, o eletrodo mostra uma resposta mista tanto para i como para j . Do ponto R até S o eletrodo responde inteiramente à a_j constante e o efeito da diminuição de a_i não é detectado (8).

No caso da formulação A, o K^{pot}_{ij} foi determinado para cada excipiente, mantendo suas concentrações constantes e variando-se a concentração de hidrogenofumarato de tiamulina de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L. Os valores de K^{pot}_{ij} encontrados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação entre os valores de K^{pot}_{ij} , obtidos com as membranas 10 e 30 na análise da formulação A

EXCIPIENTE	COEFICIENTE DE SELETIVIDADE	
	K^{pot}_{ij}	
	MEMBRANA 10	MEMBRANA 30
PROPIIL HIDROXIBENZOATO ($2,8 \times 10^{-2}$ mol/L)	$1,8 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-3}$
METIL HIDROXIBENZOATO ($2,9 \times 10^{-2}$ mol/L)	$1,2 \times 10^{-4}$	$6,1 \times 10^{-5}$
ÁCIDO CÍTRICO ($3,2 \times 10^{-2}$ mol/L)	$6,1 \times 10^{-5}$	$5,3 \times 10^{-5}$
HIDROGENO FOSFATO DISSÓDICO ($6,9 \times 10^{-2}$ mol/L)	$1,6 \times 10^{-5}$	$4,4 \times 10^{-4}$
ETANOL ($1,7 \times 10^{-1}$ mol/L)	$6,1 \times 10^{-6}$	$6,1 \times 10^{-6}$

Os valores de K^{pot}_{ij} devem ser tratados com cautela e muitas vezes são preteridos, preferindo-se analisar as curvas potencial do eletrodo versus $-\log C$, as quais possibilitam uma visualização melhor do nível de interferência esperado ou da quantidade de interferente que pode ser tolerado nas amostras. Devido a falhas de informação com relação às condições de determinação do K^{pot}_{ij} , o uso de valores desse coeficiente deve ser limitado à estimativa da ordem de grandeza da seletividade e à comparação dos valores de K^{pot}_{ij} para os diferentes íons interferentes. Os valores de K^{pot}_{ij} não devem ser utilizados para corrigir as leituras de potencial da amostra devido ao efeito de concentrações conhecidas dos íons interferentes, a não ser que o valor de K^{pot}_{ij} tenha sido determinado com padrões de composição muito similar à das amostras (8).

No caso da formulação B, grânulos revestidos contendo 45% de hidrogenofumarato de tiamulina, conseguiu-se encontrar 100% do teor teórico através de potenciometria direta sem prévio tratamento ou extração da amostra. A Tabela 6 mostra a comparação dos resultados obtidos com os eletrodos seletivos com os resultados obtidos por cromatografia líquida de alto desempenho. Os desvios padrão encontrados com os eletrodos são muito menores do que os obtidos pela técnica cromatográfica.

Tabela 6 - Comparação entre os resultados obtidos com os métodos cromatografia líquida de alto desempenho e potenciometria direta com eletrodo seletivo a tiamulina na análise da Formulação B

	MÉTODO				
	HPLC	EIS membr 10*	EIS membr 30*	EIS membr 10**	EIS membr 30**
Conc. real (% do teórico)	97,6	99,9	100,0	99,9	100,0
Desvio Padrão Abs.	2,67	0,13	0,18	0,33	0,09
Desvio Padrão Relativo	2,67%	0,12%	0,26%	0,35%	0,10%
Limite de Confiança Superior (P = 0,95, f = 7)	4,80	0,23	0,32	0,59	0,16

n = 8

* determinações realizadas em água destilada

** determinações realizadas em Na₂SO₄ 0,10 M

EIS = eletrodo íon-seletivo

Para a análise de hidrogenofumarato de tiamulina na forma pura, o método de escolha é titulação em meio não aquoso, utilizando ácido perclórico em ácido acético como titulante (9). Os resultados obtidos na análise de hidrogenofumarato de tiamulina puro por potenciometria direta com eletrodos com as membranas 10 e 30 foram comparados com os obtidos por titulação em meio não aquoso e são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Comparação entre os resultados obtidos com os métodos titulação em meio não aquoso e potenciometria direta com eletrodo seletivo a tiamulina na análise de hidrogenofumarato de tiamulina puro

	MÉTODO				
	Titul. meio não aquoso	EIS membr 10*	EIS membr 30*	EIS membr 10**	EIS membr 30**
Conc. real (% do teórico)	100,1	99,8	99,9	100,1	99,7
Desvio Padrão Abs.	0,21	0,26	0,47	0,21	0,11
Desvio Padrão Relativo	0,21%	0,24%	0,69%	0,23%	0,12%
Limite de Confiança Superior (P = 0,95, f = 7)	0,38	0,50	0,84	0,38	0,20

n = 8

* determinações realizadas em água destilada

** determinações realizadas em Na₂SO₄ 0,10 M

EIS = eletrodo ion-seletivo

A diferença entre os teores obtidos por essas duas técnicas não é significativa. As estimativas de desvio padrão são muito semelhantes, exceto para a membrana 30 com sulfato de sódio 0,10 M, com a qual foi encontrada estimativa de desvio padrão menor.

5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que hidrogenofumarato de tiamulina pode ser determinado quantitativamente de uma maneira simples, rápida e barata, através do uso de eletrodos seletivos.

As membranas que apresentaram os melhores resultados foram aquelas construídas utilizando-se PVC ou o copolímero etileno/acetato de vinila (EVA).

Membranas de EVA só apresentaram resposta nernstiana com a utilização de plastificantes. Embora plastificantes tenham que ser empregados nas membranas de EVA e PVC, a natureza desses compostos não teve grande influência na performance das mesmas. As diferenças mais marcantes foram observadas variando-se o par iônico, que foi um fator preponderante na resposta dos eletrodos. Os melhores resultados foram observados com fosfotungstato de tiamulina. Isto ocorreu, provavelmente, porque fosfotungstato de tiamulina é mais hidrofóbico e tem maior estabilidade que tetrafenilborato de tiamulina.

Membranas de acetato de celulose atuaram somente como separador físico, não se prestando para a construção de membranas seletivas. No entanto, membrana líquida constituída de nitrobenzeno contendo o par iônico tetrafenilborato de tiamulina contida por membrana de acetato de celulose apresentou coeficiente angular de 55 mV/década de concentração. O emprego do par iônico fosfotungstato de tiamulina resultou em membrana que não segue a equação de Nernst.

Para a maioria das membranas estudadas, resposta nernstiana foi obtida em uma faixa bem ampla de concentração, de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de hidrogenofumarato de tiamulina.

O método para a determinação quantitativa de tiamulina com eletrodos seletivos desenvolvido neste trabalho apresenta, como vantagem adicional, estimativa de desvio padrão menor do que a encontrada com análises por cromatografia líquida de alto desempenho. Este fato evidencia que determinações potenciométricas de tiamulina

com eletrodos seletivos têm maior precisão do que determinações utilizando HPLC. Já na comparação com titulação em meio não aquoso, as estimativas de desvio padrão são muito semelhantes e as precisões são equivalentes.

Os resultados obtidos na análise quantitativa de formulações contendo hidrogenofumarato de tiamulina mostram que, de acordo com a complexidade da amostra, será necessário estabelecer processo específico de extração, a fim de possibilitar a análise de amostras por potenciometria direta com eletrodos seletivos. Os excipientes empregados nas formulações têm um papel muito importante na escolha do método analítico e na definição do pré tratamento da amostra. Mas, dependendo da formulação, é possível a utilização de eletrodos seletivos na determinação do teor do princípio ativo empregando somente uma simples diluição da amostra em solvente adequado. Este fato abre um leque muito grande de oportunidades. Com o uso de potenciômetros portáteis, movidos à bateria, é possível a realização das análises no campo. No caso do antibiótico tiamulina, que pode ser administrado para animais através da água de bebida, é possível o acompanhamento da estabilidade das formulações ou da adequação da dosagem terapêutica no próprio local, sem a necessidade do envio das amostras para um laboratório distante e da espera dos resultados que, com o uso de eletrodos seletivos, podem ser imediatos.

6 - PERSPECTIVAS

Os bons resultados encontrados ensejam à otimização dos eletrodos construídos. Isto poderá ser conseguido investigando-se novos pares iônicos, como por exemplo batofenantrolina-níquel(II) ou reinecato de amônia entre outros.

A literatura apresenta dados quanto à estabilidade de sais de tetrafenilborato mas, quanto aos sais de fosfotungstato, até o momento não se tem nenhuma informação. Como a utilização de fosfotungstato de tiamulina apresentou melhores resultados, seria interessante verificar como este par iônico se comporta em diferentes meios e como isso afeta a resposta dos eletrodos.

A utilização de EVA, em substituição ao PVC, apresenta uma série de vantagens, entre elas está que este polímero forma membranas sem o uso de plastificantes, membranas estas que são seletivas somente a ânions e não a cátions. O estudo de meios que tornassem essa membrana seletiva a cátions, tornando-a mais iônica, talvez propiciasse uma vida mais longa às membranas, uma vez que não haveria problemas como perda do plastificante por evaporação ou lixiviação.

Em vista da boa precisão encontrada com o uso de eletrodos ion-seletivos na análise de formulações contendo o antibiótico tiamulina, estudos envolvendo melhores métodos de extração seriam recompensadores. Nas formulações aonde não se conseguissem bons resultados com esses processos extrativos, a investigação do uso de eletrodos seletivos em titulações potenciométricas poderia trazer vantagens adicionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 - AHMED, M. A. & ABBAS, A. B. - Construction and evaluation of a novel glafenine ion-selective electrode. Anal. Lett., New York, v.28, n.1, p. 13-26, 1995.
- 2 - ANDRIEUX, C. P., AUDEBERT, P., DIVISIA-BLOHORN, B., LINQUETTE-MAILLET, S. - A new glucose sensor made of a Nafion-gel-layer covered carbon paste. J. Electroanal. Chem., Lausanne, v.353, p. 289 - 296, 1993.
- 3 - ARMSTRONG, R. D. & HORVAI, G. - Properties of PVC based membranes used in ion-selective electrodes. Electrochim. Acta, Oxford, v.35, n.1, p. 1 - 7, 1990.
- 4 - ARRIGAN, D. W. M., DEASY, B., GLENNON, J. D., JOHNSTON, B., SVEHLA, G. - Incorporation of hydroxamic acid ligands into Nafion film electrodes. Analyst, London, v.118, p. 355 - 359, 1993.
- 5 - ASSUBAIE, F. N., MOODY, G. J., OWUSU, R. K., THOMAS, J. D. R. - Membrane electrodes of herbicidal and pharmaceutical interest. Port. Electrochem. Acta, v.5, p. 103 - 124, 1987. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.108, n.abstr. 200999t, 1988.
- 6 - AUBECK, R., BRÄUCHLE, C., HAMPP, N. - Indomethacin ion-selective electrode based on a bis(triphenylphosphoranylidene)ammonium-indomethacin complex. Analyst, London, v.116, p. 811 - 814, 1991.

*De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas e local de publicação dos títulos de periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SOURCE INDEX (CASSI), 1990.

- 7 - AUDEBERT, P., DIVISIA-BLOHORN, B., ALDEBERT, P., MICHALAK, F. - Electrochemistry of hydrophobic Nafion gels. Part 3. preconcentration and electrochemical detection of cationic and neutral organic compounds in hydrophobic Nafion gels made from various n-alkylphosphates. J. Electroanal. Chem., Lausanne, v.322, p. 301 - 309, 1992.
- 8 - BARLEY, P. L. - Analysis with ion-selective electrodes. 2.ed. London: Heyden, 1980, 247 p.
- 9 - BIOCHIMIE G. m. b. H. - Internal control procedure, 326.8, 1992.
- 10 - BLOOD, D. C., RADOSTITS, O. M., ARUNDEL, J. H., GAY, C. C. - Veterinary medicine. London: Baillière Tindal, 1989. p. 153.
- 11 - BOUKLOUZE, A. A., EL-JAMMAL, A., PATRIARCHE, G. J. - Electrodes à membrane polymère sélective de certains modèles de médicaments. Analisis, Paris, v.19, p. 27 - 30, 1991.
- 12 - BOUKLOUZE, A. A., EL-JAMMAL, A., PATRIARCHE, G. J., CHRISTIAN, G. D. - New modified polymeric electrodes selective to local anesthetic compounds. J. Pharm. Biomed. Anal., Oxford, v.9, n.5, p. 393 - 9, 1991.
- 13 - BUCK, R. P. - Theory and principle of membrane electrodes. In: FREISER H. - Ion-selective electrodes in analytical chemistry. New York: Plenum Press, 1978. v.1. p. 1 - 72.
- 14 - BUCK, R. P. & COSOFRET, V. V. - Recommended procedures for calibration of ion-selective electrodes. Pure Appl. Chem., London, v.65, n.8, p. 1849 - 58, 1993.
- 15 - BUNACIU, A. A., IONESCU, M. S., STEFAN, R. I., IOAN, I., ABOUL-ENEIN, H. Y. - Mianserin ion-selective membrane electrode and its pharmaceutical applications. Anal. Lett., New York, v.27, n.9, p. 1647 - 58, 1994.

- 16 - BUNACIU, A. A., IONESCU, M. S., BUDISTEANU, N., DINULESCU, A., COSOFRET, V. V. - New BF_4^- and ClO_4^- -selective membrane electrodes and their pharmaceutical applications. Talanta, London, v.39, n.8, p. 1001 - 6, 1992.
- 17 - BUNACIU, A. A., IONESCU, M. S., PALIVAN, C., COSOFRET, V. V. - Amitriptyline-selective plastic membrane sensors and their pharmaceutical applications. Analyst, London, v.116, p. 239 - 243, 1991.
- 18 - BYWATER, R. J. - Antibiotics of miscellaneous structure. In: BRANDER, G. C., PUGH, D. M., BYWATER, R. J. - Veterinary applied pharmacology and therapeutics. London: Baillière Tindall, 1982. p. 416.
- 19 - _____ - The alimentary canal. In: BRANDER, G. C., PUGH, D. M., BYWATER, R. J., JENKINS, W. L. - Veterinary applied pharmacology and therapeutics. 5.ed. London: Baillière Tindall, 1991. p. 218.
- 20 - _____ - Miscellaneous antibacterials including chloramphenicol, tiamulin, polymyxins, nitrofurans, quinolones, etc. In: BRANDER, G. C., PUGH, D. M., BYWATER, R. J., JENKINS, W. L. - Veterinary applied pharmacology and therapeutics. 5.ed. London: Baillière Tindall, 1991. p. 477 - 78.
- 21 - CAMPANELLA, L., CARRARA, D., CORDATORE, M., SALVI, A.M., SANMARTINO, M. P., TOMASSETTI, M. - New methods of analysis and control of biological fluids, drugs and foods. Dev. Anal. Meth. Pharm., Biomed., Forensic Sci., [Proc. Int. Conf.], p. 19 - 28, 1986. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.109, n.abstr. 225984t, 1988.
- 22 - CAMPANELLA, L. & TOMASSETTI, M. - Sensors in pharmaceutical analysis. Sel. Electrode Rev., v.11, n.1, p. 69 - 110, 1989. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.111, n.abstr. 190514b, 1989.

- 23 - CARLI, S. & GIULIONI, A. - Tiamulina: un nuovo antibiotico in medicina veterinaria. Riv. Zoot. Vet., Milano, v.8, n.4, p. 251- 266, 1980.
- 24 - CHRISTIE, I. M., TRELOAR, P. H., VADGAMA, P. - Plasticized poly(vinyl chloride) as a permeselective barrier membrane for high-selectivity amperometric sensors and biosensors. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, v.269, p. 65 - 73, 1992.
- 25 - COMER, J. C. - pH and ion-selective electrodes. Technical manual. 45 p.
- 26 - CORTANI, G. - Extraction of fat-soluble products from fatty matrixes by solid-phase extraction. Lab. 2000 {Duemila}, v. 2, n.12, p. 8-9, 11, 1988. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.113, n. abstr. 120887t, 1990.
- 27 - COSGROVE, R. F. & JONES, G. T. - Rapid microbiological assay for tiamulin in animal feeds based on the measurement of pH. Proc. Anal. Div. Chem. Soc., v.16, n.11, p. 320 - 2, 1979. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.92, n.abstr. 127010h, 1980.
- 28 - COSOFRET, V. V. - Membrane electrodes in drug-substance analysis. Oxford: Pergamon Press, 1982. 362 p.
- 29 - COSOFRET, V. V. & BUCK, R. P. - Phenothiazine drug poly(vinyl chloride) matrix membrane electrodes and their use in pharmaceutical analysis. Analyst, London, v.109, p. 1321 - 25, 1984.
- 30 - COSOFRET, V. V. - Drug membrane sensors and their pharmaceutical applications. Trends Anal. Chem., Amsterdam, v.10, n.9, p. 298-301, 1991.
- 31 - COSOFRET, V. V. & BUCK, R. P. - Recent advances in pharmaceutical analysis with potentiometric membrane sensors. Crit.Rev. Anal. Chem., Boca Raton, v.24, n.1, p. 1 - 58, 1993.

- 32 - EL-JAMMAL, A., BOUKLOUZE, A. A., PATRIARCHE, G. J., CHRISTIAN, G. D. - Use of ethylene-vinyl acetate as a new membrane matrix for calcium ion-selective electrode preparation. Talanta, London, v.38, n.8, p. 929 - 935, 1991.
- 33 - GORELOV, I. P. & TOLOKNOVA, T. V. - Application of ion-selective electrodes to the determination of dimedrol. J. Anal. Chem., v.50, n.3, p. 271-3, 1995. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.122, n.abstr. 248501, 1995.
- 34 - GÜBITZ, G. & AMANN, G. - Fluorimetrische Bestimmung terttiärer Amine mittels ionenpaarextraktion mit Acridon-2-sulfonsäure. Mikrochim. Acta, Wien, v.2, n.5-6, p. 355 - 364, 1979.
- 35 - HASSAN, S. S. M., ABDEL-AZIZ, R. M., ABDEL-SAMAD, M. S. - Plastic membrane electrode for selective determination of Diclofenac (Voltaren) in pharmaceutical preparations. Analyst, London, v. 119, p. 1993-1996, 1994.
- 36 - HÖGENAUER, G. - Tiamulin and pleuromutilin. In: HAHN, F. E. - Antibiotics. New York: Springer-Verlag, 1979. v.5, part 1, p. 344 - 360.
- 37 - HORVATH, V. & HORVAI, G. - Selectivity of plasticized poly(vinyl chloride)-based ion-selective electrodes. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, v.282, p. 259 - 264, 1993.
- 38 - HOWARD, D. & COWEN, T. - Determination of tiamulin hydrogen fumarate in animal feeds using high-performance liquid chromatography. Analyst, London, v.107, p. 319 - 323, 1982.
- 39 - HUANG, S. & YU, R. - Development of chemically modified electrodes and their application in analytical chemistry. Huaxue Chuanganqi, v.13, n.1, p. 1 - 10, 31, 1993. Apud: Anal. Abstr., London, v.55, n.abstr. 12A210, 1993.

- 40 - JAYA, S., RAO, T. P., RAO, G. P. - Heterogenous polymer based liquid membrane electrode for the determination of cinchonine. J. Electrochem. Soc. India, Bangalore, v.35, n.4, p. 301 - 3, 1986.
- 41 - JENKINS, W. L. - Antimicrobial therapy. In: HOWARD, J. L. - Current veterinary therapy. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. v. 2. p. 20.
- 42 - JINBO, K., MOMOSE, R., MARUYAMA, T., MATSUMOTO, M. - Bioassay method for tiamulin in pork. Kenkyu Nenpo-Tokyo-toritsu Eisei Kenkyusho, v.40, p. 133 - 6, 1989. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.113, n.abstr. 22298g, 1990.
- 43 - KAIFER, A. E. & BARD, A. J. - Polymer films on electrodes. 20. An ESR study of several spin probes incorporated into Nafion. J. Phys. Chem., Washington, v. 90, p. 868 - 873, 1986.
- 44 - LABUDA, J. - Chemically modified electrodes as sensors in analytical chemistry. Sel. Electrode Rev., v.14, n.1, p. 33 - 86, 1992. Apud: Anal. Abstr., London, v.55, n.abstr. 9A99, 1993.
- 45 - LENG, Z., HU, X., JIANG, X., YU, R. - Determination of trace diltiazem with Nafion modified glassy carbon electrode. Fenxi Huaxue, v. 23, n. 3, p. 332-5, 1995. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v. 122, n.abstr. 223042, 1995.
- 46 - LIMA, J. L. F. C. & MACHADO, A. A. S. C. - Eletrodos seletivos de membrana cristalina heterogênea com suporte de resina condutora. Quim. Nova, São Paulo, v. 3, n.1, p. 2 - 4, 1980.
- 47 - _____ - Construção de eletrodos de membrana de PVC (condutor móvel) com suporte de resina condutora. Quim. Nova, São Paulo, v.10, n.2, p. 137 - 139, 1987.

- 48 - MA, T. S., HASSAN, S. S. M. - Analysis of pharmaceutical preparations using ion-selective electrodes. In: Organic analysis using ion-selective electrodes. London: Academic Press, 1982. v.2. p. 169 - 199.
- 49 - MARKUS, J. R. & SHERMA, J. - Method I. Liquid chromatographic determination of tiamulin hydrogen fumarate in feed premixes. J. AOAC Int., Washington, v.76, n.2, p. 444 - 446, 1993.
- 50 - _____ - Method II. Liquid chromatographic determination of tiamulin hydrogen fumarate in tiamulin-poly(vinyl chloride) formulations. J. AOAC Int., Washington, v.76, n.2, p. 447 - 448, 1993.
- 51 - _____ - Method III. Liquid chromatographic determination of tiamulin hydrogen fumarate in complete swine meal feeds. J. AOAC Int., Washington, v.76, n.2, p. 449 - 450, 1993.
- 52 - _____ - Method IV. Gas chromatographic determination of tiamulin residues in swine liver. J. AOAC Int., Washington, v.76, n.2, p. 451 - 458, 1993.
- 53 - MARTIN, C. R., RUBISTEINM I., BARD, A. J. - Polymer films on electrodes. 9. Electron and mass transfer in Nafion films containing $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. J. Am. Chem. Soc., Washington, v. 104, p. 4817 - 4824, 1982.
- 54 - MOODY, G. J. & THOMAS, J. D. R. - Poly(vinyl chloride) matrix membrane ion-selective electrodes. In: FREISER, H. - Ion-selective electrodes in analytical chemistry. New York: Plenum Press, v.1. p. 287 - 309.
- 55 - _____ - Development and publication of work with selective ion-sensitive electrodes. Talanta, Oxford, v.19, p. 623 - 39, 1972.

- 56 - NAGY, E. P. & PETHO, G. - Determination of amine drugs by using ion-selective electrodes. Gyogyszereszet, v.32, n.5, p. 231 - 239, 1988. Apud: Anal. Abstr., London, v. 51, n.abstr. 5E12, 1989.
- 57 - _____ - Determination of amine drugs by using ion-selective electrodes. Gyogyszereszet, v.32, n.7, p. 349 - 355, 1988. Apud: Anal. Abstr., London, v. 51, n.abstr. 5E13, 1989.
- 58 - OWEN, J. - Ionic conductivity. In: ALLEN, G. - Comprehensive polymer science. Oxford: Pergamon Press, 1989. p. 669 - 686.
- 59 - PAPAZOGLU, A. M., CHRISTOPOULOS, T. K., DIAMANDIS, E. P., KOUPPARIS, M. A. - Dissolution studies of drug formulations using ion-selective electrodes as sensors in an air-segmented continuous flow analyzer. J. Pharm. Sci., Washington, v.76, n.9, p. 724 - 730, 1987.
- 60 - PATRIARCHE, G. J. - New trends in modified electrodes: applications to drug analysis. J. Pharm. Biomed. Anal., v.4, n.6, p. 789 - 797, 1986. Apud: Anal. Abstr., London, v. 48, n.abstr. 7E4, 1986.
- 61 - PEKLI, M. N., NAGY, A., NAGY, G. - Studies with potentiometric drug sensitive electrodes. I - preparation and work with doxycycline antibiotic sensors. Magy. Kem. Foly., v. 101, n. 1, p. 12 - 16, 1995. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v. 122, n. abstr. 248468, 1995.
- 62 - PRANITIS, D. M., DIAZ, M. T., MEYERHOFF, M. E. - Potentiometric ion-, gas-, and bio-selective membrane electrodes. Crit. Rev. Anal. Chem., Boca Raton, v.23, n.3, p. 163 - 186, 1992.
- 63 - PRESCOTT, J. F. & BAGGOT, J. D. - Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Boston: Blackwell, 1988. p. 173 - 176.

- 64 - PUNGOR, E. - Working mechanism of ion-selective electrodes. Pure Appl. Chem., London, v.64, n.4, p. 503 - 507, 1992.
- 65 - RIZK, M. S. - Metformin-selective PVC membrane electrode based on metformin phosphomolybdate ion pair. Egypt. Anal. Chem., v. 3, n. 1, p. 180 - 4, 1994. apud: Chem. Abstr., Columbus, v. 122, n.abstr. 248483, 1995.
- 66 - ROSATZIN, T., BAKKER, E., SUZUKI, K., SIMON, W. - Lipophilic and immobilized anionic additives in solvent polymeric membranes of cation-selective chemical sensors. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, v.280, p. 197 - 208, 1993.
- 67 - SANDOZ - Tiamutin - manual de entrenamiento sobre el empleo del tiamutin. 2.ed. Basilea: Sandoz Ltd., Pharmaceutical Division, Animal Health and Nutrition, 1984. 82 p.
- 68 - _____ - Tiamutin - Basic product information. 7.ed. Basilea: Sandoz Ltd., Pharmaceutical Division, Animal Health and Nutrition, 1986. 56 p.
- 69 - _____ - Tiamutin. 2.ed. Basilea: Sandoz Ltd., Pharmaceutical Division, Animal Health and Nutrition, 1990. 31 p.
- 70 - SMITH, B. P. - Large animal internal medicine. St. Louis: C. V. Mosby, 1990. p. 592.
- 71 - SVANCARA, I. & VYTRAS, K. - Voltammetry with carbon paste electrodes containing membrane plasticizers used for PVC-based ion-selective electrodes. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, v.273, p. 195 - 204, 1993.
- 72 - THOMAS, J. D. R. - Ion-selective electrodes. From glass to crystals and crowns. In: STOCK, J. T. & ORNA, M. V. - Electrochemistry, past and present. Washington: American Chemical Society, ACS Symposium Series 390, 1988. p. 303 - 338.

- 73 - _____ - Selective membrane electrode for analysis. Analyst, London, v.119, p. 203 - 208, 1994.
- 74 - UNITED STATES PHARMACOPEIA. 23 ed., Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 1994, p. 1690 - 1696.
- 75 - YIM, H.-K., KIBBEY, C. E., MA, S. C., KLIZA, D. M., LUI, D., PARK, S.-B., ESPADAS TORRE, C., MEYERHOFF, M. E. - Polymer membrane-based ion-, gas- and bio-selective potentiometric sensors. Biosens. Bioelectron., v.8, n.1, p. 1 - 38, 1993. Apud: Anal. Abstr., London, v.55, n.abstr. 9A253, 1993.
- 76 - WANG, N. - Application of electroanalytical chemistry in pharmaceutical analysis. Yaowu Fenxi Zazhi, v.6, n.4, p. 240 - 243, 1986. Apud: Anal. Abstr., London, v. 49, n.abstr.5E2, 1987.
- 77 - WIDMER, H. M. - Ion-selective electrodes and ion optrodes. Anal. Methods Instrum., v.1, n.1, p. 60 - 72, 1993. Apud: Anal. Abstr., London, v.55, n.abstr. 12A90, 1993.
- 78 - ZARECHENSKII, M. A., GAIDUKEVICH, A. N., KIZEM, E. G. - Ion-selective electrodes in pharmaceutical analysis. Farmatsiya, v.37, n.4, p. 88 - 92, 1988. Apud: Anal. Abstr., London, v. 50, n.abstr. 1E1, 1988.
- 79 - ZHANG, D. & LI, D. - Study on PVC membrane electrode for subglycyrrhelic acid and ibuprofen determination using ferrocene quaternary ammonium salts as electroactive material. Neimenggu Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, v. 24, n. 1, p. 47 - 53, 1993. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v. 121, n.abstr. 91991, 1994.
- 80 - ZHANG, Z. R. & COSOFRET, V. V. - New developments in pharmaceutical analysis with membrane sensors. Sel. Electr. Rev., Washington, v.12, p. 35 - 135, 1990.

- 81 - ZHEN, C. L., HAO, P. J., LIN, C. S. - Preparation of PVC membrane analginum ion-selective electrode. Anal. Proc., London, v.24, p. 339 - 40, 1987.
- 82 - ZHOU, J. & WANG, E. - Ion exchange of cationic drugs at a Nafion-coated electrode in flow-through analysis. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, v.249, p. 489 - 494, 1991.