

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Desenvolvimento de Procedimentos em Fluxo Envolvendo
Reatores em Fase Sólida e Microsistema Analítico Construído
com LTCC (*Low Temperature Co-fired Ceramics*) para a
Determinação de Analitos de Interesse Farmacêutico

Willian Toito Suarez*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Ciências (área QUÍMICA
ANALÍTICA)

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho

*bolsista CNPq

São Carlos – SP
2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S939df

Suarez, Willian Toito.

Desenvolvimento de procedimentos em fluxo envolvendo reatores em fase sólida e microsistema analítico construído com LTCC (Low Temperature Co-fired Ceramics) para a determinação de analitos de interesse farmacêutico / Willian Toito Suarez. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

140 f.

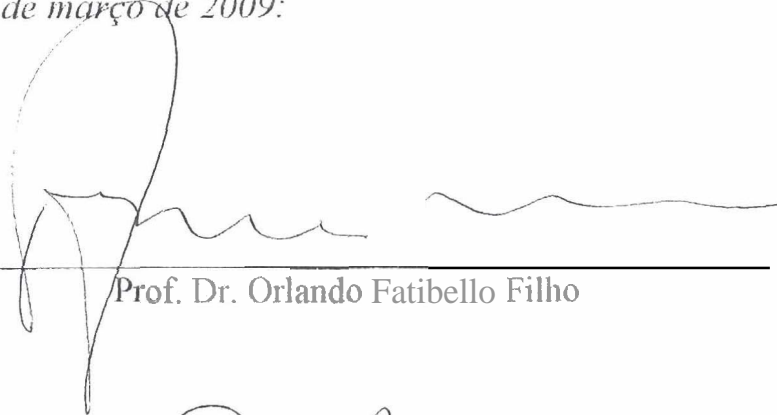
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Química analítica. 2. Análise por injeção de fluxo. 3. Espectrofotometria. 4. Turbidimetria. 5. Produtos farmacêuticos - determinação. 6. Automação. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato **Willian Toito Suarez**, realizada em 20 de março de 2009:*



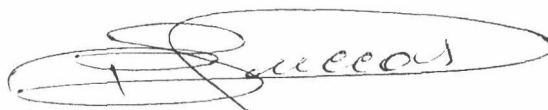
Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira



Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite



Prof. Dr. Pedro Orival Luccas



Prof. Dr. Leonardo Pezza

Dedico este trabalho,

*aos meus pais Lourdes e Alcides e aos meus irmãos que
sempre me apoiaram durante esses 32 anos de vida.*

*aos amores da minha vida João Vitor e a minha amada esposa
Fernanda.*

AGRADEÇO,

Primeiramente ao Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho pela orientação e confiança, pois no ano de 1999 me ofereceu uma oportunidade de trabalhar em seu laboratório, se não fosse isso, não estaria defendendo essa tese de doutorado, e provavelmente não teria me graduado em Química. Agradeço também, é claro, toda a sua amizade durante os nove anos de convivência que tivemos.

Aos Prfs. Drs. Oldair Donizete Leite, Ana Rita de Araujo Nogueira, Leonardo Pezza e Pedro Orival Luccas pelas sugestões e críticas durante a defesa da tese.

Ao Prof. Dr. Julián Alonso pela oportunidade que me concedeu ao me aceitar em seu laboratório para a realização de um estágio de seis meses no grupo de Sensores e Biossensores da Universidade Autônoma de Barcelona (UAB).

Ao Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira pela amizade e pela sua importante colaboração no desenvolvimento dessa tese.

Ao grande amigo Itapira que desde que cheguei em São Carlos foi e continua sendo uma pessoa muito importante para mim.

Ao “grande” Parati por tudo e pelas milhares de noites que passamos ouvindo Pink Floyd.

Ao Paulão e ao João Bad Trip que mesmo longe continuam perto.

Á Márcia, ao Toninho e ao César.

Aos amigos de São José dos Campos: Maurílio, Alexandre, Rodrigo, Alan, Vitor e CD.

Aos colegas dos laboratórios 1, 2 e 3: Heloisy, Bruna, Humberto, Lúcia, Roberta, Marina, Tiago, Wagner, Cyber, Mônica, Viviane, Érica e em especial a Elen.

Ao Prof. Dr. Luiz Humberto, Bruno e Geiser pelas nuestras charlas sobre química e futebol.

Ao Osmundo e ao Chicão pela amizade e companheirismo, e por me mostrarem o que não deve ser feito.

A CAPES pela concessão de uma bolsa PDEE pela qual pude realizar um estágio na UAB.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Automatização de Sistemas Analíticos.....	2
1.2. Miniaturização de Sistemas Analíticos.....	3
1.3. LTCC (<i>Low Temperature Co-fired Ceramics</i>).....	4
1.4. Controle da Qualidade de Medicamentos.....	5
1.4.1. Algumas Considerações Sobre Medicamentos.....	6
1.4.1.1. Prazo de Validade.....	6
1.4.1.2. Rotulagem.....	6
1.5. Fármacos Estudados.....	6
1.6. N-acetilcisteína.....	6
1.6.1. Aspectos Gerais.....	6
1.6.2. Procedimentos para Determinação de N-acetilcisteína.....	7
1.6.3. Métodos Oficiais.....	9
1.7. Captopril.....	9
1.7.1. Aspectos Gerais.....	9
1.7.2. Procedimentos para a Determinação de Captopril.....	10
1.7.3. Método Oficial.....	11
1.8. Dipirona Sódica.....	12
1.8.1. Aspectos Gerais.....	12
1.8.2. Procedimentos para a Determinação de Dipirona.....	13
1.8.3. Método Oficial.....	15

1.9. Cloridrato de Fluoxetina.....	15
1.9.1. Aspectos Gerais.....	15
1.9.2. Procedimentos para a Determinação de Cloridrato de Fluoxetina.....	16
1.9.3. Método Oficial.....	17
1.9.4. Objetivos.....	17
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	18
2.1. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA).....	19
2.1.1. Princípios Fundamentais.....	19
2.1.2. Constituição.....	19
2.1.3. Configurações Elementares.....	21
2.1.3.1. Sistema de Linha Única.....	22
2.1.3.2. Sistema com Confluência.....	22
2.1.3.3. Sistema com Zonas Coalescentes.....	22
2.1.3.4. Sistema com Fluxo Intermitente.....	23
2.2. Reatores em Fase Sólida (RFS).....	23
2.2.1. Vantagens do Emprego de Reatores em Fase Sólida.....	24
2.2.2. Posições dos RFSs no Sistema FIA.....	25
2.2.3. Características dos Reagentes Imobilizados e dos Suportes.....	26
2.2.3.1. Imobilização em Suportes.....	26
2.2.3.1.1. Imobilização em Polímeros.....	26
2.2.3.1.2. Imobilização Natural.....	27
2.2.3.1.3. Imobilização em Resinas de Troca-Iônica.....	27
2.3. Métodos de Análise.....	28
2.3.1. Espectrofotometria no UV-vísivel.....	28
2.3.2. Turbidimetria.....	29

CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL.....	32
3.1. Instrumentação.....	33
3.1.1. Balança Analítica.....	33
3.1.2. pHmetro.....	33
3.1.3. Eletrodo de Vidro Combinado.....	33
3.1.4. Bomba Peristáltica.....	33
3.1.5. Tubos e Conexões.....	33
3.1.6. Injetor Comutador.....	34
3.1.7. Registrador.....	34
3.1.8. Espectrofotômetros.....	34
3.1.9. Cromatógrafo.....	34
3.1.9.1. Micropipetas.....	35
3.1.9.2. Fibra óptica e <i>LED</i>	35
3.2. Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína Utilizando um Reator de $Zn_3(PO_4)_2$ Imobilizado em Resina Poliéster Acoplado ao Sistema FIA.....	35
3.2.1. Reagentes e Soluções.....	35
3.2.2. Preparação e Análise das Amostras Farmacêuticas.....	36
3.2.3. Preparação e Imobilização do $Zn_3(PO_4)_2$	36
3.2.4. Preparação do Reator em Fase Sólida.....	37
3.2.5. Procedimento Experimental.....	37
3.2.6. Método Oficial.....	38
3.3. Determinação Espectrofotométrica de Captopril Utilizando um Reator de Cloranilato de Prata Imobilizado em Resina Poliéster Acoplado ao Sistema FIA.....	38
3.3.1. Reagentes e Soluções.....	38
3.3.2. Preparo e Análise das Amostras.....	39
3.3.3. Preparação e Imobilização do Cloranilato de Prata.....	39

3.3.4. Preparação do Reator em Fase Sólida.....	40
3.3.5. Procedimento Experimental.....	40
3.3.6. Método Comparativo.....	41
3.4. Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína e Captopril em Formulações Farmacêuticas Empregando a Formação do Azul da Prússia em um Sistema FIA com Zonas Coalescentes e Fluxo Intermitente.....	41
3.4.1. Reagentes e Soluções.....	41
3.4.2. Preparação e Análise das Amostras Farmacêuticas.....	42
3.4.3. Procedimento Experimental.....	42
3.4.4. Método Comparativo.....	44
3.5. Determinação Turbidimétrica de Cloridrato de Fluoxetina em um Sistema FIA com Zonas Coalescentes e Fluxo Intermitente Empregando Nitrato de Prata como Reagente Precipitante.....	44
3.5.1. Reagentes e Soluções.....	44
3.5.2. Preparação e Análise das Amostras Farmacêuticas.....	45
3.5.3. Procedimento Experimental.....	45
3.5.4. Método Oficial.....	46
3.6. Determinação de Dipirona em Formulações Farmacêuticas Empregando: um Sistema de Análise em Fluxo Utilizando um Microsistema Analítico Construído com LTCC e um Sistema FIA com Zonas Coalescentes.....	47
3.6.1. Reagentes e Soluções.....	47
3.6.2. Preparo e Análise das Amostras.....	47
3.6.3. Diagrama Esquemático para a Determinação de Dipirona em Formulações Farmacêuticas Empregando Ferro(III) como Reagente Utilizando um Sistema FIA com Zonas Coalescentes.....	48
3.6.4. Construção do Microsistema Analítico Utilizando LTCC.....	49
3.6.4.1. Desenho do Microsistema Analítico.....	50
3.6.4.2. Corte das Cerâmicas.....	50
3.6.4.3 Laminação das Cerâmicas.....	51
3.6.4.4. Sinterização das Cerâmicas.....	52

3.6.4.5. Desenhos das Camadas para a Construção do Microsistema Analítico Utilizando LTCC para a Determinação de Dipirona Empregando Ferro(III) como Reagente Cromogênico.....	52
3.7. Diagrama Esquemático para a Determinação de Dipirona em Formulações Farmacêuticas Empregando um Microsistema Analítico Construído com LTCC.....	56
3.8. Método Oficial.....	57
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1. Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína Utilizando um Reator de $Zn_3(PO_4)_2$ Imobilizado em Resina Poliéster Acoplado ao Sistema FIA.....	59
4.1.1. Estudo dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA.....	59
4.1.2. Efeito dos Parâmetros do Reator em Fase Sólida (RFS).....	61
4.1.3. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA.....	64
4.1.4. Estudo dos Interferentes em Potencial.....	66
4.1.5. Teste de Recuperação.....	68
4.1.6. Estudo da Repetibilidade dos Sinais Analíticos e Frequência de Amostragem.....	68
4.1.7. Curva Analítica.....	69
4.1.8. Aplicação.....	70
4.2. Determinação Espectrofotométrica de Captopril Utilizando um Reator de Clorânato de Prata Imobilizado em Resina Poliéster Acoplado ao Sistema FIA.....	72
4.2.1. Estudo dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA.....	73
4.2.2. Efeito dos Parâmetros do Reator em Fase Sólida (RFS).....	74
4.2.3. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA.....	76
4.2.4. Estudo dos Interferentes em Potencial.....	80
4.2.5. Teste de Recuperação.....	81
4.2.6. Estudo da Repetibilidade dos Sinais Analíticos e Frequência de Amostragem.....	82
4.2.7. Curva Analítica.....	83

4.2.8. Aplicação.....	84
4.3. Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína e Captopril em Formulações Farmacêuticas Empregando a Formação do Azul da Prússia em Linha Utilizando um Sistema FIA com Zonas Coalescentes.....	86
4.3.1. Estudo dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA.....	87
4.3.2. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA.....	88
4.3.3. Estudo de Interferentes e Teste de Recuperação.....	92
4.3.4. Estudo da Repetibilidade e Frequência de Amostragem.....	94
4.3.5. Curva Analítica.....	94
4.3.6. Aplicações.....	96
4.4. Determinação Turbidimétrica de Cloridrato de Fluoxetina em um Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com Zonas Coalescentes Empregando Nitrato de Prata como Reagente Precipitante.....	98
4.4.1. Estudos dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA.....	98
4.4.2. Estudos dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA.....	99
4.4.3. Estudo de Interferentes em Potencial.....	102
4.4.4. Teste de Recuperação.....	103
4.4.5. Estudo da Repetibilidade e Frequência de Amostragem.....	104
4.4.6. Curva Analítica.....	104
4.4.7. Aplicações.....	106
4.5. Determinação de Dipirona em Formulações Farmacêuticas Empregando: Um Sistema de Análise em Fluxo Utilizando um Microsistema Analítico Construído com LTCC e um Sistema FIA com Zonas Coalescentes.....	107
4.5.1 Estudo dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA Empregando o Microsistema Analítico.....	109
4.5.2. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA Empregando o Microsistema Analítico.....	111
4.5.3. Estudos de Interferentes em Potencial e Testes de Recuperação Empregando o Microsistema Analítico e o Sistema FIA com Zonas Coalescentes.....	112

4.5.4. Estudo da Repetibilidade dos Sinais Analíticos e Frequência de Amostragem.....	113
4.5.5. Curva Analítica.....	114
4.5.6. Aplicações.....	117
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES.....	119
5.1. Considerações Finais.....	120
CAPÍTULO 6. ATIVIDADES FUTURAS.....	123
CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1. Trabalhos publicados na literatura empregando resina polimérica para a imobilização de reagente.....	27
TABELA 2.2. Relação para várias partes do espectro visível.....	28
TABELA 2.3. Alguns exemplos do emprego de sistemas FIA com detecção turbidimétrica para a determinação de fármacos descritos na literatura.....	31
TABELA 4.1. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de N-acetilcisteína empregando um RFS contendo $Zn_3(PO_4)_2$ imobilizado em resina poliéster.....	66
TABELA 4.2. Estudo dos possíveis interferentes na determinação de N-acetilcisteína em amostras comerciais empregando o sistema FIA proposto..	67
TABELA 4.3. Resultados do teste de recuperação de N-acetilcisteína.....	68
TABELA 4.4. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto e o método comparativo da Farmacopéia Brasileira.....	71
TABELA 4.5. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de captopril empregando um RFS de cloranilato de prata ($Ag_2C_6Cl_2O_4$) imobilizado em resina poliéster.....	80
TABELA 4.6. Estudo dos possíveis interferentes na determinação de captopril em amostras comerciais empregando o sistema FIA proposto.....	81
TABELA 4.7. Resultados do teste de recuperação de captopril.....	82
TABELA 4.8. Determinação de captopril em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o métodos comparativo.....	85
TABELA 4.9. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de N-acetilcisteína e captopril empregando o sistema FIA proposto.....	92
TABELA 4.10. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o métodos comparativo.....	96
TABELA 4.11. Determinação de captopril em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o métodos comparativo.....	97
TABELA 4.12. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de cloridrato de fluoxetina empregando o sistema FIA proposto.....	102

TABELA 4.13. Efeito dos excipientes como possíveis interferentes em potencial na determinação de cloridrato de fluoxetina.....	103
TABELA 4.14. Estudo de recuperação de cloridrato de fluoxetina em três formulações farmacêuticas.....	103
TABELA 4.15. Determinação de cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o método comparativo.....	106
TABELA 4.16. Parâmetros físicos e químicos estudados e selecionados empregando o microsistema acoplado ao sistema FIA e o sistema FIA com zonas coalescentes.....	112
TABELA 4.17. Determinação de dipirona em formulações farmacêuticas empregando o microsistema acoplado ao sistema FIA e o método comparativo.....	117
TABELA 4.18. Determinação de dipirona em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA com zonas coalescentes e o método comparativo.....	118
TABELA 5.1. Sinopse dos resultados obtidos pelos procedimentos propostos.....	121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Rampa de temperatura para a sinterização das cerâmicas.....	4
FIGURA 1.2. Estrutura molecular da N-acetilcisteína.....	7
FIGURA 1.3. Estrutura molecular do captopril.....	10
FIGURA 1.4. Estrutura molecular da dipirona.....	12
FIGURA 1.5. Estrutura molecular do cloridrato de fluoxetina.....	15
FIGURA 2.1. Representação esquemática de um sistema FIA de linha única	20
FIGURA 2.2. Configurações de sistemas FIA.....	22
FIGURA 2.3. Esquema demonstrativo das principais posições dos RFSs.....	25
FIGURA 3.1. Diagrama esquemático do sistema FIA para determinação espectrofométrica de N-acetilcisteína.....	37
FIGURA 3.2. Diagrama esquemático do sistema FIA para determinação espectrofotométrica de captopril.....	40
FIGURA 3.3. Diagrama esquemático do sistema FIA com zonas coalescentes para determinação espectrofotométrica de N-acetilcisteína e captopril.....	42
FIGURA 3.4. Diagrama esquemático do sistema FIA com zonas coalescentes e fluxo intermitente para determinação turbidimétrica de cloridrato de fluoxetina.....	46
FIGURA 3.5. Diagrama esquemático do sistema FIA com zonas coalescentes para determinação espectrofotométrica de dipirona.....	49
FIGURA 3.6. Equipamento a laser utilizado para o corte das cerâmicas.....	51
FIGURA 3.7. Prensa hidráulica para a laminação das cerâmicas.....	52
FIGURA 3.8. Camadas desenhadas em um programa CAD para a construção do microsistema analítico utilizando tecnologia LTCC.....	53
FIGURA 3.9. Esquema para a conexão das entradas e saída no microsistema analítico.....	54
FIGURA 3.10. Microsistema analítico sinterizado sem os conectores e os vidros.....	54

FIGURA 3.11. Microsistema analítico construído com LTCC ao lado de uma moeda de 50 centavos de real para mostrar a dimensão reduzida do microsistema.....	55
FIGURA 3.12. Suporte de acrílico utilizado.....	55
FIGURA 3.13. Microsistema analítico acoplado entre a fibra óptica e o <i>LED</i> . ..	55
FIGURA 3.14. Diagrama esquemático do sistema FIA para determinação espectrofotométrica de dipirona utilizando um microsistema analítico construído com LTCC.....	56
FIGURA 4.1. Estudo da concentração da solução transportadora borato de sódio.....	60
FIGURA 4.2. Estudo da concentração do reagente vermelho de alizarina S...	61
FIGURA 4.3. Estudo da composição m/m de $Zn_3(PO_4)_2$ e resina poliéster.....	62
FIGURA 4.4. Estudo do comprimento do RFS contendo $Zn_3(PO_4)_2$	63
FIGURA 4.5. Estudo do volume da alça de amostragem.....	64
FIGURA 4.6. Estudo do comprimento da bobina helicoidal.....	65
FIGURA 4.7. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de N-acetilcisteína.....	69
FIGURA 4.8. Curva analítica para a determinação de N-acetilcisteína.....	69
FIGURA 4.9. Sinais transientes em triplicatas obtidos na determinação de N-acetilcisteína.....	70
FIGURA 4.10. Estudo da concentração do Fe(III).....	74
FIGURA 4.11. Estudo do comprimento do RFS contendo cloranilato de prata	76
FIGURA 4.12. Estudo da vazão do Fe(III) sobre o sinal analítico.....	77
FIGURA 4.13. Estudo do volume da alça de amostragem.....	78
FIGURA 4.14. Estudo do comprimento da bobina helicoidal.....	78
FIGURA 4.15. Curvas analíticas para a determinação de captopril.....	79
FIGURA 4.16. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de captopril.....	83
FIGURA 4.17. Curva analítica para a determinação de captopril.....	83

FIGURA 4.18. Sinais transientes em triplicatas das soluções de referência de captopril.....	84
FIGURA 4.19. Estudo da concentração do reagente Fe(III).....	88
FIGURA 4.20. Estudo da vazão da solução transportadora.....	89
FIGURA 4.21. Estudo da vazão do hexacianoferrato.....	89
FIGURA 4.22. Estudo dos volumes das alças L1 e L2.....	90
FIGURA 4.23. Estudo do comprimento da bobina helicoidal B1.....	91
FIGURA 4.24. Estudo do comprimento da bobina helicoidal B2.....	92
FIGURA 4.25. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de N-acetilcisteína e de captopril.....	94
FIGURA 4.26. Curvas analíticas para determinação de N-acetilcisteína e captopril.....	95
FIGURA 4.27. Sinais transientes em triplicatas das soluções de referência de N-acetilcisteína e captopril.....	95
FIGURA 4.28. Estudo do volume das alças L1 e L2.....	99
FIGURA 4.29. Efeito do comprimento da bobina helicoidal.....	101
FIGURA 4.30. Estudo da vazão da solução transportadora de ácido nítrico...	101
FIGURA 4.31. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de cloridrato de fluoxetina.....	104
FIGURA 4.32. Curva analítica para determinação de cloridrato de fluoxetina.	105
FIGURA 4.33. Sinais transientes em triplicatas das soluções de referência de cloridrato de fluoxetina.....	105
FIGURA 4.34. Estrutura molecular da 1-fenilpirazolina-5-ona.....	107
FIGURA 4.35. Espectro de absorção molecular na região do visível do cromóforo gerado na reação entre o Fe(III) e a dipirona.....	108
FIGURA 4.36. Espectro de absorção em três dimensões do branco.....	108
FIGURA 4.37. Espectro de absorção em três dimensões.....	109
FIGURA 4.38. Efeito da concentração de Fe(III).....	110
FIGURA 4.39. Estudo do volume das alças L1 e L2.....	111

FIGURA 4.40. Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos empregando o microssistema analítico.....	113
FIGURA 4.41. Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos empregando o sistema FIA com zonas coalescentes.....	114
FIGURA 4.42. Curva analítica para a determinação de dipirona utilizando o sistema FIA empregando o microssistema analítico construído com LTCC.....	115
FIGURA 4.43. Curva analítica para a determinação de dipirona utilizando o sistema FIA com zonas coalescentes.....	115
FIGURA 4.44. Sinais transientes obtidos empregando o microssistema.....	116
FIGURA 4.45. Sinais transientes obtidos empregando o sistema FIA com zonas coalescentes.....	116

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS EM FLUXO ENVOLVENDO REATORES EM FASE SÓLIDA E MICROSSISTEMA ANALÍTICO CONSTRUÍDO COM LTCC (*LOW TEMPERATURE CO-FIRED CERAMICS*) PARA A DETERMINAÇÃO DE ANALITOS DE INTERESSE FARMACÊUTICO. O emprego de sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de N-acetilcisteína, captopril, dipirona e cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas foi investigado. A N-acetilcisteína foi determinada empregando um reator em fase sólida contendo fosfato de zinco imobilizado em resina poliéster acoplado ao sistema FIA. O procedimento baseou-se na complexação dos íons Zn(II) pela N-acetilcisteína no reator em fase sólida, com conseqüente remoção do complexo Zn(II)-N-acetilcisteína do reator, esse complexo reagiu com o reagente vermelho de alizarina S (VA), em tampão borato pH 9,0, formando o complexo $Zn(VA-BO_3)_3$ cuja absorbância foi monitorada espectrofotometricamente em 540 nm. O segundo procedimento desenvolvido foi a determinação de captopril empregando um reator em fase sólida contendo cloranilato de prata ($Ag_2C_6Cl_2O_4$) imobilizado em resina poliéster. Esse sistema baseou-se na reação de precipitação do captopril com Ag(I), gerando no reator um sal insolúvel entre o captopril e Ag(I) devido à menor solubilidade do sal formado em relação ao $Ag_2C_6Cl_2O_4$. Após a formação do sal insolúvel no reator ocorreu o deslocamento do ânion cloranilato, $C_6Cl_2O_4^{2-}$, que reagiu com o Fe(III) em um ponto de confluência do sistema em fluxo produzindo o complexo $FeC_6Cl_2O_4^+$ que foi monitorado espectrofotometricamente em 528 nm. Em um outro procedimento, a N-acetilcisteína e o captopril foram determinados separadamente em um sistema de análise por injeção em fluxo através da formação em linha do azul da Prússia. Nesse procedimento, a N-acetilcisteína ou o captopril foram oxidados pelo Fe(III), produzindo Fe(II) que reagiu com hexacianoferrato(III) em um ponto de confluência do sistema FIA, gerando o azul da Prússia ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3$), que foi monitorado espectrofotometricamente em 700 nm. Foi proposto também um sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes e fluxo intermitente com detecção turbidimétrica para a determinação de cloridrato de fluoxetina em produtos farmacêuticos. O sistema baseou-se na reação entre o cloreto do cloridrato de fluoxetina e o nitrato de prata ($AgNO_3$), formando o $(AgCl_{(s)})$, que foi monitorado turbidimetricamente em 420 nm. Por último, foram desenvolvidos dois procedimentos empregando sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de

dipirona em formulações farmacêuticas utilizando Fe(III) como reagente cromogênico. No primeiro procedimento foi empregado um microssistema analítico construído com LTCC e no segundo foi utilizado um sistema FIA com zonas coalescentes sem o acoplamento do microssistema. Nesses sistemas, sucedeu a formação em linha de um cromóforo azul, a partir da reação entre o Fe(III) e a dipirona, que foi monitorado espectrofotometricamente em 622 nm.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF FLOW PROCEDURES INVOLVING SOLID-PHASE REACTOR AND ANALYTICAL MICROSYSTEM CONSTRUCTED WITH LTCC (*LOW TEMPERATURE CO-FIRED CERAMICS*) TO DETERMINATION OF ANALYTES OF PHARMACEUTICAL INTEREST. The employment of flow injection systems to determination of N-acetylcysteine, captopril, dipyrrone and fluoxetine hydrochloride in pharmaceutical formulations was investigated. The N-acetylcysteine was determined employing a solid-phase reactor containing $Zn_3(PO_4)_2$ immobilized in a polyester resin coupled to a flow injection system. The procedure was based on the chelation of Zn(II) ions with N-acetylcysteine in the solid-phase reactor, with consequent releasing of the complex Zn(II)-N-acetylcysteine of the reactor, this complex reacted with alizarin red S (VA) in borate buffer pH 9.0 generating the complex $Zn(VA-BO_3)_3$ which absorbance was measured spectrophotometrically at 540 nm. The second developed procedure was the determination of captopril (CAP) in pharmaceutical formulations employing a solid-phase reactor containing silver chloranilate ($Ag_2C_6Cl_2O_4$) immobilized in a polyester resin. In this system occurred the precipitation reaction of captopril with the Ag(I), producing in the reactor an insoluble salt between the CAP and the Ag(I) due to the lower solubility of the formed salt related to $Ag_2C_6Cl_2O_4$. After the formation of the insoluble salt in the reactor occurred the releasing of chloranilate anion, $C_6Cl_2O_4^{2-}$, that reacted with the Fe(III) producing the complex $FeC_6Cl_2O_4^+$ which was monitored spectrophotometrically at 528 nm. In another procedure, the N-acetylcysteine and captopril were determined separately in a flow injection system through the on-line of the Prussian blue formation. In this procedure, the N-acetylcysteine or the captopril were oxidized by Fe(III), producing Fe(II) that reacted with hexacyanoferrate(III) in a point of flow system, generating the Prussian blue ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3$), that was monitored spectrophotometrically at 700 nm. It was also proposed a flow injection system with merging zones and intermittent flow with turbidimetric detection to determination of fluoxetine hydrochloride in pharmaceuticals. This system was based on the formation of an insoluble salt ($AgCl_{(s)}$) between the $AgNO_3$ and the chloride of the hydrochloride of the fluoxetine molecule that was turbidimetrically detected at 420 nm. Finally, two procedures were developed employing a flow injection system to determination of dipyrrone in pharmaceuticals using Fe(III) as chromogenic reagent. In the first procedure, it was employed an analytical microsystem constructed with

LTCC and in the second one, it was used a flow injection system with merging zones without the use of microsystem. In these systems, occurred the formation on-line of an blue chromophore between Fe(III) and the dipyrone that was monitored spectrophotometrically at 622 nm.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1. Automatização de Sistemas Analíticos

A crescente necessidade de automatização de procedimentos analíticos se deve ao grande aumento do número de amostras laboratoriais a serem analisadas, principalmente nas áreas clínicas e ambientais, e à demanda por técnicas rápidas e confiáveis permitindo, assim, a aquisição de um maior número de informações utilizando menor tempo e esforço humano^{1,2}.

O desenvolvimento de novos procedimentos automatizados para a determinação de fármacos na forma livre ou na presença de outras substâncias, especialmente os genéricos e aqueles que apresentam importância farmacológica e de saúde pública, deve-se ao fato da grande produção desses medicamentos na indústria farmacêutica, as quais necessitam de procedimentos rápidos, precisos, de baixo custo e alta seletividade para tal determinação³. Isso vem ocorrendo devido ao crescimento da demanda destes produtos ocasionado pelo crescimento populacional em países em desenvolvimento e o crescimento de doenças relacionadas à terceira idade.

Sistema de análise por injeção em fluxo apresenta-se prontamente para a automatização da área de controle analítico, devido à sua flexibilidade e robustez requeridas para suportar o trabalho de rotina típico de uma indústria ou de um laboratório farmacêutico^{3,4}. Índícios da consolidação alcançada pelo sistemas em fluxo podem ser confirmadas pelo grande número de artigos publicados nas últimas décadas e até mesmo a Farmacopéia Americana (USP XXIII)⁵, que preconiza o emprego de um sistema em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de iodeto empregando a reação com ácido arsenoso e Ce(IV).

A análise por injeção em fluxo é uma técnica que permite automatizar a manipulação de soluções, visando economizar tempo, minimizar o consumo de reagentes e amostras, diminuir ou eliminar contaminação da amostra durante a operação, minimizar a instabilidade de produtos e/ou reagentes, aumentar a precisão e diminuir o custo operacional. Além disso, é caracterizada por alta simplicidade, versatilidade e pode ser implementada com instrumentação de baixo custo em qualquer laboratório analítico⁶⁻⁹.

1.2. Miniaturização de Sistemas Analíticos

Desde a década de sessenta, quando do início do desenvolvimento de equipamentos eletrônicos, a miniaturização tornou-se uma realidade que nos acompanha e tem propiciado avanços tecnológicos extremamente importantes para a vida dos seres humanos em todas as áreas. Os exemplos mais significativos são os avanços da eletrônica e da informática. Essa tendência, entretanto, também se faz evidente em outras áreas do conhecimento como na física, medicina, biologia e na química.

O primeiro dispositivo analítico miniaturizado foi proposto por TERRI^{10,11} em 1975, na qual esse pesquisador propôs em sua tese de doutorado um sistema de cromatografia em fase gasosa construído com silício. Entretanto, esse trabalho não teve muito impacto, pois o conceito de miniaturização ainda não estava consolidado entre os grupos de pesquisa espalhados pelo mundo.

A partir da década de noventa quando MANZ *et al.*^{12,13} propuseram o microsistema de análise total (μ -TAS), um grande desenvolvimento na construção, elaboração e o emprego de novas tecnologias para a construção de dispositivos miniaturizados vem sendo divulgado.

Na química analítica, a utilização dos μ -TAS permitiu integrar várias etapas analíticas, como introdução da amostra e pré-tratamento das amostras, execução de reações químicas, separação analítica e detecção em um único dispositivo. Todos esses fatores, aliados à portabilidade, impulsionaram o desenvolvimento dos microsistemas analíticos nos últimos anos.

O emprego de microsistemas analíticos oferece um grande número de vantagens, entre as quais a possibilidade de produção em larga escala acarretando na redução dos custos de produção, diminuição no consumo de reagentes e no volume de resíduos gerados, alta frequência de amostragem e também a portabilidade, a qual permite ao usuário realizar análises *in-situ* em lugares onde dificilmente se poderiam utilizar equipamentos de grandes dimensões e obter a informação analítica em tempo real¹⁴⁻¹⁶.

São diversas as técnicas e os materiais utilizados para se fazer a miniaturização dos sistemas de análise química. O silício e o vidro vêm sendo os materiais mais utilizados para essa finalidade, não somente devido às suas propriedades físico-químicas, como também ao alto grau de desenvolvimento que

vêm adquirindo em suas tecnologias associadas¹⁷. Recentemente, porém, os polímeros têm se tornado o material mais empregado para a microfabricação, devido, especialmente, a seu baixo custo¹⁸.

1.3. LTCC (*Low Temperature Co-fired Ceramics*)

LTCC é uma tecnologia de multi-camadas que há muitos anos vêm sendo empregada na construção de microeletrônicos assim como, na área militar e automotiva. Essa tecnologia consiste na sobreposição de camadas em um alinhamento preciso antes do processo de sinterização. Essa tecnologia também vem sendo utilizada na construção de circuitos integrados híbridos, que incluem resistores, indutores, capacitores e componentes ativos em um mesmo substrato. Essa tecnologia apresenta diversas vantagens em relação a outras tecnologias de empacotamento (e.g. HTCC), como: a cerâmica é sinterizada a temperatura abaixo de 1000° C devido a sua composição especial e permite a sinterização com materiais de alta condutividade (prata, cobre e ouro).

A tecnologia denominada LTCC, também conhecida como cerâmicas verdes é um compósito composto de vidro, solventes orgânicos e cerâmica (mais comumente utilizada é a alumina). A Figura 1.1. mostra a rampa de temperatura empregada para a sinterização das cerâmicas verdes.

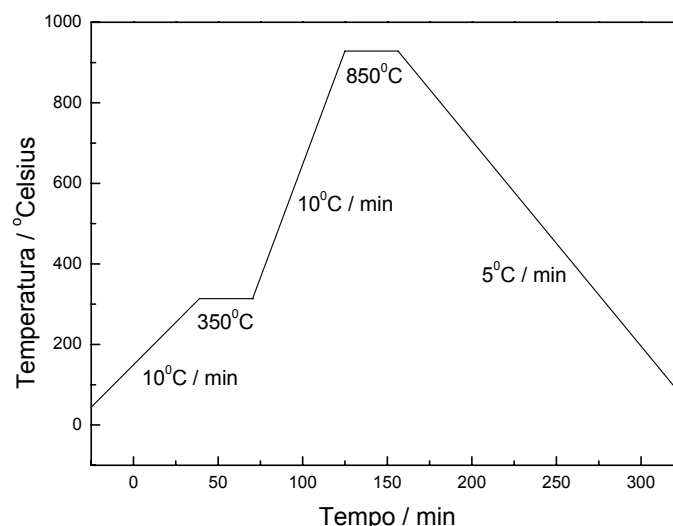


FIGURA 1.1. Rampa de temperatura para a sinterização das cerâmicas.

A principal característica é a presença de duas etapas constantes, de 30 minutos de duração cada uma. Na primeira em 350° C, ocorre a volatilização total dos compostos orgânicos presentes na cerâmica. Na segunda em 850° C, se

encontra a temperatura de transição vítrea da maioria dos vidros. Nessa temperatura ocorre a interpenetração da alumina entre as camadas. Por fim, a etapa de resfriamento a 5°C/min obtendo-se um microssistema analítico rígido e duro após o término da sinterização.

O uso dessas cerâmicas facilita o projeto e a construção de microssistemas, permitindo a construção de dispositivos miniaturizados sem a necessidade de trabalhar em condições de laboratório estritamente controladas, como por exemplo, salas limpas, ou com pessoas altamente qualificadas. É possível utilizar tanto uma microfresadora como equipamentos a laser para a construção de canais e cavidades dos dispositivos. Ademais, o processo de fabricação do dispositivo é muito rápido. Além disso, a metodologia de sobrepor camada sobre camada permite desenhar com maior facilidade dispositivos com estruturas tridimensionais complexas, simplificando a miniaturização e a integração das diferentes etapas de tratamento das amostras (mistura de reagentes, separação, pré-concentração, etc.), que são necessárias em determinadas análises. Com a integração do sistema de detecção e fluídico em um mesmo dispositivo construído com LTCC é possível, com grande versatilidade, integrar diferentes tipos de detectores como eletroquímicos (potenciométricos e amperométricos) e ópticos (espectrofométricos e quimiluminescentes)¹⁹⁻²⁴.

1.4. Controle da Qualidade de Medicamentos

A Secretaria de Vigilância Sanitária²⁵ e a Farmacopéia Brasileira²⁶ definem medicamento de maneira genérica como produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico.

O Ministério da Saúde baixou normas e aperfeiçoou mecanismos destinados a garantir ao consumidor a qualidade dos medicamentos, tendo em conta a identidade, atividade, pureza, eficácia e inocuidade dos produtos e abrangendo as especificações de qualidade e a fiscalização de produção²⁷.

O controle de qualidade é fundamental para garantir a qualidade dos medicamentos consumidos pela população. Durante as análises vários parâmetros são avaliados como presença e concentração do princípio ativo, uniformidade de dose, etc. Atualmente vários estabelecimentos não autorizados vendem

medicamentos, isto gera a necessidade de fiscalização e apreensão por parte dos órgãos competentes²⁸.

1.4.1. Algumas Considerações Sobre Medicamentos

1.4.1.1. Prazo de Validade

O prazo de validade limita o tempo durante o qual o produto poderá ser usado. Os produtos deverão indicar nos rótulos, quando tecnicamente possível, a data do término do prazo de validade. Essa data identifica o tempo durante o qual o fármaco estará de acordo com as exigências da monografia farmacopeica, quando mantidos sob as condições de conservação indicadas. Quando o prazo de validade for indicado apenas pelo mês e ano, entende-se com o vencimento do prazo, o último dia desse mês. O prazo de validade é resultado dos estudos de estabilidade feitos nos produtos após a fabricação, este deve acompanhar o relatório técnico do fármaco, quando do registro na ANVISA²⁹.

1.4.1.2. Rotulagem

É a identificação impressa, bem como dizeres pintados ou gravados a fogo, pressão ou decalques aplicados diretamente sobre recipientes, vasilhames, invólucro, envoltórios ou qualquer outro material de acondicionamento. Os rótulos terão dimensões necessárias à fácil leitura e serão redigidos de modo a facilitar o entendimento ao consumidor. A confecção dos rótulos deverá seguir as normas da ANVISA³⁰.

1.5. Fármacos Estudados

Os fármacos que foram estudados nessa tese de doutorado foram N-acetilcisteína (agente mucolítico), captopril (antihipertensivo), dipirona (analgésico e antipirético) e cloridrato de fluoxetina (antidepressivo).

1.6. N-acetilcisteína

1.6.1. Aspectos Gerais

A N-acetilcisteína (Figura 1.2) (L- α -acetamido- β -ácido mercaptopropiônico) é um pó cristalino branco, tendo leve odor acético. É facilmente solúvel em água e em álcool; praticamente insolúvel em clorofórmio e éter. Foi introduzida no mercado na década de sessenta e foi o primeiro agente chamado como mucolítico³¹.

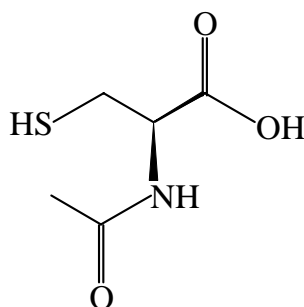


Figura 1.2. Estrutura molecular da N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína é um agente redutor, sendo degradada por agentes oxidantes. Nos estudos *in vitro* em pH entre 7 e 9, esse tiól é capaz de promover mucólise em poucos minutos. N-acetilcisteína é o precursor acetilado dos aminoácidos L-cisteína e glutathiona reduzida (GSH). Historicamente, a N-acetilcisteína tem sido usada como um agente mucolítico em doenças respiratórias crônicas e também como um antídoto para intoxicação por paracetamol. A molécula da N-acetilcisteína possui um grupo sulfídrico livre ao qual é atribuída a propriedade de romper as pontes ou as ligações dissulfeto das mucoproteínas que outorgam viscosidade ao muco das secreções pulmonares. Este mecanismo explicaria a sua ação mucolítica³².

Recentemente, estudos em animais e humanos têm mostrado ser a N-acetilcisteína um poderoso antioxidante e um agente terapêutico potente no tratamento do câncer, doenças do coração, infecção com o vírus do HIV, intoxicação com metais pesados, e outras doenças caracterizadas por radicais livres. N-acetilcisteína tem-se mostrado eficaz também no tratamento da síndrome de Sjogren, gripes, hepatite C e nos males causados pelo hábito de fumar³³⁻³⁶.

1.6.2. Procedimentos para Determinação de N-acetilcisteína

Diversos procedimentos analíticos são descritos na literatura para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas. Estes procedimentos incluem: espectrofotometria³⁷⁻⁴⁵, potenciometria⁴⁶, voltametria⁴⁷⁻⁵⁰,

quimiluminescência^{51,52}, fluorimetria⁵³, condutometria⁵⁴, cromatografia líquida de alta eficiência⁵⁵ e turbidimetria⁵⁶.

O emprego de sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas é amplamente descrito na literatura. A maioria desses procedimentos é baseada na quantificação indireta^{37,38,42,43} de N-acetilcisteína ou a partir de uma reação de complexação³⁹.

O nosso grupo de pesquisa propôs vários procedimentos empregando sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de N-acetilcisteína em amostras comerciais. Um sistema FIA com zonas coalescentes foi proposto por FORNAZARI *et al.*⁴² O procedimento baseou-se na reação de oxidação da N-acetilcisteína com o Fe(III), produzindo Fe(II). Este, ao reagir com a 1,10-ortofenantrolina forma o cromóforo (tris (1,10-ortofenantrolina) ferro (II)), que foi monitorado espectrofotometricamente em 515 nm. O emprego de Cério(IV) como reagente oxidante e ferroína como reagente cromogênico foi proposto por VIEIRA & FATIBELLO⁴³. Para esse sistema, a curva analítica foi linear na faixa de concentração de N-acetilcisteína de $6,5 \times 10^{-6}$ a $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e apresentou um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Um procedimento de análise por injeção em fluxo com detecção turbidimétrica foi descrito por SUAREZ *et al.*⁵⁶ O procedimento baseou-se na precipitação da N-acetilcisteína com Ag(I) em meio ácido e o sal insolúvel produzido foi monitorado em 410 nm. A curva analítica para a N-acetilcisteína foi linear no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foi obtido.

Um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção no UV foi proposto por SÀNCHEZ-PEDREÑO *et al.*⁸⁹. Nesse sistema, a N-acetilcisteína foi determinada diretamente a partir da formação de um complexo amarelo estável entre e o paládio (II) em meio de HCl 1 mol L⁻¹.

DU *et al.*⁵¹ desenvolveram um procedimento em fluxo com detecção quimiluminescente baseado no aumento da intensidade quimiluminescente na presença de N-acetilcisteína a partir do sistema luminol-H₂O₂ em meio alcalino.

Um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção potenciométrica foi proposto por KOLAR & DOBCNIK⁴⁶. Esses pesquisadores imergiram um fio de prata em uma solução contendo cloreto de mercúrio (II), em seguida o eletrodo foi posto em uma solução de iodeto. Este pré-tratamento químico da superfície do eletrodo serviu para formar uma fina camada de iodeto de prata,

que o transformou em um eletrodo íon-seletivo para iodeto. O eletrodo foi usado como um sensor potenciométrico para determinação de N-acetilcisteína em um fluxo carregador contendo iodo a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

ALVAREZ-COQUE *et al.*⁴⁰ descreveram um procedimento para determinação de N-acetilcisteína, baseado na reação de derivatização entre a N-acetilcisteína com o-ftalaldeído e isoleucina em pH 9,5, sendo o produto da reação monitorado espectrofotometricamente em 335 nm. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de N-acetilcisteína entre $5,0 \times 10^{-7}$ e $4,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e apresentou um limite de detecção de $9,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

1.6.3. Métodos Oficiais

A Farmacopéia Americana⁵⁷ preconiza a cromatografia líquida de alta eficiência empregando uma solução de bissulfito de sódio como padrão interno para a determinação quantitativa de N-acetilcisteína com detecção em 214 nm, enquanto a Farmacopéia Brasileira²⁶ recomenda a titulação potenciométrica empregando nitrato de mercúrio (II) como titulante, fio de ouro como eletrodo indicador e calomelano como eletrodo de referência.

1.7. Captopril

1.7.1. Aspectos Gerais

O captopril (Figura 1.3) é uma substância do grupo chamado inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) e age diminuindo a pressão arterial⁵⁸. Este fármaco demonstra excelente efetividade no tratamento da hipertensão arterial, sendo considerado o medicamento de primeira escolha.

Normalmente, ocorrem reduções máximas da pressão arterial 60 a 90 minutos após a ingestão da dose. A diminuição da pressão arterial pode ser progressiva; assim, para se obter melhores resultados, podem ser necessárias várias semanas de tratamento⁵⁹.

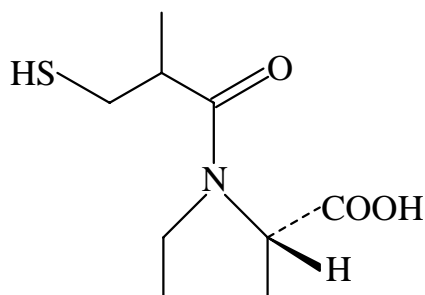


Figura 1.3. Estrutura molecular do captopril

1.7.2. Procedimentos para a Determinação de Captopril

Na literatura são relatados diversos métodos para determinação de captopril em formulações farmacêuticas, como, fluorimetria^{60,61}, voltametria^{62,63}, potenciometria⁶⁴⁻⁶⁶, condutometria^{67,68}, espectrofotometria⁶⁹⁻⁷⁸, quimiluminescência⁷⁹⁻⁸⁵, biamperometria⁸⁶ e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica⁸⁷.

A seguir são descritos alguns trabalhos empregando sistemas em fluxo para a determinação de captopril em formulações farmacêuticas.

Um sistema FIA com detecção espectrofotométrica foi descrito por TZANARAS *et al.*⁶⁹ para a determinação de captopril em formulações farmacêuticas. Este procedimento foi baseado na oxidação do captopril pelo Fe(III). O Fe(II) gerado nessa reação reagiu com 2,2-dipiridil-2-piridilhidrazona em meio ácido produzindo um complexo que foi monitorado espectrofotometricamente em 535 nm. A curva analítica foi linear na região de concentração de $3,2 \times 10^{-5}$ a $4,6 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, apresentou um limite de detecção de $1,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e uma frequência de amostragem de 120 h⁻¹. Em um outro trabalho publicado⁷⁰ pelo mesmo grupo de pesquisa, o captopril foi determinado empregando um sistema de análise por injeção em fluxo reverso utilizando o efeito inibitório do captopril sobre o complexo Co(II)-2,2-dipiridil-2-piridilhidrazona.

Dentro do nosso grupo de pesquisa, foi desenvolvido um procedimento para a determinação de captopril empregando espectrofotometria e sistema de análise por injeção em fluxo. SUAREZ *et al.*⁷³ desenvolveram um procedimento em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de captopril baseando-se na oxidação do captopril pelo Fe(III) produzindo Fe(II) que foi monitorado como complexo (tris (1,10-ortofenantrolina) ferro (II)) em 515 nm. Para esse procedimento

a curva analítica para o captopril foi linear no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, limite de detecção de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e uma frequência de amostragem de 60 h⁻¹.

Um sistema FIA empregando o reagente Folin-Ciocalteu foi proposto por KARLICEK & SOLICH⁷⁴. O procedimento baseou-se na formação de um cromóforo azul entre o reagente e o captopril que foi monitorado espectrofotometricamente em 740 nm. A curva analítica foi linear na região de concentração de 2,0 a 50 µg mL⁻¹ e uma frequência de amostragem de 60 h⁻¹ foi alcançada.

A capacidade de formação de um complexo entre o captopril com Pd(II) serviu de base para PIMENTA *et al.*⁷⁵ desenvolverem um procedimento utilizando análise por injeção sequencial (SIA) e ALBERO *et al.*⁷⁶ utilizarem um sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de captopril em amostras comerciais.

Reações quimiluminescentes também foram empregadas utilizando sistema em fluxo para a quantificação de captopril. ECONOMOU *et al.*⁸¹ descreveram um procedimento em fluxo com detecção quimiluminescente baseado no aumento da radiação quimiluminescente após a reação do captopril com o luminol e o peróxido de hidrogênio. XIRONG *et al.*⁸² propuseram um sistema na qual o captopril inibia a radiação luminescente do sistema luminol-H₂O₂-Cu(II). Um sistema com parada de fluxo empregando a reação entre o captopril e o permanganato de potássio em meio ácido, foi investigado por PULGARÍN *et al.*⁸³ para a geração de quimiluminescência, que foi intensificada com a adição de formaldeído como reagente fluorescente.

Um sistema FIA com detecção biamperométrica indireta de captopril empregando o sistema redox Fe(III)/Fe(II) foi desenvolvido. Para esse sistema a curva analítica foi linear no intervalo de concentração de 0,03 a 3,6 µg mL⁻¹ e uma frequência de amostragem de 60 h⁻¹ foi obtida⁸⁶.

1.7.3. Método Oficial

A Farmacopéia Americana⁸⁸ recomenda a iodimetria para a determinação quantitativa de captopril.

1.8. Dipirona Sódica

1.8.1. Aspectos Gerais

A dipirona (sal de sódio do 1-fenil-2,3-dimetil-4-metilaminometanossulfonato-5-pirazolona, Figura 1.4). É um pó cristalino de coloração branca solúvel em água e álcool, ligeiramente solúvel em clorofórmio e praticamente insolúvel em éter. Quimicamente, a dipirona é um derivado 5-pirazolônico com a presença de um grupo metanossulfônico na estrutura. É comercializada principalmente na forma sódica em diferentes formas farmacêuticas (solução oral, injetável, comprimidos e supositórios)⁸⁹.

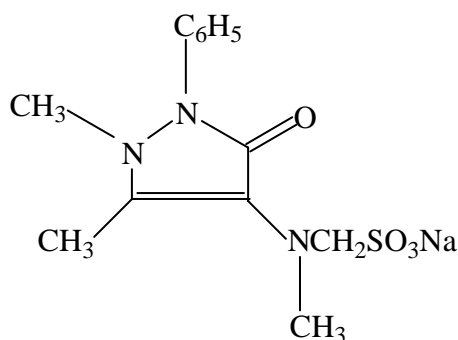


Figura 1.4. Estrutura molecular da dipirona sódica

A dipirona sódica é um medicamento com propriedades analgésicas e antipiréticas indicado no tratamento sintomático da dor e febre, age simultaneamente a nível central e periférico, sua absorção é rápida, uniforme e quase completa. Cerca de 58 % da dose liga-se às proteínas plasmáticas, proporcionando o efeito do fármaco em aproximadamente 15 minutos após a administração do medicamento. A biotransformação da droga ocorre a nível hepático, com duração do efeito de aproximadamente 4 a 7 horas. A eliminação da droga ocorre a nível renal sendo cerca de 70 % de uma dose excretada pela urina após 24 horas da ingestão⁹⁰.

Após a ingestão de dipirona, pelo menos sete metabólitos poderão ser detectados no plasma, e seis destes na urina. Os metabólitos mais importantes são 4-N-metilaminofenazona, 4-aminofenazona, 4-N-acetilaminofenazona e 4-N-formilaminofenazona. Na urina, os metabólitos mais significativos encontrados são os derivados formil e acetil. Circunstancialmente, uma coloração avermelhada da urina pode revelar a existência de outro metabólito da dipirona, o ácido rubazônico. Esta coloração avermelhada não tem significado clínico ou toxicológico⁹⁰.

1.8.2. Procedimentos para a Determinação de Dipirona

Diversos procedimentos espectrofotométricos foram descritos para a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas⁹¹⁻⁹⁵. Sistemas de análise por injeção em fluxo foram desenvolvidos para a determinação de dipirona com detecção na região do UV-visível utilizando diferentes reagentes como, *p*-dimetilaminocimaldeído⁹⁶, *p*-dimetilaminobenzaldeído⁹⁷, I_3^- ⁹⁸ e molidato de amônio⁹⁹. Além desses procedimentos, a dipirona foi determinada em formulações farmacêuticas empregando sistema de análise por injeção em fluxo com detecção coulométrica¹⁰⁰, absorção atômica¹⁰¹, turbidimétrica¹⁰², amperométrica^{103,104}, biamperométrica¹⁰⁵, quimiluminescente¹⁰⁶ e fluorimétrica¹⁰⁷.

WEINERT *et al.*⁹⁶ propuseram um procedimento empregando sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas. O procedimento envolveu a reação entre a dipirona e o *p*-dimetilaminocimaldeído (*p*-DAC) em meio ácido empregando dodecil sulfato de sódio como meio micelar. Com o emprego deste reagente houve um aumento de quase seis vezes na sensibilidade do procedimento.

LIMA *et al.*⁹⁷ propuseram um sistema em fluxo utilizando micro-bombas para a determinação de dipirona em formulações empregando *p*-dimetilaminobenzaldeído (PDBA) como reagente cromôgenico. A curva analítica foi linear na região de concentração de 10 a 400 mg L⁻¹. O limite de detecção e o limite de quantificação obtidos foram de 1,0 e 4,0 mg L⁻¹, respectivamente e frequência de amostragem obtida foi de 50 h⁻¹.

PEREIRA *et al.*⁹⁸ desenvolveram um procedimento para determinação de dipirona baseado na geração de íons triiodeto num sistema de análise por injeção em fluxo pela mistura de soluções de iodato e iodeto-amido. Os íons triiodeto gerados em linha ao reagirem com a dipirona injetada no sistema oxidam o grupo metanossulfônico do fármaco a sulfato. O consumo de íons I_3^- pela dipirona provoca um decréscimo da absorbância do complexo triiodeto-amido que foi monitorado espectrofotometricamente em 580 nm. O limite de detecção encontrado foi de $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com uma frequência de amostragem de 60 h⁻¹.

Alguns procedimentos foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa empregando sistema em fluxo para a determinação de dipirona. Um sistema de análise por injeção em fluxo de linha única utilizando o molibdato de

amônio como reagente cromogênico foi desenvolvido⁹⁹. O procedimento foi baseado na reação de formação do ácido molíbdico a partir da reação do molibdato de amônio em meio ácido, e em seguida a redução do ácido molíbdico pela dipirona formando o azul de molibdênio que foi monitorado espectrofotometricamente em 620 nm. O procedimento foi linear no intervalo de concentração de dipirona de $5,0 \times 10^{-4}$ a $8,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $9,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. O desvio padrão relativo de 10 determinações sucessivas de dipirona $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi de 1,7 % e a frequência de amostragem alcançada foi de 60 h⁻¹.

Um reator em fase sólida contendo AgCl_(s) foi inserido em um sistema FIA de linha única, para atuar como fonte de íons Ag⁺. O procedimento baseou-se na propriedade redutora da dipirona¹⁰². Os íons Ag⁺ contidos no reator foram reduzidos pela dipirona a Ag⁰ que foi, então, detectada turbidimetricamente em 425 nm. A concentração de dipirona injetada no sistema foi proporcional à quantidade de Ag⁰ gerada. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de dipirona entre $5,0 \times 10^{-4}$ e $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O desvio padrão relativo de 10 determinações sucessivas de dipirona $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi de 1,8% e a frequência de amostragem alcançada foi de 45 h⁻¹.

Um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica utilizando microeletrodos foi proposto por MATOS *et al.*¹⁰³ para a determinação simultânea de dipirona, ácido ascórbico, dopamina e adrenalina. O método baseou-se em um sistema de multicanais de detecção acoplados a uma célula de fluxo contendo um arranjo de microeletrodos modificados pela eletrodeposição de diferentes metais nobres.

PEREZ-RUIZ *et al.*¹⁰⁴ utilizaram um eletrodo de carbono vítreo para a determinação de dipirona em um sistema de análise por injeção em fluxo. O método baseou-se na oxidação da dipirona sobre a superfície do eletrodo em um potencial de 0,4 V vs. Ag/AgCl em tampão amônio (pH 9,0). A frequência de amostragem alcançada foi de 54 h⁻¹ com uma curva de calibração linear no intervalo de $3,0 \times 10^{-6}$ a $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

NASCIMENTO *et al.*¹⁰⁵ desenvolveram um procedimento em fluxo com detecção biampométrica empregando dois sistema redox Fe(III)/Fe(II) e I₂/I⁻ para a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas. A frequência de amostragem obtida foi de 71 h⁻¹ e um RSD de 1,6% foi obtido para uma

concentração de dipirona de 14 mg L⁻¹. A curva analítica foi linear na região de concentração de dipirona de 10 a 50 mg L⁻¹.

1.8.3. Método Oficial

A Farmacopéia Brasileira preconiza a iodimetria para a determinação quantitativa de dipirona sódica¹⁰⁸.

1.9. Cloridrato de Fluoxetina

1.9.1. Aspectos Gerais

Nos últimos anos vários antidepressivos foram introduzidos no mercado, principalmente os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS). Esses fármacos alteraram radicalmente o tratamento da depressão por serem mais aceitáveis em termos de tolerabilidade e toxicidade. Os 5 ISRSs atualmente disponíveis no mercado são: a fluoxetina, a sertralina, a paroxetina, o citalopram e a fluoroxamina¹⁰⁹.

O cloridrato de fluoxetina (FXT), (\pm)-*N*-metil-3-fenil-3-[(α,α,α -trifluor-*p*-toluolil)-oxi]propilamina, cuja estrutura química é mostrada na Figura 1.5, é uma droga antidepressiva, amplamente prescrita no tratamento de várias condições médicas, como depressão, ansiedade, bulimia, transtorno obsessivo compulsivo, transtorno do pânico, fobia social e transtorno pós-traumático¹⁰⁹.

A presença do substituinte *p*-trifluorometil na molécula parece contribuir para a alta seletividade do fármaco e sua potencialidade para a inibição da recaptação de serotonina, possivelmente como resultado do efeito de repulsão eletrônica ou de lipofilicidade¹¹⁰.

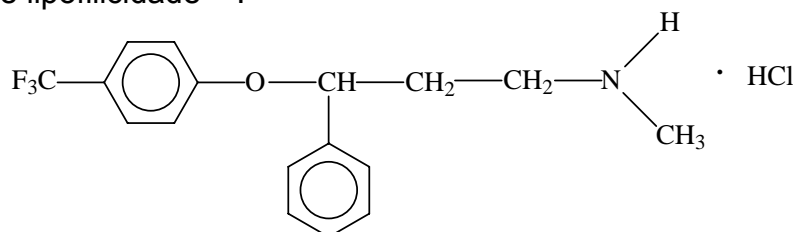


Figura 1.5. Estrutura molecular do cloridrato de fluoxetina

A fluoxetina é extremamente ativa como bloqueador do transporte da serotonina pelo sistema nervoso central. Sendo uma amina secundária é

desmetilada a norfluoxetina, composto também ativo. Ela não exibe efeitos anticolinérgicos e hipotensores como os antidepressivos tricíclicos (ADT), pois não bloqueia os receptores muscarínicos, H₁-histaminérgicos e α₁-adrenérgicos. As reações adversas mais comuns relacionados a fluoxetina são boca seca, sudorese, cefaléia, diarreia, sonolência e insônia¹¹⁰.

Devido à sua importância farmacológica e terapêutica, além de relativa ausência de reações adversas graves e baixo potencial de abuso, o cloridrato de fluoxetina tornou-se um dos antidepressivos mais utilizados no tratamento de alguns transtornos neurológicos. Dessa forma, há um interesse no desenvolvimento de métodos analíticos simples e viáveis para a determinação deste analito em amostras comerciais, uma vez que não contendo o princípio ativo em quantidade apropriada ao consumo acarreta um sério problema de saúde pública em todo o mundo.

1.9.2. Procedimentos para a Determinação de Cloridrato de Fluoxetina

Um grande número de procedimentos analíticos para a determinação de fluoxetina tem sido publicado desde a sua introdução no mercado na década de oitenta. Estes procedimentos incluem espectrofotometria¹¹¹⁻¹¹⁵, voltametria^{116,117} e cromatografia líquida com detecção fluorimétrica¹¹⁸.

Poucos procedimentos empregando análise por injeção em fluxo são descritos na literatura para a determinação de cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas.

SHAH *et al.*¹¹⁹ desenvolveram um procedimento em fluxo baseado na hidrólise da fluoxetina. O produto da hidrólise, metilamina, ao reagir com o nitroprussiato de sódio, em um ponto de confluência do sistema FIA, gerou um cromóforo que foi monitorado espectrofotometricamente em 510 nm. A curva analítica foi linear na região de concentração de 0,5 a 25 mg L⁻¹ e um limite de detecção de 0,15 mg L⁻¹ foi obtido.

Um procedimento para a determinação fluorimétrica de fluoxetina empregando um sistema FIA foi proposto por MARTIN & PEREZ¹²⁰. O procedimento baseou-se na hidrólise ácida da fluoxetina. O produto fluorescente apresentou um espectro máximo de excitação e emissão de 253 e 306 nm, respectivamente.

NOUWS *et al.*¹²¹ descreveram um procedimento empregando voltametria de redissolução por onda quadrada para a determinação de fluoxetina em formulações farmacêuticas. O procedimento foi baseado na redução da

fluoxetina em um eletrodo de mercúrio em um potencial de -1,2 V versus Ag/AgCl em tampão fosfato pH 12. Este procedimento apresentou uma frequência de amostragem de 120 h⁻¹.

A determinação de fluoxetina em amostras comerciais foi proposta por MARQUES *et al.*¹²² empregando um sistema em fluxo com detecção quimiluminescente empregando luminol e hipoclorito. Esse trabalho baseou-se na capacidade da fluoxetina inibir a luminescência gerada da reação do luminol com hipoclorito. O limite de detecção de 0,31 mg L⁻¹ e uma frequência de amostragem de 136 h⁻¹ foram obtidos.

AFKHAMI *et al.*¹²³ propuseram um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de fluoxetina. Esses pesquisadores empregaram a reação de complexação da fluoxetina com o complexo fenolftaleína-β-ciclodextrina. Após a inserção da fluoxetina no meio reacional houve o aumento da absorbância, devido ao deslocamento da fenolftaleína do complexo, gerando o complexo fluoxetina-β-ciclodextrina que possui uma absorvidade molar maior do que o complexo fenolftaleína-β-ciclodextrina. Esse procedimento apresentou uma curva analítica linear na região de concentração de 5,0 × 10⁻⁵ a 1,0 × 10⁻² mol L⁻¹ e uma frequência de amostragem de 80 h⁻¹.

1.9.3. Método Oficial

A Farmacopéia Americana¹²⁴ recomendada a cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação quantitativa de cloridrato de fluoxetina com detecção espectrofotométrica em 227 nm.

1.9.4. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de métodos mecanizados utilizando sistemas de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica e turbidimétrica, reatores em fase acoplados ao sistema FIA e microssistema analítico construído com LTCC para a determinação de N-acetilcisteína, captopril, dipirona e cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas. Esses fármacos foram selecionados devido a importância farmacológica e por serem de amplo consumo da população.

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

2.1.1. Princípios Fundamentais

No processo de análise por injeção em fluxo, alíquotas de amostra (e eventualmente de reagentes) são inseridas em um fluido transportador, que a transporta em direção ao detector. No decorrer do processo, a amostra sofre dispersão na solução transportadora, produzindo uma zona de amostra caracterizada pela existência de gradientes de concentração. O grau de dispersão é um dos principais aspectos relacionados com o desempenho de um sistema em fluxo, porque ele determina os graus de diluição e de mistura, bem como a frequência com que as amostras podem ser introduzidas sem que os sinais sejam afetados pela amostra precedente¹²⁵.

Caso necessário, reações químicas podem ocorrer durante o transporte da zona de amostra em direção ao sistema de detecção. Em função da existência dos gradientes de concentração e da medida ser feita com a zona de amostra em movimento em relação ao sistema de detecção, obtém-se um sinal transiente, cuja altura pode ser relacionada à concentração inicial da espécie de interesse¹²⁵.

2.1.2. Constituição

Os sistemas FIA são constituídos por uma unidade propulsora de fluidos, de inserção da amostra, de reação/mistura e de detecção (Figura 2.1). Opcionalmente, estas unidades podem ser controladas por uma unidade de controle de aquisição de dados, a qual pode estar acoplada a uma unidade de processamento e arquivo.

A unidade propulsora na maior parte dos sistemas é constituída de uma bomba peristáltica. Outras formas de propulsão incluem as bombas tipo seringa de pistão, através de pressão por gases e mesmo por gravidade. Sua função é movimentar constante e uniformemente os reagentes, amostras e fluidos transportadores. Caso se utilize como unidade de propulsão uma bomba peristáltica, a escolha dos tubos de bombeamento é muito importante. Diferentes materiais para os tubos são oferecidos, dependendo do tipo de solvente e concentração das

soluções. Tubos de Tygon são adequados para soluções aquosas ácidas ou alcalinas diluídas. Em bombas com velocidade de rotação fixa, os diâmetros internos dos tubos determinam a magnitude da vazão.

A bomba peristáltica deve possuir torque suficiente para manter a vazão constante, mesmo que ocorram variações na impedância hidrodinâmica do sistema. A impedância hidrodinâmica aumenta com o comprimento do percurso analítico, com a viscosidade das soluções e com a diminuição do diâmetro interno da tubulação¹²⁵.

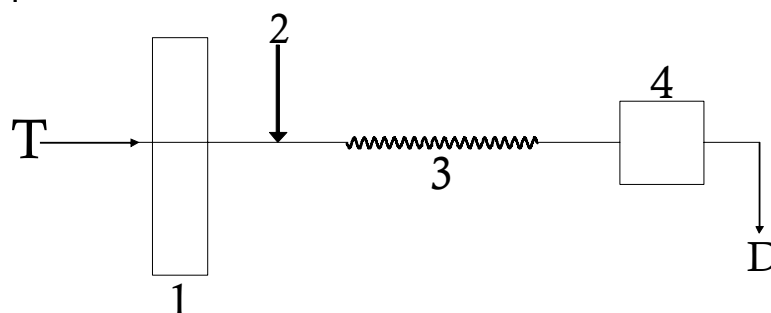


FIGURA 2.1. Representação esquemática de um sistema FIA simples de linha única. Onde: **T** é a solução transportadora; **1**, unidade de propulsão; **2**, unidade de comutação; **3**, unidade de reação; **4**, unidade de detecção e **D**, descarte.

O injetor é um dispositivo fundamental do sistema de análise por injeção em fluxo, serve para introduzir um volume discreto e reproduzível de uma amostra no percurso analítico. A seleção e a inserção de alíquotas podem ser feitas empregando-se diversos dispositivos, entre os quais se destaca o injetor proporcional devido à simplicidade e versatilidade. Esse injetor é constituído por três peças de acrílico, sendo duas fixas e uma central móvel, que por meio de movimentos para frente e para trás, ou vice-versa, o injetor coleta a amostra e a insere no percurso analítico¹²⁶.

O percurso analítico é a unidade do sistema FIA onde ocorrem às etapas de reação e/ou mistura. No dimensionamento do percurso analítico deve se levar em conta, o tempo de residência da amostra e, portanto, as vazões do transportador e dos reagentes, que estão intimamente ligados à frequência de amostragem. O aumento do percurso analítico implica na diminuição do sinal analítico, o que ocorre devido ao processo de dispersão da zona da amostra. Entretanto, se a cinética da reação for lenta ocorre o aumento do sinal analítico com o aumento do percurso analítico. O processo de dispersão da amostra, intrínseco aos sistemas de análise por injeção em fluxo, é dependente das características físico-químicas das soluções (e.g. viscosidade), bem como das dimensões dos

componentes do sistema (volume da alça de amostragem, material, diâmetro e comprimento dos tubos que constituem o percurso analítico)^{8,125}. Usualmente, as medidas são efetuadas com esses parâmetros mantidos constantes, permitindo a obtenção de resultados caracterizados por alta repetibilidade.

A unidade de detecção deve possuir baixa histerese, alta repetibilidade e reprodutibilidade dos sinais. De acordo com a espécie a ser quantificada, tem sido empregadas, praticamente, todas as técnicas usuais em química analítica, a saber: espectrofotometria no ultravioleta-vísivel, absorção e emissão atômica, potenciometria, amperometria, turbidimetria, quimilumescência entre outras¹²⁷.

2.1.3. Configurações Elementares

As configurações dos sistemas FIA mais elementares são os sistemas de linha única, sistemas em confluência e sistemas com zonas coalescentes (Figura 2.2. a, b e c). Os sistemas FIA também podem ser ainda projetados a partir de implementações de outras variáveis nos sistemas elementares. Exemplos dessas implementações são os sistemas com fluxo intermitente (Figura 2.2. d), aprisionamento de zona de amostra, amostragem na zona de amostra, etc.

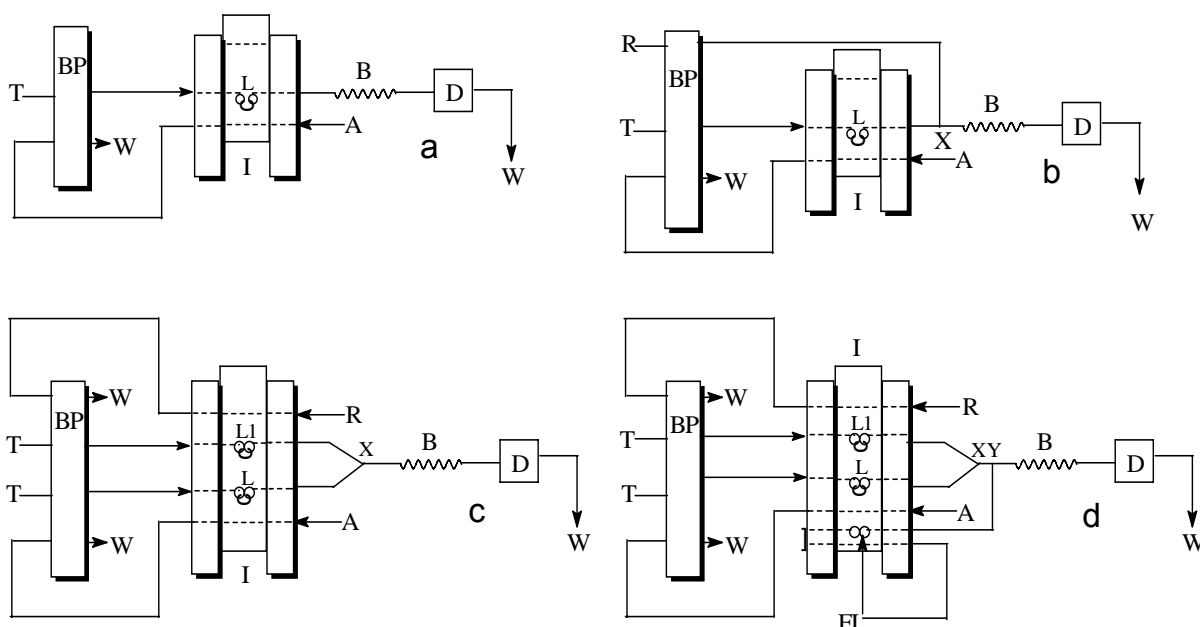


FIGURA 2.2. Configurações de sistemas FIA. (a) sistema de linha única, (b) sistema com confluência, (c) sistema com zonas coalescentes e (d) sistema com zonas coalescentes e fluxo intermitente. R, reagente; A, amostra; L, alça de amostragem; L1, alça do reagente; B, bobina helicoidal; X e Y pontos de confluência; T, solução transportadora; BP, bomba peristáltica; I, injetor proporcional; D, detector e W, descarte.

2.1.3.1. Sistema de Linha Única

O sistema FIA de linha única é o sistema mais simples (Figura 2.2a), o qual não apresenta pontos de confluência no percurso analítico. O fluido transportador é em geral, uma solução quimicamente inerte, cuja função principal é transportar a amostra injetada até a unidade de detecção, promovendo dispersão controlada da amostra e posteriormente limpando o percurso analítico. Eventualmente, o fluido transportador pode ser uma solução reagente, o qual reage com a amostra devido ao fenômeno de dispersão. Entretanto, nessa situação o reagente não é idealmente utilizado. Sistemas de linha única são frequentemente empregados em conexão com espectrometria de absorção atômica, potenciometria, métodos que não requerem adição de reagentes ou naqueles envolvendo alta diluição da amostra¹²⁵.

2.1.3.2. Sistema com Confluência

No sistema com confluência ideal a amostra é injetada em um fluido transportador quimicamente inerte, o qual apresenta características matriciais semelhantes à amostra. A adição de reagentes ocorre via pontos de confluência (Figura 2.2b). O reagente adicionado por confluência, logo após o injetor, permite que cada fração da amostra receba a mesma quantidade de reagente. A partir da confluência somam-se as vazões do transportador e do reagente, então a amostra é distribuída em um espaço maior que o ocupado anteriormente, o que corresponde a uma diluição. Neste caso, a amostra ocupa uma maior fração do percurso analítico, o que é equivalente ao emprego de uma alça de amostragem mais longa, e isso aumenta a dispersão. É conveniente que se conheça em que extensão a vazão confluyente afeta a magnitude da medida¹²⁵.

2.1.3.3. Sistema com Zonas Coalescentes

Nestes sistemas, tanto a amostra como o reagente são introduzidos simultaneamente, com sua interação ocorrendo por um ponto de confluência dos respectivos fluidos transportadores (Figura 2.2c). O emprego de zonas coalescentes leva a uma economia significativa de reagentes, em comparação com os sistemas em linha única e por confluência, uma vez que o reagente somente é consumido em presença da amostra, sendo recuperado durante a limpeza do percurso analítico

pelos fluidos transportadores. Zonas coalescentes têm sido utilizadas ainda, visando: maior estabilidade da linha base com conseqüente melhoria na precisão da medida, determinações simultâneas, utilizando um único módulo de análise, preparação em linha de reagentes instáveis, mecanização do método das adições de padrão, facilidade em estudos de interferência sem a necessidade de se preparar um número excessivo de soluções padrão misto, determinação de altas concentrações de espécies químicas sem pré-diluição de amostras^{125,129,130}.

2.1.3.4. Sistema com Fluxo Intermitente

O emprego de fluxo intermitente (Figura 2.2d), em um sistema FIA, geralmente é utilizado para a limpeza do percurso analítico e da cela de fluxo, o que ocasiona a estabilidade na linha base e repetibilidade dos sinais analíticos. A entrada do fluxo intermitente se dá quando o injetor está na posição de amostragem. Uma das grandes vantagens da utilização do fluxo intermitente é evitar o fluxo contínuo, por exemplo, de reagentes tóxicos, pois em fluxo contínuo a geração de resíduos é muito grande. Outra possibilidade é a regeneração de um reator em fase sólida quando este vai sendo consumido pela ação do analito^{56,131}.

2.2. Reatores em Fase Sólida (RFS)

Uma das grandes vantagens dos procedimentos em fluxo é a facilidade com que novos componentes podem ser adicionados ao sistema para atingir um objetivo analítico particular. Um exemplo disso é a incorporação de RFS posicionados num dado ponto do sistema com a finalidade de tornar uma espécie detectável através de uma simples pré-concentração ou de reações na interface sólido-solução¹³².

Desde as primeiras investigações envolvendo o uso de um RFS acoplado ao sistema FIA, o uso deste implemento tem sido amplamente explorado tornando-se uma das modificações mais interessantes nesse tipo de sistema. Trocadores iônicos vêm sendo usados como RFS com diversas finalidades como a pré-concentração de analitos, ou para remover componentes da matriz que causariam interferência na detecção, ou ainda para converter uma amostra em uma espécie detectável. O uso de enzimas imobilizadas vem crescendo devido à grande seletividade dessas proteínas, além do uso de agentes redutores e oxidantes,

principalmente na forma de colunas de cádmio cuperizado e sais e óxidos, respectivamente.

O confinamento de reagentes num RFS pode ser alcançado pela utilização direta de reagentes insolúveis nas soluções que fluem através do reator, denominada imobilização natural, ou pela retenção dos reagentes em suportes sólidos através de um mecanismo físico ou químico.

Reagentes imobilizados e suportes de imobilização podem ser combinados adequadamente para dar lugar a uma grande variedade de possibilidades analíticas. Na preparação dos reagentes em fase sólida deve-se considerar tanto o mecanismo físico-químico empregado na imobilização como a configuração interna do reator.

2.2.1. Vantagens do Emprego de Reatores em Fase Sólida

A razão do emprego de reagentes sólidos ao invés de soluções pode ser justificada por algumas vantagens oferecidas pelo acoplamento de RFS em sistema por injeção em fluxo^{4,133}:

- a) aumento da sensibilidade como resultado da diminuição da dispersão da amostra. A transferência radial de massa em um RFS é mais intensa e a espécie de interesse que passa pelo reator (analito ou reagente) é convertida mais prontamente em um ponto do sistema onde nenhuma dispersão ocorre. Esses fatores resultam em um aumento do sinal analítico e na possibilidade da diminuição do volume da amostra injetado;
- b) simplificação do sistema, uma vez que dispensa um canal adicional que deveria conduzir a solução do reagente. A miniaturização de sistema por injeção em fluxo é possível principalmente quando a imobilização do reagente é na célula de fluxo de um detector óptico;
- c) a economia de reagentes é uma consequência das pequenas quantidades requeridas com reagentes sólidos e, de modo ideal, o reagente só deve ser consumido durante a passagem da espécie de interesse pelo reator;
- d) emprego de RFS quando o reagente não existe na forma solúvel como é o caso de amálgamas e resinas de troca-iônica que são disponíveis apenas na forma de partículas sólidas.

2.2.2. Posições dos RFS no Sistema FIA

Um fator importante no estudo de sistemas de análise por injeção em fluxo com uso de RFS é a posição do reator no sistema, que depende de sua função no processo analítico^{4,133}.

De acordo com as posições indicadas na Figura 2.3 (a, b, c, d e e), os RFS podem ser utilizados com as seguintes finalidades:

- pré-tratamento de reagente. Nesta posição, o reator pode tanto remover impurezas do reagente como liberar ou gerar reagentes instáveis;
- na alça de amostragem, com o propósito de conversão da amostra, podendo-se fazer também pré-concentração da amostra e multi-determinação;
- antes do sistema de injeção, com a finalidade de pré-tratamento da amostra;
- como optossensor, ou seja, reagente imobilizado no sistema de detecção. A finalidade é explorar as vantagens desse tipo de configuração como o aumento da sensibilidade, seletividade e miniaturização;
- entre o injetor e o detector, servindo assim para a conversão da amostra. É a posição mais utilizada para o posicionamento dos reatores no sistema em fluxo.

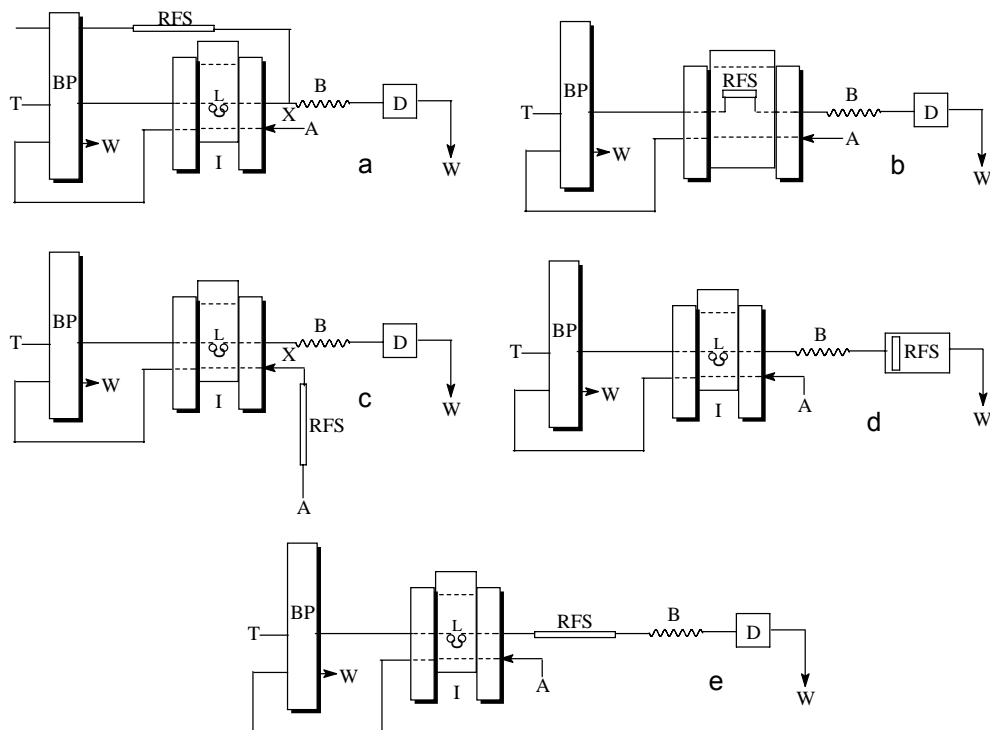


FIGURA 2.3. Esquema demonstrativo das principais posições dos RFSs empregadas em sistemas de análises por injeção em fluxo. A, amostra; B, bobina helicoidal; L, alça de amostragem; T, solução transportadora; RFS, reator em fase sólida; X, ponto de confluência; BP, bomba peristáltica; I, injetor proporcional; D, detector e W, descarte.

2.2.3. Características dos Reagentes Imobilizados e dos Suportes

Quando se busca uma metodologia que empregue o uso de RFS, deve-se levar em conta algumas características importantes^{4,133}:

- a) o tamanho de partícula deve ser compatível com a pressão hidrodinâmica do sistema FIA, além de permitir que as soluções passem livremente pelo reator;
- b) a reação deve se proceder de forma rápida, para que a máxima conversão do analito seja alcançada no reator, que também deve ser quimicamente inerte às soluções que passem por ele, aumentando assim o seu tempo de vida útil;
- c) as partículas imobilizadas no reator devem ser mecanicamente resistentes ao fluxo, para que não ocorra o aparecimento de espaços livres com o passar do tempo, o que aumentaria a dispersão da amostra no sistema. Além disso, a fragilidade das partículas poderia ocasionar uma quebra das mesmas e, conseqüentemente, um aumento na pressão hidrodinâmica do sistema. Isso acarretaria em mudanças no grau de conversão da amostra pelas variações na superfície de contato.

2.2.3.1. Imobilização em Suportes

2.2.3.1.1. Imobilização em Polímeros

A imobilização por “aprisionamento” ou retenção física em polímeros foi proposta por ZAMORA *et al.*¹³³ O processo consiste na mistura do reagente de interesse com uma solução do monômero de poliéster e, após a polimerização e conseqüente solidificação do polímero, o reagente fica confinado em um bloco rígido e pode ser manipulado a fim de se obter partículas com granulometria adequada para o sistema em fluxo. Após o primeiro trabalho, tratando da imobilização de MnO₂ em resina poliéster para a determinação de isoniazida por absorção atômica, um número muito grande de trabalhos foi proposto utilizando RFS para a determinação de analitos de interesse farmacêutico. Na Tabela 2.1, são indicados alguns trabalhos onde os reagentes sólidos foram imobilizados em resinas poliméricas.

Tabela 2.1. Trabalhos propostos na literatura empregando resina polimérica para a imobilização de reagentes.

Reagente	Analito	Detector	Ref.
MnO _{2(s)}	isoniazida	AAS	133
CuCO _{3(s)}	ácido salicílico	AAS	134
Cu ₃ (PO ₄) _{2(s)}	ácido ascórbico	UV-Vis	135
Zn ₃ (PO ₄) _{2(s)}	aspartame	UV-Vis	136
CoCO _{3(s)}	cisteína	UV-Vis	137
Fe(OH) _{3(s)}	ácido ascórbico	UV-Vis	138
AgCl _(s)	dipirona	UV-Vis	102
PbO _{2(s)}	adrenalina	UV-Vis	139
CoCO _{3(s)}	penicilamina	UV-Vis	140
PbO _{2(s)}	L-dopa	UV-Vis	141
MnO _{2(s)}	isoproterenol	UV-Vis	142

AAS = Espectrometria de Absorção Atômica

2.2.3.1.2. Imobilização Natural

Na imobilização natural¹³³, reagentes sólidos e de baixa solubilidade (sais, óxidos, metais, amálgamas), resinas de troca-iônica, adsorventes e enzimas em seus ambientes naturais (células, tecidos, bactérias) são utilizados em colunas e acopladas diretamente aos sistemas de análise por injeção em fluxo.

As limitações da imobilização natural são o aumento da pressão hidrodinâmica do sistema em fluxo, decorrente do tamanho reduzido da partícula com consequente incompatibilidade com as baixas pressões características de sistemas de análise por injeção em fluxo e ainda, a reatividade química (solubilidade no meio reacional).

2.2.3.1.3. Imobilização de Reagentes em Resinas de Troca-Iônica

A imobilização de reagentes em suportes sólidos pode envolver o confinamento do reagente em membranas microporosas, resinas de troca-iônica através de ligações eletrostáticas, bem como ligação covalente sobre carbono ou esferas de vidro de porosidade controlada após a silanização (e.g. imobilização de enzimas)¹³³. As resinas de troca-iônica têm sido amplamente utilizadas como

suporte de reagentes na preparação de reatores em fase sólida. As resinas trocadoras ácidas são preparadas por sulfonação do anel benzênico com ácido sulfúrico concentrado ou ácido clorosulfônico. As resinas aniônicas são preparadas pela clorometilação seguida por uma reação com uma amina terciária ou outro reagente apropriado¹⁴³. O emprego de resinas aniônicas na imobilização de reagentes tem se mostrado muito vantajoso na eliminação de interferentes presentes nas amostras¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

2.3. Métodos de Análise

2.3.1. Espectrofotometria no UV-vísivel^{147,148}

A palavra espectrofotometria no UV-vísivel designa uma técnica de análise baseada em medidas de absorção de radiação eletromagnética, sendo restrita a uma pequena região de comprimento de onda da radiação eletromagnética, que corresponde a luz visível e ultra-violeta variando entre 200 e 760 nm.

A luz tem radiações eletromagnéticas para as quais a vista é sensível, a luz branca é composta por todos os comprimentos de onda do espectro visível que abrange um intervalo de 400 a 760 nm. A percepção visual das cores é provocada pela absorção seletiva, por um objeto que absorve certos comprimentos de onda da luz incidente. Outros comprimentos de onda ou são refletidos ou transmitidos, de acordo com a natureza do objeto, e são percebidos pela vista humana como a cor do objeto. A Tabela 2.2 apresenta os comprimentos de onda aproximados para as cores no espectro na região do visível.

TABELA 2.2. Relação para várias partes do espectro visível

Região de comprimento de onda absorvida, nm	cor da luz absorvida	cor complementar transmitida
400 – 435	violeta	amarela-esverdeada
435 – 480	azul	amarela
480 – 490	azul-esverdeada	laranja
490 – 500	verde-azulada	vermelha
500 – 560	verde	púrpura
560 – 580	amarela-esverdeada	violeta
580 - 595	amarela	azul
595 - 650	laranja	azul-esverdeada
650 - 750	vermelha	verde-azulada

A variação da intensidade da cor de um sistema com a modificação da concentração de um componente constitui a base da análise espectrofotométrica. A cor é provocada pela formação de um cromóforo, resultante da adição de um reagente apropriado ou pode ser propriedade intrínseca do analito.

A intensidade da cor pode ser comparada com a que se obtém pelo tratamento idêntico de uma quantidade conhecida da substância. A equação fundamental (Equação 2.1) que rege a espectrofotometria é a Lei de Lambert-Beer. Lambert-Beer estudaram o efeito da concentração do cromóforo numa solução, sobre a transmissão ou absorção da luz e descobriram que a intensidade de um feixe de luz monocromática diminui exponencialmente com a concentração da substância que absorve a luz. Ou seja:

$$A = \log I_0 / I_t = \epsilon b C \quad (2.1)$$

Onde **A** é a absorbância, I_0 é a luz incidente, I_t é a luz transmitida, ϵ é o coeficiente da absorvidade molar ($L \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), **b**, o caminho óptico (cm) e **C** a concentração do cromóforo (mol L^{-1}). Como o coeficiente de absorvidade molar é um valor intrínseco da substância e, portanto constante, o mesmo ocorrendo para o caminho óptico, a absorbância medida deve ser proporcional à concentração de uma espécie de interesse, obtendo-se assim uma dependência linear entre as duas variáveis onde o coeficiente angular da reta é o produto ϵb .

2.3.2. Turbidimetria^{149,150}

Turbidimetria é um método que se baseia na determinação de um analito de interesse na forma de um composto insolúvel em suspensão. O método depende do espalhamento elástico da luz quando um feixe de luz passa através de uma solução contendo o material particulado em suspensão¹⁴⁹.

Assim, nos métodos turbidimétricos o decréscimo da intensidade de luz em função da concentração do material particulado em solução é determinado medindo-se a radiação transmitida em uma cela contendo a amostra com o detector posicionado na mesma direção da luz incidente (ângulo de 0°).

A equação empregada em análise turbidimétrica (Equação 2.2) é exatamente a mesma que rege a análise espectrofotométrica (Lei de Lambert-Beer).

Quando um feixe de radiação de intensidade I_0 passa através de um meio não absorvente que espalha a luz, a intensidade transmitida I é dada pela expressão:

$$I = I_0 e^{-Tb}$$

Onde T é a turbidez, ou coeficiente de turbidez, e b o caminho óptico do meio turbido. A turbidez T pode ser linearmente relacionada com a concentração C do espalhamento das partículas, sendo $k = 2,303 T / C$. Assim, a relação com a Lei de Beer pode ser aplicada, ou seja,

$$T = -\log I / I_0 = k b C \quad (2.2)$$

A turbidimetria é o método mais indicado quando se trabalha com concentrações elevadas das partículas em suspensão. Nesse caso, um simples espectrofotômetro poderá ser empregado nessas determinações. Na turbidimetria para que se tenha uma boa reprodutibilidade dos resultados há necessidade de se controlar rigorosamente a granulometria das partículas selecionando-se as concentrações de analito e reagente, velocidade de misturas dessas soluções, concentração de outras espécies ou compostos químicos presentes (especialmente protetores de colóides como gelatina, goma-arábica, dextrinas, glicóis, PVC, álcool polivinílico, etc) e temperatura¹⁵⁰.

O emprego da turbidimetria em sistema FIA tem sido possível uma vez que a detecção em sistemas em fluxo é realizada com a amostra em movimento, evitando a sedimentação das partículas formadas em linha. Além disso, o emprego de surfactantes ao meio reacional contribui para que o tamanho das partículas seja o mais uniforme possível, além de manter o precipitado em suspensão, tornando o método eficiente e reprodutível.

Krug *et al.*¹⁵¹ foram os primeiros a relatar o uso da turbidimetria em sistemas FIA. Os autores empregaram cloreto de bário e álcool polivinílico (surfactante) para a determinação de sulfato por meio do monitoramento da suspensão de sulfato de bário gerado em linha.

Alguns exemplos de aplicações que foram desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa empregando sistema em fluxo com detecção turbidimétrica para a determinação de analitos de interesse farmacêutico são mostrados na Tabela 2.3.

TABELA 2.3. Alguns exemplos do emprego de sistemas FIA com detecção turbidimétrica para a determinação de fármacos descritos na literatura.

Analito	Reagente	Precipitado	Ref.
N-acetilcisteína	Ag ⁺	acetilcisteínato de prata	56
dipirona	Ag ⁺	suspensão coloidal Ag ⁰	102
tiamina	ácido silicontugístico	[Tiamina] ₂ [Si(W ₃ O ₁₀) ₄]	152
metilbrometo de homatropina	ácido silicontugístico	[homatropina] ₄ [Si(W ₃ O ₁₀) ₄]	153

CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação

3.1.1. Balança Analítica

Todas as medidas de massa foram realizadas utilizando-se uma balança analítica Mettler, modelo H10 com precisão de $\pm 0,1$ mg.

3.1.2. pHmetro

As medidas de pH das soluções foram realizadas utilizando-se um pHmetro Orion modelo EA 940.

3.1.3. Eletrodo de Vidro Combinado

As medidas de pH foram realizadas utilizando-se um eletrodo de vidro combinado Analion, modelo V620, com um eletrodo de referência interno de Ag/AgCl, contendo uma solução de KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.4. Bomba Peristáltica

Para a propulsão das soluções de amostras e reagentes, utilizou-se uma bomba peristáltica Ismatec IPC-12 (Zurique, Suíça) com 12 canais.

3.1.5. Tubos e Conexões

Foram empregados tubos e conexões de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm para confecção das bobinas helicoidais, alças de amostragem e linhas de condução de soluções de referência, amostras e reagentes. Os tubos de propulsão utilizados foram de Tygon[®] de diferentes diâmetros internos.

3.1.6. Injetor Comutador

As soluções de referência, das amostras, e dos reagentes foram introduzidas no sistema em fluxo utilizando-se um duplo injetor comutador manual 2-3-2 construído em acrílico¹²⁶.

3.1.7. Registrador

Para registros dos sinais analíticos obtidos utilizou-se um registrador x-t de dois canais (Cole Parmer, Niles, IL, USA, modelo 1202.0000).

3.1.8. Espectrofotômetros

As medidas dos espectros de absorção molecular foram feitas em um espectrofotômetro com arranjo linear de diodos Multispec 1501 (Shimadzu, Japão), empregando-se uma cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico e volume de 4 mL.

Nos sistemas em fluxo desenvolvidos neste trabalho, nos quais não foi utilizado o microssistema analítico construído com LTCC, utilizou-se um espectrofotômetro de feixe simples (Femto, modelo 435) com cela de fluxo construída em vidro com caminho óptico de 1,00 cm e volume de 80 μ L.

Para as medidas espectrofotométricas utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo empregando um microssistema analítico construído com LTCC, foi utilizado um espectrofotômetro da Ocean-Optics (USB 2000) acoplado ao um microcomputador para a aquisição dos sinais analíticos gerados.

3.1.9. Cromatógrafo

As análises cromatográficas foram realizadas empregando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu) de duplo feixe.

3.1.9.1. Micropipetas

Micropipetas (Eppendorf® modelo Research) de 100 a 500 μL e de 1,0 a 5,0 mL foram utilizadas para o preparo das soluções.

3.1.9.2. Fibra óptica e LED

Um cabo de fibra óptica (Ocean Optics, USA) foi utilizado para o transporte da radiação proveniente de um LED vermelho ($\lambda=622$ nm) do microssistema analítico (LTCC) até o sistema de detecção.

3.2. Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína Utilizando um Reator de $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ Imobilizado em Resina Poliéster Acoplado ao Sistema FIA

3.2.1. Reagentes e Soluções

Borato de sódio (Mallinckrodt), tetraborato de sódio (Merck), ácido bórico (Merck), vermelho de alizarina S (Merck), nitrato de mercúrio (II) (Merck) e N-acetilcisteína (Sigma), foram reagentes grau analítico. A água utilizada foi purificada por destilação e pelo sistema Milli-Q da Milli-Pore.

A solução estoque de N-acetilcisteína $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada no mesmo dia de sua utilização, dissolvendo-se uma massa de 12 mg de N-acetilcisteína em um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume foi completado com água desionizada. As soluções de referência foram preparadas por diluições apropriadas da solução estoque em balões volumétricos de 25,0 mL, completando-se os balões com água desionizada.

A solução tampão borato (pH 9,0) foi preparada pela mistura de volumes apropriados de tetraborato de sódio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido bórico $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ em um balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com água desionizada.

A solução de borato de sódio $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,0) foi preparada dissolvendo-se 3,82 g desse reagente em um balão de 1000 mL com água desionizada.

A solução de vermelho de alizarina S (VAS) $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 95,0 mg desse reagente em um balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com tampão borato (pH 9,0).

3.2.2. Preparação e Análise das Amostras Farmacêuticas

Quatro amostras contendo N-acetilcisteína adquiridas no comércio local (100 e 200 mg por envelope) na forma granulada foram analisadas com o emprego do procedimento desenvolvido.

Para a análise dos quatro produtos farmacêuticos, a massa contida em dez envelopes foi pesada e o pó obtido foi macerado com o auxílio de um almofariz e pistilo. Uma massa correspondente a 163 mg de N-acetilcisteína foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL, e adicionou-se água desionizada até completar esse volume. Em seguida, 1,3 mL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água desionizada. Alíquotas de 400 µL dessa solução foram injetadas utilizando um injetor manual. O teor de N-acetilcisteína nessas amostras foi determinado usando uma curva analítica obtida empregando-se soluções de referência de N-acetilcisteína e o resultado obtido comparado com um procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira²⁶.

3.2.3. Preparação e Imobilização do Zn₃(PO₄)_{2(s)}

Zn₃(PO₄)_{2(s)} foi preparado gotejando-se a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ uma solução de ZnSO₄.7H₂O 1,5 mol L⁻¹ em uma solução aquosa de Na₂HPO₄ 1,0 mol L⁻¹, sobre agitação constante durante dez minutos. O sólido branco produzido de Zn₃(PO₄)_{2(s)} foi filtrado, e em seguida lavado com água desionizada e seco a 70 °C por 4 horas em uma estufa.

Diversas proporções ponderais de resina poliéster e fosfato de zinco foram misturadas em frascos de polietileno. Após homogeneização manual, 0,5 mL do catalisador (peróxido de metiletilcetona) foi adicionado. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por 3-4 h. O sólido rígido obtido foi quebrado com martelo e um moinho multiuso Tecnal (mod. TE 631/1, Piracicaba, SP, Brasil) foi utilizado para obter partículas de menor granulometria. A seleção do tamanho das partículas foi realizada usando-se peneiras com granulometria apropriada.

3.2.4. Preparação do Reator em Fase Sólida

As partículas de $Zn_3(PO_4)_2$ imobilizadas em resina poliéster foram introduzidas por aspiração, com auxílio de uma seringa, em um tubo de PTFE (70 mm de comprimento \times 2,0 mm de diâmetro interno). Para isso foi vedada uma das extremidades do tubo com lã de vidro para evitar a saída das partículas do reator. Após o preenchimento total do reator com as partículas de $Zn_3(PO_4)_2$ a outra extremidade também foi vedada.

3.2.5. Procedimento Experimental

A Figura 3.1, mostra o diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação espectrofotométrica de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas. Esse sistema é baseado na reação de complexação entre a N-acetilcisteína e o Zn(II) imobilizado em um reator em fase sólida contendo fosfato de zinco. Os íons Zn(II) foram determinados espectrofotometricamente com o reagente vermelho de alizarina S (VAS) em tampão borato pH 9,0, formando um complexo ternário estável cuja razão estequiométrica é 1:3:3 $Zn(VAS-BO_3)_3$.

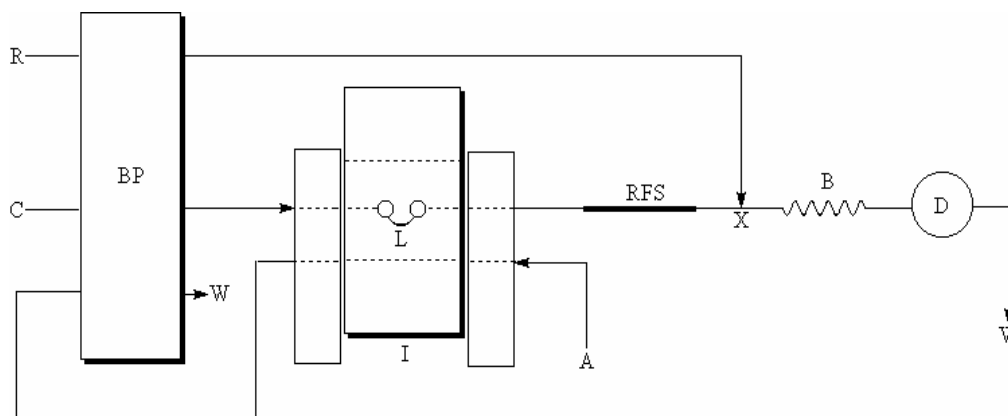


FIGURA 3.1. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação espectrofotométrica de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas. As representações são BP bomba peristáltica; I, injetor comutador; A, solução de amostra ou solução de referência; R, reagente vermelho de alizarina S ($5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $0,7 \text{ mL min}^{-1}$); L, alça de amostragem ($400 \mu\text{L}$); C, solução transportadora (tampão borato pH 9,0; $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $1,6 \text{ mL min}^{-1}$); B, bobina helicoidal (100 cm); X, ponto de confluência; RFS reator em fase sólida contendo fosfato de zinco imobilizado em resina poliéster (70 mm de comprimento \times 2,0 mm de diâmetro interno); D, espectrofotômetro em 540 nm e W, descarte.

Alíquotas de 400 μL (soluções de referência ou amostras) foram injetadas na solução transportadora (tampão borato pH (9,0)) utilizando-se um injetor comutador-manual. As soluções de N-acetilcisteína quando injetadas na solução transportadora, passavam pelo reator em fase sólida e o Zn(II) liberado pela formação do complexo Zn(II)-N-acetilcisteína, reagia com a solução de vermelho de Alizarina S (VAS) $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a partir do ponto de confluência X, gerando o complexo Zn(VAS-BO₃)₃ na bobina helicoidal de 100 cm. O complexo Zn(VAS-BO₃)₃ foi monitorado espectrofotometricamente em 540 nm. O aumento no sinal analítico foi proporcional à concentração do analito na solução injetada.

3.2.6. Método Oficial

O método oficial descrito na Farmacopéia Brasileira²⁶ foi empregado para validar o procedimento em fluxo proposto. Nesse procedimento, uma solução da amostra foi titulada potenciométricamente com uma solução padrão de nitrato de mercúrio(II) $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, empregando-se eletrodos de fio de ouro e de calomelano saturado, como eletrodo indicador e de referência, respectivamente.

3.3 Determinação Espectrofotométrica de Captopril Utilizando um Reator de Cloranilato de Prata Imobilizado em Resina Poliéster Acoplado ao Sistema FIA.

3.3.1. Reagentes e Soluções

Ácido cloranílico (Fluka), nitrato de prata (Reagen), nitrato de ferro nonahidratado (Vetec), ácido nítrico (Mallinckrodt), hidróxido de sódio (Chemco), nitrato de sódio (Reagen) e captopril (Sigma) foram reagentes grau analítico. A água utilizada foi purificada por destilação e pelo sistema Milli-Q da Milli-Pore.

A solução estoque de captopril $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada diariamente, dissolvendo-se com água desionizada 108 mg de captopril em um balão volumétrico de 100 mL. Soluções de referência contendo captopril entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas por diluição da solução estoque em água desionizada em balões volumétricos de 25,0 mL.

A solução de nitrato de ferro (III) nonahidratado de concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente dissolvendo-se aproximadamente 0,2 g do sal em um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água desionizada, sendo, então, padronizada por titulação complexométrica com EDTA empregando azul de Variamina como indicador. A solução de nitrato de ferro (III) de concentração $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi obtida diluindo-se apropriadamente a solução estoque, sendo uma alíquota de ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ adicionada no balão volumétrico para obtenção de uma concentração final de ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para evitar a hidrólise do Fe(III).

3.3.2. Preparo e Análise das Amostras

Para a análise de seis amostras contendo captopril que foram adquiridas no comércio local, dez comprimidos foram pesados e triturados com auxílio de um almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Massas exatamente determinadas em balança analítica foram transferidas para béqueres de 100 mL e dissolvidas com água desionizada. Excipientes insolúveis contidos na amostra foram removidos por filtração simples por gravidade e o filtrado transferido para balões volumétricos de 100 mL, sendo seus volumes completados com água desionizada, obtendo-se uma concentração teórica de captopril de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Alíquotas de 400 μL dessa solução foram injetadas utilizando um injetor manual. O teor de captopril nessas amostras foi determinado diretamente em uma curva analítica obtida empregando soluções de referência de captopril e o resultado obtido comparado com um procedimento potenciométrico descrito na literatura⁶⁵.

3.3.3. Preparação e Imobilização do Cloranilato de Prata

O cloranilato de prata ($\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$) foi preparado adicionando-se a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ 100 mL de AgNO_3 $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ em uma solução de ácido cloranílico $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (1,5 L). Após o término da adição da solução de nitrato de prata na solução de ácido cloranílico, a solução permaneceu sob agitação constante durante 24 horas. O sólido violeta de cloranilato de prata ($\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$) obtido, foi lavado com água desionizada e seco em ambiente escuro à temperatura ambiente

em um dessecador durante dois dias. Para a seleção e obtenção de partículas de menor granulometria foi utilizado o procedimento descrito no item 3.2.3.

3.3.4. Preparação do Reator em Fase Sólida

As partículas de $(Ag_2C_6Cl_2O_4)$ imobilizadas em resina poliéster foram introduzidas em um reator de 50 mm de comprimento \times 2,0 mm de diâmetro interno, como descrito no item 3.2.4.

3.3.5. Procedimento Experimental

A Figura 3.2, mostra o diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de captopril em formulações farmacêuticas empregando um reator em fase sólida contendo cloranilato de prata imobilizado em resina poliéster.

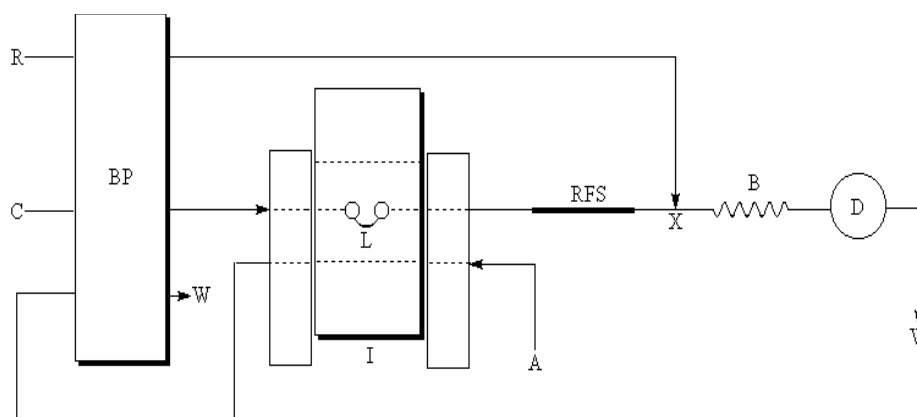


FIGURA 3.2. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação espectrofotométrica de captopril em formulações farmacêuticas. As representações são BP, bomba peristáltica; I, injetor comutador; A, amostra ou solução de referência; R, reagente $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ($8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $1,2 \text{ mL min}^{-1}$); L, alça de amostragem ($400 \mu\text{L}$); C, solução transportadora (água desionizada; $3,0 \text{ mL min}^{-1}$); RFS reator em fase sólida contendo cloranilato de prata imobilizado em resina poliéster (50 mm de comprimento \times 2,0 mm de diâmetro interno); B, bobina helicoidal (80 cm); X, ponto de confluência; D, espectrofotômetro em 528 nm e W, descarte.

Nesse sistema, solução de referência ou amostra de $400 \mu\text{L}$ foi introduzida na solução transportadora (água desionizada com uma vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$) com a ajuda de um injetor-comutador. No momento em que a alíquota da amostra ou solução de referência entra em contato com o reator em fase sólida

contendo cloranilato de prata, ocorre a formação de um sal insolúvel entre a Ag(I) e o captopril, liberando o ânion cloranilato que é transportado até o ponto de confluência X onde recebe a solução de nitrato de ferro (III) $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, formando um complexo violeta estável entre o Fe(III) e o ânion cloranilato na bobina helicoidal de 80 cm. Este complexo foi monitorado espectrofotometricamente em 530 nm. O sinal analítico obtido foi diretamente proporcional à concentração de captopril injetada no sistema em fluxo.

3.3.6. Método Comparativo

Como um método comparativo, as seis amostras de captopril foram analisadas por um procedimento potenciométrico proposto por Ribeiro *et al.*⁶⁵ As amostras comerciais de comprimido de captopril foram triturados com o auxílio de um almofariz e cerca de 217 mg de captopril foi acuradamente pesado e dissolvido em 40 mL de água desionizada, filtrando-se as partículas sólidas não dissolvidas em papel de filtro Whatman número 1. A força iônica da solução resultante foi ajustada com NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e diluída em uma balão volumétrico de 100 mL. Uma alíquota de 15 mL dessa solução foi transferida para uma cela de vidro termostatizada (25 ± 1)°C e potenciometricamente titulada com uma solução padrão de NaOH $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um eletrodo de vidro.

3.4. Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína e Captopril em Formulações Farmacêuticas Empregando a Formação do Azul da Prússia em Linha Utilizando um Sistema FIA com Zonas Coalescentes

3.4.1. Reagentes e Soluções

Hexacianoferrato de potássio (Ecibra), nitrato de ferro (III) nonahidratado (Vetec), hidróxido de sódio (Chemco), ácido oxálico (Reagen), ácido nítrico (Mallinckrodt), N-acetilcisteína (Sigma) e captopril (Sigma), foram reagentes grau analítico. A água utilizada foi purificada por destilação e pelo sistema Milli-Q da Milli-Pore.

As soluções estoque de N-acetilcisteína e de captopril foram preparadas do mesmo modo como descrito nos itens 3.2.1 e 3.3.1, respectivamente.

Para a preparação da solução de limpeza utilizada para limpar as paredes internas dos tubos de polietileno e da cela de fluxo, 5,0 g de ácido oxálico foram dissolvidos em um balão volumétrico de 1000 mL com uma solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de hexacianoferrato de potássio $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se com água desionizada uma massa de 330 mg do sal em um balão volumétrico de 100 mL.

A solução de nitrato de ferro (III) nonahidratado $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (padronizada como descrito no item 3.3.1) foi preparada diariamente dissolvendo-se uma massa de 81 mg do sal com uma solução de HNO_3 $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e o volume foi completado com a mesma solução em um balão volumétrico de 100 mL.

3.4.2. Preparação e Análise das Amostras Farmacêuticas

As seis amostras de captopril que foram analisadas no procedimento proposto foram preparadas como descrito no item 3.3.2.

As amostras sólidas de N-acetilcisteína foram preparadas do mesmo modo como descrito no item 3.2.2. Para a formulação líquida, uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água desionizada. Foi realizada uma diluição, objetivando-se obter uma concentração dentro do intervalo da curva analítica.

3.4.3. Procedimento Experimental

A Figura 3.3. mostra o diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes e fluxo intermitente empregado para determinação de N-acetilcisteína e captopril em formulações farmacêuticas utilizando a formação do azul da prússia em linha.

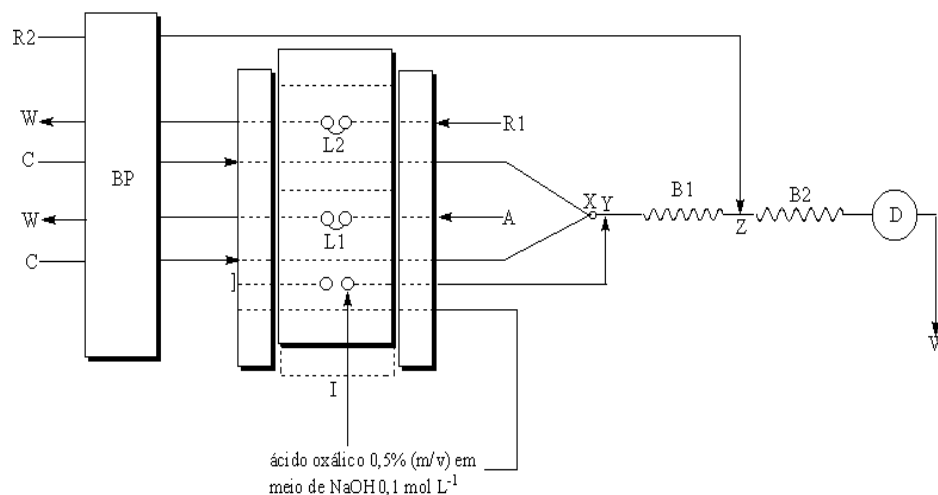


FIGURA 3.3. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes para determinação espectrofotométrica de N-acetilcisteína e captopril. As representações são BP, bomba peristáltica; I, injetor comutador; A, amostra ou solução de referência; R1, reagente $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de HNO_3 $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$); R2 reagente hexacianoferrato de potássio ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $0,6 \text{ mL min}^{-1}$); L1, alça de amostragem ($450 \mu\text{L}$); L2, alça de reagente ($450 \mu\text{L}$); C, solução transportadora (água desionizada; $3,4 \text{ mL min}^{-1}$); B1, bobina helicoidal (50 cm); B2, bobina helicoidal 90 cm ; X e Z, pontos de confluência; Y, entrada do fluxo intermitente de ácido oxálico ($0,5\% \text{ m/v}$) em meio alcalino (NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) a vazão de $6,0 \text{ mL min}^{-1}$; D, espectrofotômetro em 700 nm e W, descarte.

Nesse sistema, a solução de amostra (N-acetilcisteína ou captopril) na alça L1 ($450 \mu\text{L}$) e o reagente R ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) de concentração $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ na alça L2 ($450 \mu\text{L}$) são injetados simultaneamente na solução transportadora C (água desionizada; $3,4 \text{ mL min}^{-1}$). As zonas de amostra e reagente percorrem distâncias iguais até se encontrarem no ponto de confluência X, onde ocorre a redução do ferro(III) para ferro(II) na bobina helicoidal B1 (50 cm) pela ação do analito. No ponto Z, a zona de amostra dispersa recebe uma solução de hexacianoferrato de potássio ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $0,7 \text{ mL min}^{-1}$), promovendo a formação de um complexo azul (Azul da Prússia) entre o Fe(II) gerado e o hexacianoferrato de potássio na bobina helicoidal de 90 cm . Este complexo foi monitorado espectrofotometricamente em 700 nm .

Quando o injetor comutador está na posição de amostragem (como mostrado na Figura 3.3), um fluxo de ácido oxálico ($0,5\% \text{ m/v}$) em meio alcalino (NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) a vazão de $6,0 \text{ mL min}^{-1}$ entra no ponto de confluência Y, efetuando a limpeza das bobinas helicoidais B1 e B2 e da cela de fluxo de caminho óptico de $1,0 \text{ cm}$.

3.4.4. Método Comparativo

Os procedimentos comparativos empregados para a determinação de N-acetilcisteína e captopril em formulações farmacêuticas foram aqueles descritos nos itens 3.2.6 e 3.3.6, respectivamente.

3.5. Determinação Turbidimétrica de Cloridrato de Fluoxetina em um Sistema FIA com Zonas Coalescentes Empregando Nitrato de Prata como Reagente Precipitante

3.5.1. Reagentes e Soluções

Nitrato de Prata (Reagen), Triton X-100 (Vetec), ácido nítrico (Mallinckrodt), cloridrato de fluoxetina (gentilmente cedida pela Lily), foram reagentes grau analítico. A água utilizada foi purificada por destilação e pelo sistema Milli-Q da Milli-Pore.

A solução estoque de cloridrato de fluoxetina $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada momentos antes de seu emprego dissolvendo-se uma massa de 87 mg de cloridrato de fluoxetina em um balão volumétrico de 50 mL com solução Triton X-100 0,03 % (v/v), e o volume foi completado com a mesma solução. As soluções de referência foram preparadas por diluições apropriadas da solução estoque em balões volumétricos de 25,0 mL, completando-se os balões com solução Triton X-100 0,03% (v/v) em meio de ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de nitrato de prata $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se uma massa 17,0 mg de nitrato de prata em uma balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque de Triton X-100 0,03% (v/v) foi preparada diluindo-se uma alíquota da solução concentrada de Triton X-100 em um balão volumétrico de 2000 mL e o volume completado com ácido nítrico de modo a se obter uma concentração final desse ácido de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

3.5.2. Preparação e Análise das Amostras Farmacêuticas

Foram realizadas determinações de cloridrato de fluoxetina em cinco produtos comerciais disponíveis no mercado nacional, sendo três amostras na forma de cápsulas e duas líquidas.

Na preparação das amostras líquidas, 1,0 mL de cada amostra contendo cloridrato de fluoxetina foi precisamente transferida para balões volumétricos de 50,0 mL, completou-se os volumes com solução de Triton X-100 0,03% (v/v) em meio de ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Em seguida, para a adequação da concentração da amostra à curva analítica transferiu-se 5,0 mL dessas soluções para balões volumétricos de 25,0 mL, completando-se o volume com solução Triton X-100 0,03% (v/v) em meio de ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

Para a preparação das amostras sólidas, cinco comprimidos de cada amostra foram pesados em balança analítica e pulverizados em almofariz. Uma quantidade adequada do comprimido foi dissolvida em balão volumétrico de 100 mL com solução de Triton X-100 0,03% (v/v) em meio de ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Os excipientes insolúveis contidos nas amostras foram removidos por filtração simples em papel de filtro Whatman nº 1. Uma alíquota adequada do filtrado foi transferida para balões volumétricos de 50,0 mL, completando-se o volume com solução de Triton X-100 0,03% (v/v) em meio de ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

3.5.3. Procedimento Experimental

O diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes empregado para determinação turbidimétrica de cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas é mostrado na Figura 3.4.

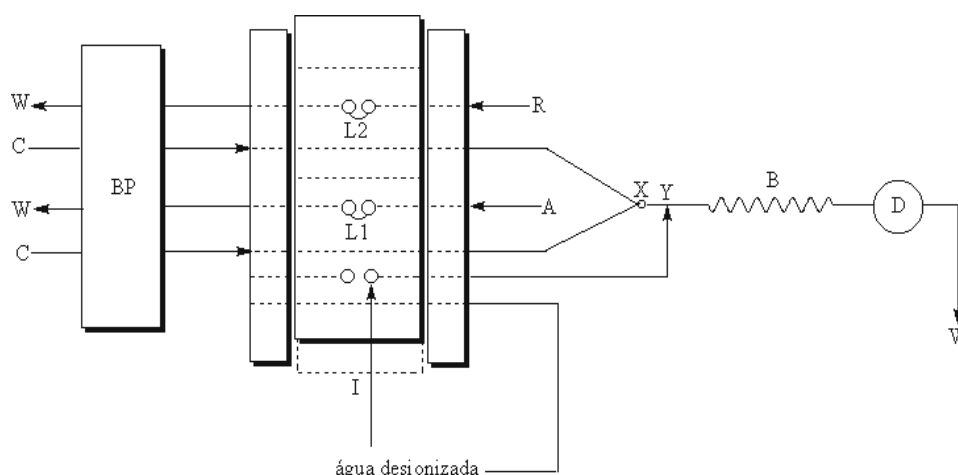


FIGURA 3.4. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes e fluxo intermitente para determinação turbidimétrica de cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas. As representações são BP, bomba peristáltica; I, injetor comutador; A, amostra ou solução de referência; R, reagente AgNO_3 ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$); L1, alça de amostragem ($350 \mu\text{L}$); L2, alça de reagente ($350 \mu\text{L}$); C, solução transportadora (ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de Triton X-100 0,03%; $2,4 \text{ mL min}^{-1}$); B, bobina helicoidal (100 cm); X, ponto de confluência; Y, entrada do fluxo intermitente de água desionizada a vazão de $6,0 \text{ mL min}^{-1}$; D, espectrofotômetro em 420 nm e W, descarte.

Nesse procedimento, as soluções de referências/amostras de cloridrato de fluoxetina e do reagente AgNO_3 ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foram introduzidas simultaneamente com o auxílio do injetor-comutador na solução transportadora (ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de Triton X-100 0,03%; $2,4 \text{ mL min}^{-1}$) através de alças de $350 \mu\text{L}$. Os volumes injetados da amostra e do reagente percorreram distâncias iguais até se confluírem no ponto X, onde ocorreu a formação da suspensão de $\text{AgCl}_{(s)}$ (reação do cloreto do cloridrato de fluoxetina com Ag(I)), sendo a seguir monitorada turbidimetricamente em 420 nm. O sinal transiente obtido foi proporcional à concentração de cloridrato de fluoxetina injetado no sistema.

Quando o injetor comutador está na posição de amostragem (como mostrado na Figura 3.4), um fluxo de água desionizada a vazão de $6,0 \text{ mL min}^{-1}$, entra no ponto de confluência Y, efetuando a limpeza da bobina helicoidal B e da cela de fluxo de caminho óptico de 1,0 cm.

3.5.4. Método Comparativo

Como procedimento comparativo para validar o procedimento proposto empregou-se o método cromatográfico (HPLC) recomendado pela Farmacopéia

Americana⁸⁸. Esse procedimento preconiza o emprego de uma fase móvel constituída de tampão trietilamina (pH 6,0): tetrahydrofurano:metanol na proporção de 6:3:1, coluna C8 (250 mm × 4,6 mm), fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e detecção no ultravioleta a 227 nm.

3.6. Determinação de Dipirona em Formulações Farmacêuticas Empregando: Um Sistema de Análise em Fluxo Utilizando um Microssistema Analítico Construído com LTCC e um Sistema FIA com Zonas Coalescentes

3.6.1. Reagentes e Soluções

Nitrato de ferro (III) nonahidratado (Vetec), ácido nítrico (Mallinckrodt), ácido clorídrico (Mallinckrodt), amido (Merck), iodato de sódio (Merck), iodeto de potássio (Merck) e dipirona (Boheringer Ingelheim), foram reagentes grau analítico. A água utilizada foi purificada por destilação e pelo sistema Milli-Q da Milli-Pore.

A solução estoque de dipirona 5,0 mmol L⁻¹ foi preparada diariamente dissolvendo-se uma massa de 176 mg de dipirona em um balão volumétrico de 100 mL com água desionizada. Soluções de referência foram preparadas por diluições apropriadas da solução estoque em balões volumétricos de 25,0 mL. Uma alíquota de ácido nítrico 0,5 mol L⁻¹ foi adicionada para obtenção de uma concentração final de ácido nítrico de 1,0 × 10⁻² mol L⁻¹.

A solução estoque de nitrato de ferro (III) nonahidratado 3,0 × 10⁻² mol L⁻¹ (padronizada como descrito no item 3.3.1) foi preparada diariamente antes das análises, dissolvendo-se uma massa de 1,0 g do sal com uma solução de HNO₃ 1,0 × 10⁻² mol L⁻¹ e o volume completado com a mesma solução em um balão volumétrico de 250 mL. O ácido nítrico foi adicionado no balão volumétrico contendo nitrato de ferro (III) para evitar a hidrólise do Fe(III).

3.6.2. Preparo e Análise das Amostras

Seis amostras contendo dipirona foram adquiridas no comércio e analisadas pelo método proposto.

Para a análise dos comprimidos, dez comprimidos de cada amostra foram macerados em um almofariz até a obtenção de um pó fino. Massas exatamente determinadas do pó foram pesadas em uma balança analítica e transferidas para béqueres de 100 mL e dissolvidas com alíquotas de aproximadamente 50,0 mL de HNO_3 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Excipientes insolúveis contidos na amostra foram removidos por filtração simples e o filtrado transferido para balões volumétricos de 100 mL, sendo seus volumes completados com HNO_3 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo-se uma concentração aproximada de dipirona de $1,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Diluições posteriores foram realizadas para obtenção de uma concentração teórica de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de dipirona.

Para a preparação das amostras líquidas, alíquotas de 1,0 mL de cada amostra foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL com o auxílio de uma micropipeta e os balões foram completados com HNO_3 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Diluições posteriores foram realizadas até a obtenção de uma concentração final teórica de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de dipirona.

Para a determinação de dipirona utilizando o microsistema construído com LTCC, as amostras líquidas e sólidas foram preparadas como descrito acima, porém as diluições posteriores à solubilização das amostras foram realizadas para uma concentração teórica de dipirona $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.6.3. Diagrama Esquemático para a Determinação de Dipirona em Formulações Farmacêuticas Empregando Ferro (III) como Reagente Utilizando um Sistema FIA com Zonas Coalescentes

A Figura 3.5, mostra o diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes empregado para determinação de dipirona em formulações farmacêuticas utilizando ferro(III) como reagente cromogênico.

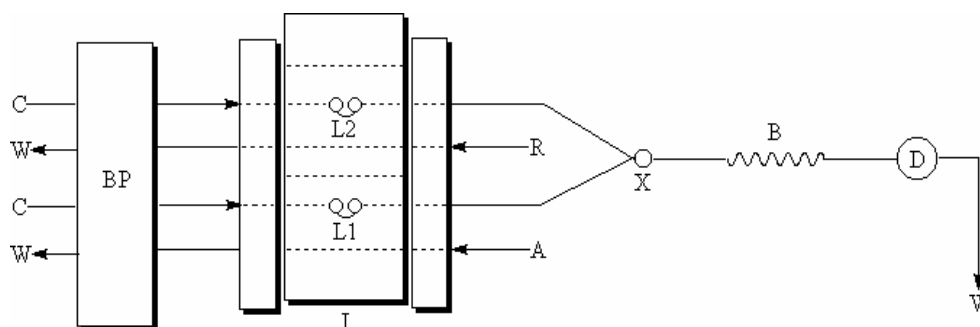


FIGURA 3.5. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes para determinação espectrofotométrica de dipirona em formulações farmacêuticas. As representações são BP, bomba peristáltica; I, injetor comutador; A, solução da amostra ou de referência; R, reagente $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$); L1, alça de amostragem ($300 \mu\text{L}$); L2, alça de reagente ($300 \mu\text{L}$); C, solução transportadora (ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $4,0 \text{ mL min}^{-1}$); B, bobina helicoidal (50 cm); X, ponto de confluência; D, espectrofotômetro em 622 nm e W, descarte.

Nesse sistema, as amostras ou solução de referência L1 ($300 \mu\text{L}$) e o reagente R ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) na alça L2 ($300 \mu\text{L}$) são injetados simultaneamente com o auxílio de um injetor comutador na solução transportadora C (ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $4,0 \text{ mL min}^{-1}$). As zonas de amostra e do reagente percorrem distâncias iguais até se confluírem no ponto de confluência X, ocorrendo a partir desse ponto a formação de um cromóforo azul entre o Fe (III) e a dipirona na bobina helicoidal B de 50 cm , sendo o cromóforo gerado monitorado em 622 nm . O aumento da absorbância causada pela formação do cromóforo formado entre o Fe(III) e a dipirona foi proporcional a concentração de dipirona na solução injetada.

3.6.4. Construção do Microssistema Analítico Construído com LTCC¹⁸⁻²⁴

Inicialmente é importante destacar algumas características das LTCC ou cerâmicas verdes, assim chamadas porque são utilizadas em estado não sinterizado, denominado “em verde”. Nessa fase, são maleáveis ao ponto de se poder cortá-las com tesoura ou simplesmente com as mãos. A principal vantagem da tecnologia LTCC é a possibilidade de construção de estruturas tridimensionais de grande complexidade mediante o uso de diferentes camadas que, uma vez sobrepostas na ordem correta, dão lugar a uma geometria desejada.

Para a construção dos microssistema analíticos utilizando LTCC são necessárias algumas etapas básicas:

- desenho do microsistema analítico
- corte das cerâmicas
- laminação das cerâmicas
- sinterização das cerâmicas

3.6.4.1. Desenho do Microsistema Analítico

Uma vez decidido o sistema de gestão de fluidos que o microsistema analítico terá, é necessário desenhá-lo em diferentes camadas utilizando um programa de desenho. Para a construção do microsistema analítico utilizado nesse trabalho optou-se pelo software AUTOCAD. Para o desenho do microsistema utilizando LTCC é necessário que esse seja construído por sobreposição de camadas e que cada uma delas tenha um desenho particular que ao serem sobrepostas sigam uma ordem adequada a fim de se obter o microsistema analítico na forma final desejada.

3.6.4.2. Corte das Cerâmicas

O corte das cerâmicas foi realizado através de um equipamento a laser (Protolaser®, Figura 3.6). As cerâmicas utilizadas para a construção do microsistema analítico foi a Dupont 951AX² que possui as seguintes características:

- espessura de $254 \pm 13 \mu\text{m}$
- encolhimento no eixo X-Y: $12,7 \pm 0,3\%$
- encolhimento no eixo Z: $15 \pm 0,5\%$
- rugosidade superficial: $< 0,34 \mu\text{m}$

As cerâmicas verdes são compostas de 45% de alumina (Al_2O_3), 40% de vidro e 15% de compostos orgânicos.



FIGURA 3.6. Equipamento a laser utilizado para o corte das cerâmicas verdes.

Após o corte individual de cada cerâmica com o equipamento a laser, foi necessário sobrepor às cerâmicas umas sobre as outras para formar um “sandwich”, para se obter a estrutura tridimensional desenhada na primeira etapa. Uma vez sobrepostas de forma alinhada, as cerâmicas foram levadas para a laminação.

3.6.4.3 Laminação das Cerâmicas

A laminação é o processo mais importante para a construção do microsistema analítico. A adequada realização dessa etapa evita que se produzam deformações nas estruturas internas que podem provocar perdas de líquido, rupturas, etc. Permite, além disso, que as camadas de cerâmicas fiquem perfeitamente alinhadas e gerem um bloco sólido no término do processo de laminação.

A laminação do microsistema analítico foi feita com uma prensa hidráulica (Figura 3.7) (Talleres Francisco Camps, S.A., Granollers, Espanha) com dois pratos de aquecimento de aço de 250 × 150 mm, acoplado a esses um termopar para controlar a temperatura, esse equipamento pode realizar um esforço máximo de 420 kg/cm². A técnica empregada para a laminação foi a termocompressão (técnica na qual se aplica uma pressão mantendo-se a

temperatura constante) a 100° C durante 1 minuto, pois tempos maiores a esse podem levar à deformação do microsistema analítico.



FIGURA 3.7. Prensa hidráulica para a laminação das cerâmicas.

3.6.4.4. Sinterização das Cerâmicas

Antes do processo de sinterização, que é a última etapa para a construção do microsistema analítico, é necessário eliminar o excesso de material cerâmico que fica nas cerâmicas cortadas após a etapa de laminação. Isso pode ser feito através de uma lixa comum ou com uma fresadora. Utilizando a fresadora, o microsistema analítico apresenta-se visualmente melhor, devido à melhor precisão no corte.

Para a sinterização foi utilizado um forno com atmosfera de ar CARBOLITE CBCWF11/23P16 que pode chegar à temperatura de 1100°C.

3.6.4.5. Desenhos das Camadas para a Construção do Microsistema Analítico Construído com LTCC para a Determinação de Dipirona Empregando Ferro(III) como Reagente Cromogênico

A Figura 3.8 mostra cada uma das camadas para a construção do microsistema analítico utilizado nesse trabalho, sendo a camada A a superior e a E a inferior.

O número de camadas que podem fazer parte de um microsistema analítico utilizando LTCC é variável, geralmente se utilizam entre 6 e 12 camadas, sendo que mais de 12 não é aconselhável, pois na etapa de laminação as estruturas internas podem ser danificadas.

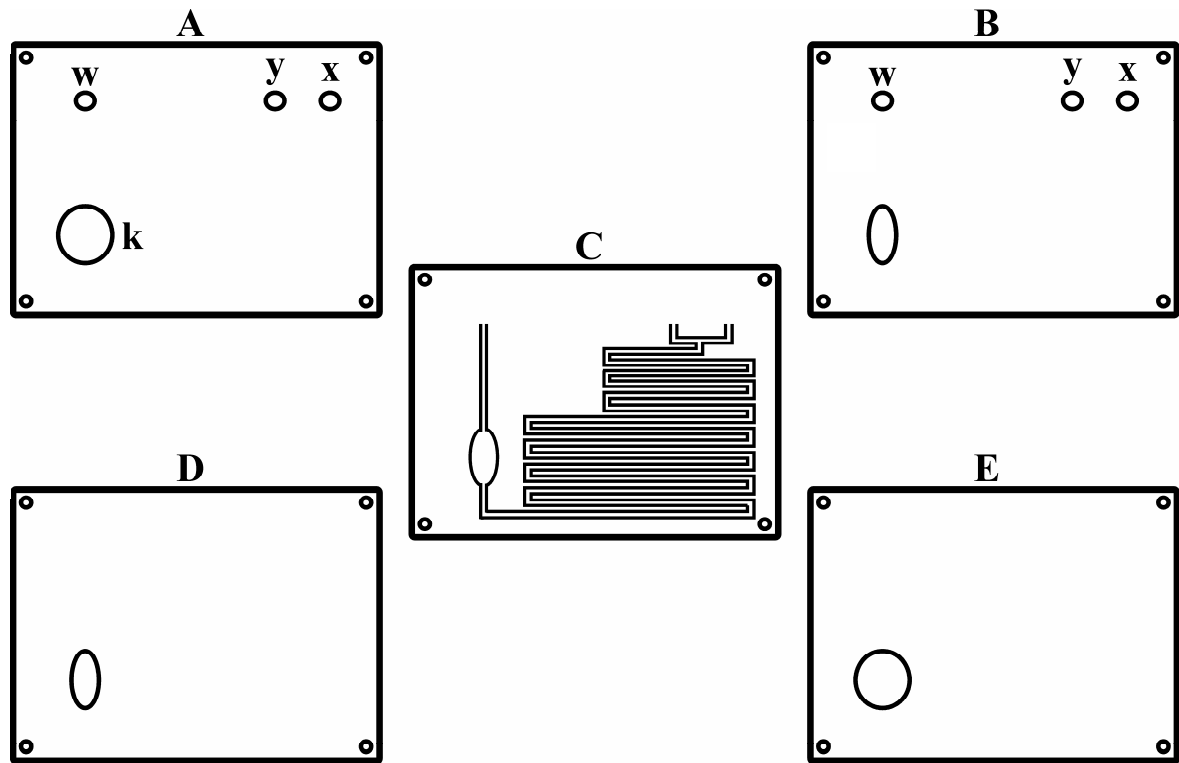


FIGURA 3.8. Desenho das camadas utilizadas para a construção do microsistema analítico utilizando LTCC.

Para a construção do microsistema analítico empregado nesse trabalho, foi utilizada uma cerâmica verde para as camadas A, B, D e E e três cerâmicas verdes para a camada C.

A camada A do desenho delimita as entradas (x e y) e a saída (w) dos líquidos, enquanto que (k) é a cavidade esférica para a colocação de um vidro de forma esférica de 1,0 cm de diâmetro que também foi colocado na camada (E) para formar um caminho óptico de 0,6 mm. Nas cavidades x, y e w da camada A foram colocados conectores de latão (fixados com resina epóxi) para entrada e saída das soluções.

As cavidades x, y e w da camada A têm diâmetros maiores que as mesmas cavidades da camada B, pois essas já são ajustadas para a entrada das soluções nos canais da camada C que determina a forma e as medidas dos canais.

O formato de serpentina da camada C foi escolhido por apresentar uma melhor mistura entre o reagente e o analito e o formato côncavo nas camadas B, C e D foi escolhido, pois o volume morto e eventuais bolhas que poderiam se formar no microsistema analítico poderiam ser eliminadas mais facilmente.

As cavidades localizadas nas pontas de cada camada são utilizadas como ponto de alinhamento para que as camadas fiquem perfeitamente sobrepostas uma sobre as outras na etapa de laminação.

A Figura 3.9, mostra o esquema para a conexão do sistema de entrada e saída de fluido no microsistema analítico, onde x é um tubo de polietileno por onde entram e saem às soluções, y é o tubo de silicone que ajuda a fixar o tubo de polietileno e z o conector metálico de latão no qual se coloca resina epóxi para fixá-lo sobre a cerâmica.

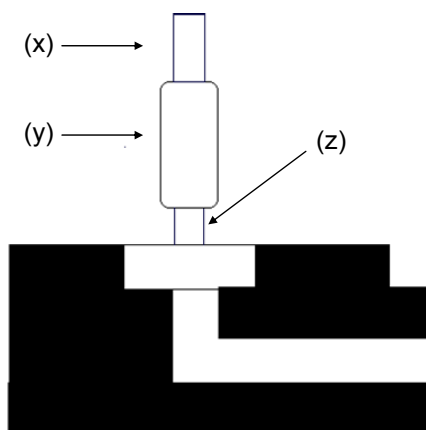


FIGURA 3.9. Esquema para a conexão da entrada e saída de fluidos no microsistema analítico.

A Figura 3.10 mostra o microsistema analítico já sinterizado, ainda sem os vidros e os conectores de latão. Pode-se verificar as cavidades para o encaixe dos conectores, a cavidade para a colocação do vidro e as cavidades côncavas que foram desenhadas nas camadas B, C e D.



FIGURA 3.10. Microsistema analítico sinterizado sem os conectores e os vidros.

O microsistema analítico na sua forma final com os conectores de latão e com os vidros (ambos fixados com resina epóxi) é representado na Figura 3.11. Através desta figura, pode-se ter uma noção da pequena dimensão do microsistema analítico.

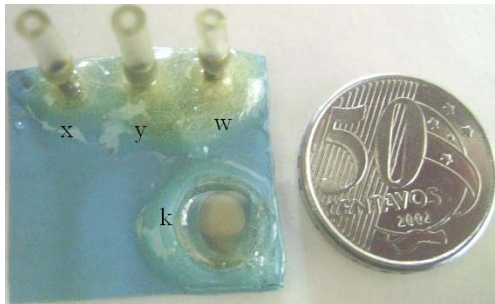


FIGURA 3.11. Microsistema analítico construído com LTCC ao lado de uma moeda de 50 centavos de real para mostrar a dimensão reduzida do microsistema. As letras x e y indicam as entradas das soluções no microsistema; w, saída da solução do microsistema (descarte) e k, caminho óptico do microsistema.

A Figura 3.12 ilustra o suporte de acrílico utilizado para o alinhamento da fibra óptica, do *LED* vermelho e do LTCC, pois qualquer movimento destes afetaria na resposta do sinal analítico. A peça branca de PVC colocada sobre a fibra óptica, teve a função de manter esta perfeitamente alinhada com o *LED*.

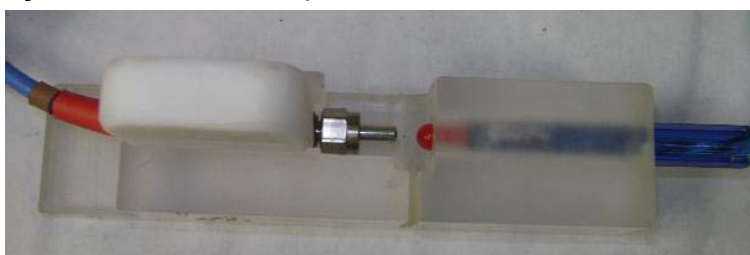


FIGURA 3.12. Suporte de acrílico construído que foi utilizado para fixar a fibra óptica (esquerda da foto) e o *LED* (a direita da foto).

A Figura 3.13 mostra o microsistema colocado entre a fibra óptica e o *LED* vermelho, sendo esses apontados em direção ao caminho óptico do microsistema. Foi fixado em 0,5 mm a distância da fibra óptica e do *LED* ao caminho óptico do microsistema.

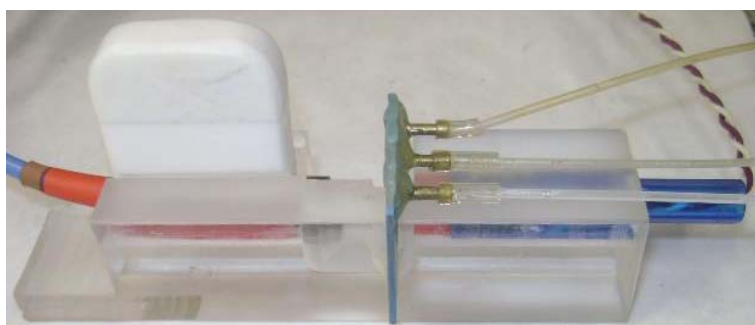


FIGURA 3.13. Microsistema analítico entre a fibra óptica e o *LED*.

3.7. Diagrama Esquemático para a Determinação de Dipirona em Formulações Farmacêuticas Empregando um Microsistema Analítico Construído com LTCC

A Figura 3.14 mostra o diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação espectrofotométrica de dipirona utilizando um microsistema analítico construído com LTCC.

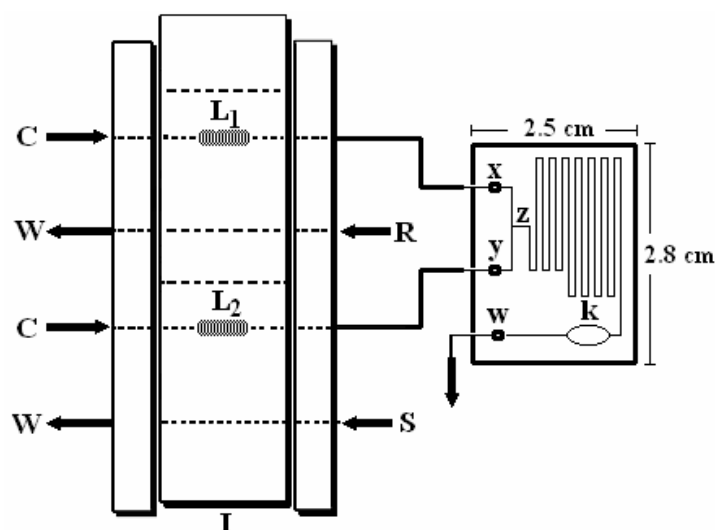


FIGURA 3.14. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação espectrofotométrica de dipirona utilizando um microsistema analítico construído com LTCC. As representações são I, injetor comutador; A, amostra ou solução de referência; R, reagente $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$); L_1 , alça de amostragem ($200 \mu\text{L}$); L_2 , alça de reagente ($200 \mu\text{L}$); C, solução transportadora (ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $11,4 \text{ mL min}^{-1}$); x e y, entradas no microsistema analítico das soluções de dipirona e de ferro(III), respectivamente; z ponto de confluência do analito e do ferro(III); k caminho óptico de $0,6 \text{ mm}$ para onde esta direcionada a fibra óptica e o *LED* vermelho, ambos a uma distância de $0,5 \text{ mm}$ do microsistema analítico e W, saída do microsistema analítico (descarte).

Nesse sistema, as amostras ou solução de referência de dipirona L_1 ($200 \mu\text{L}$) e o reagente R ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) na alça L_2 ($200 \mu\text{L}$) são injetados simultaneamente com o auxílio de um injetor comutador na solução transportadora C (ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $11,4 \text{ mL min}^{-1}$). As zonas de amostra e do reagente percorrem distâncias iguais até se confluírem no microsistema analítico, onde o analito entra pela entrada x e o reagente pela entrada y, confluindo no ponto z, ocorrendo a partir desse ponto a formação de um cromóforo azul entre o ferro (III) e a dipirona no caminho na forma de serpentina de diâmetro interno de $0,4 \text{ mm}$. O cromóforo azul gerado foi monitorado, utilizando um cabo de fibra óptica para o transporte da radiação proveniente de um *LED* vermelho

($\lambda=622$ nm) do microssistema analítico até o espectrofotômetro. O aumento da absorvância causada pela formação do cromóforo formado entre o Fe(III) e a dipirona foi proporcional a concentração de dipirona na solução injetada.

3.8. Método Comparativo

A Farmacopéia Brasileira¹⁰⁸ preconiza a iodimetria para a determinação quantitativa de dipirona sódica. O método consiste em solubilizar a amostra com água desionizada, acidificá-la com HCl $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e titular como uma solução padronizada de iodo $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ utilizando como indicador uma solução de amido 1% (m/v) adicionada próximo ao ponto final. A titulação iodimétrica de dipirona esta baseada na oxidação do grupo metanossulfônico a sulfato em meio ácido.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todos os estudos realizados nessa tese foi utilizado o método univariado, sempre buscando a melhor relação entre a magnitude dos sinais analíticos, repetibilidade, estabilidade da linha base e a frequência de amostragem.

4.1. Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína Utilizando um Reator de $Zn_3(PO_4)_2$ Imobilizado em Resina Poliéster Acoplado ao Sistema FIA

Devido às diferentes possibilidades de coordenação com íons metálicos, complexos de N-acetilcisteína com diferentes cátions metálicos já foram descritos na literatura, como: Pd(II)³⁹, Cd(II)¹⁵⁴ e Cu(II)¹⁵⁵. CHEN¹⁵⁶, ADACHI¹⁵⁷ & BRUMAS¹⁵⁸ citam a formação de um complexo entre N-acetilcisteína e o Zn(II) com finalidade terapêutica. Os íons Zn(II) podem ser detectados espectrofotometricamente com o reagente vermelho de alizarina S (VAS) em meio de tampão borato devido a razão da formação de um complexo ternário estável cuja razão estequiométrica é 1:3:3 Zn(VA-BO₃)₃.

Embora existam diversos trabalhos para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas, não há nenhum procedimento analítico relatado na literatura para a determinação desse analito empregando o reagente imobilizado em reator em fase sólida. Deste modo, propõe-se neste trabalho a utilização de um reator em fase sólida contendo $Zn_3(PO_4)_2$ para a determinação de N-acetilcisteína em produtos farmacêuticos. O método baseia-se na complexação dos íons Zn(II) pela N-acetilcisteína no reator em fase sólida, com consequente remoção do complexo Zn(II)-N-acetilcisteína do reator, esse complexo reage com o reagente VAS, em tampão borato pH 9,0, para formar o complexo Zn(VA-BO₃)₃ cuja absorbância foi monitorada em 540 nm.

4.1.1. Estudo dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA

Um requisito importante para o tempo de vida do reator em fase sólida é a baixa solubilidade do reagente imobilizado no reator na solução que

constantemente flui pelo mesmo. Desta forma, diversas soluções como borato de sódio $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pHs 8,0 e 9,0) e água desionizada foram avaliadas quanto a repetibilidade e a magnitude do sinal analítico. Os melhores resultados em termos de magnitude e repetibilidade dos sinais analíticos foram obtidos utilizando-se borato de sódio $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ como solução transportadora. Ademais, empregando borato de sódio $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ obteve-se uma boa estabilidade da linha base. Dessa maneira, selecionou-se o borato de sódio $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ como solução transportadora.

Após a otimização da melhor solução transportadora, estudou-se o efeito de sua concentração sobre a magnitude do sinal analítico na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser observado pela Figura 4.1, a magnitude do sinal analítico aumentou até uma concentração de borato de sódio $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Para a concentração superior a absorvância permaneceu praticamente constante. Sendo assim, selecionou-se a concentração de borato de sódio $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para os demais experimentos.

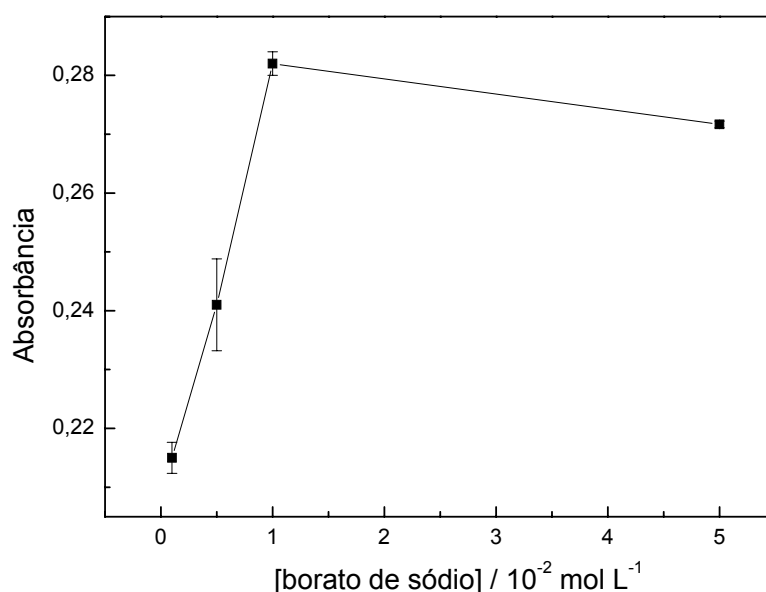


FIGURA 4.1. Estudo da concentração da solução transportadora borato de sódio sobre o sinal analítico ($n=3$). Concentração de N-acetilcisteína $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do reagente VAS $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem de $150 \mu\text{L}$, bobina helicoidal de 70 cm , RFS ($5,0 \text{ cm} \times 2,0 \text{ mm d.i.}$; tamanho de partícula $100\text{-}350 \mu\text{m}$ contendo $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ imobilizado em resina poliéster na proporção 1:2) e vazões do reagente VAS e do carregador de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$.

Objetivando sempre uma maior sensibilidade do procedimento analítico, foram estudadas algumas soluções para o preparo da solução de VAS, a saber: borato de sódio $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão borato nos valores de pH iguais a

8,0; 9,0 e 10. O tampão borato pH 9,0 apresentou uma maior magnitude dos sinais analíticos quando combinado com a solução transportadora de borato de sódio $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Deste modo, tampão borato pH 9,0 foi selecionado para a preparação da solução de VAS.

O efeito da concentração do reagente VAS sobre o sinal analítico foi avaliado na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 4.2 mostra que a absorvância aumentou com o aumento da concentração de VAS até a maior concentração $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Houve um aumento da magnitude do sinal analítico devido a maior disponibilidade de VAS para a formação do complexo $\text{Zn}(\text{VA-BO}_3)_3$. Como o aumento da magnitude do sinal analítico para a concentração de $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi de apenas 5% maior em relação à concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de VAS foi selecionada para a continuidade do trabalho.

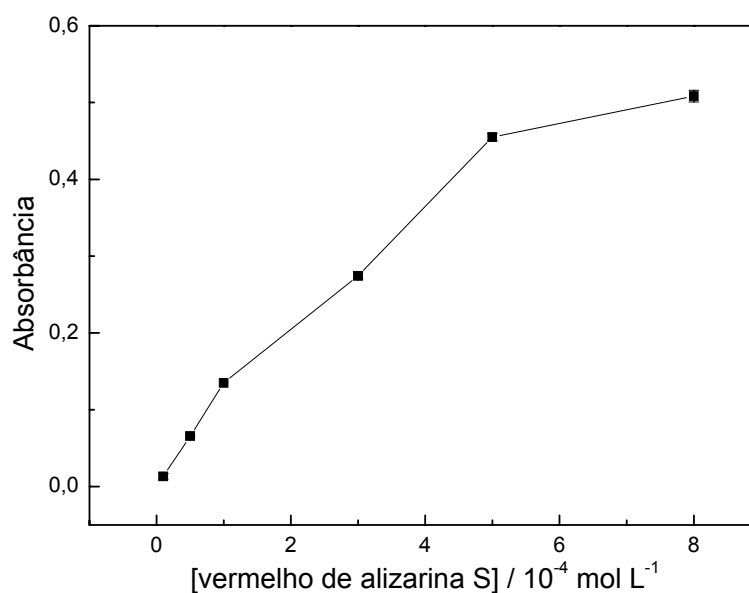


FIGURA 4.2. Estudo da concentração do reagente VAS sobre o sinal analítico ($n=3$). Concentração de N-acetilcisteína $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e concentração do transportador borato de sódio $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Demais condições experimentais ver Figura 4.1.

4.1.2. Efeito dos Parâmetros do Reator em Fase Sólida (RFS)

Os principais fatores que influenciam na formação do complexo $\text{Zn}(\text{II})$ -N-acetilcisteína no reator em fase sólida foram avaliados, a saber: proporção em massa do sal imobilizado/resina poliéster, tamanho das partículas e comprimento do reator.

Quatro diferentes composições m/m entre $Zn_3(PO_4)_2$ e a resina poliéster (1:1, 1:2, 1:3 e 1:4 m/m) foram investigadas para verificar o efeito dessas composições sobre o sinal analítico. Foi observado um maior sinal analítico com a quantidade de fosfato de zinco incorporado na resina na proporção de 1:2, como mostrado na Figura 4.3. Essa proporção é a quantidade máxima de $Zn_3(PO_4)_2$ que pode ser agregada a resina poliéster, uma vez que quantidades maiores (1:1) do sal impossibilitam a homogeneização da mistura. Como a composição 1:2 ($Zn_3(PO_4)_2$ /resina poliéster) resultou na quantidade máxima tolerada de $Zn_3(PO_4)_2$ que pode ser agregada a resina poliéster, essa foi selecionada por apresentar uma maior magnitude dos sinais analíticos e também garantir um maior tempo de vida para o RFS.

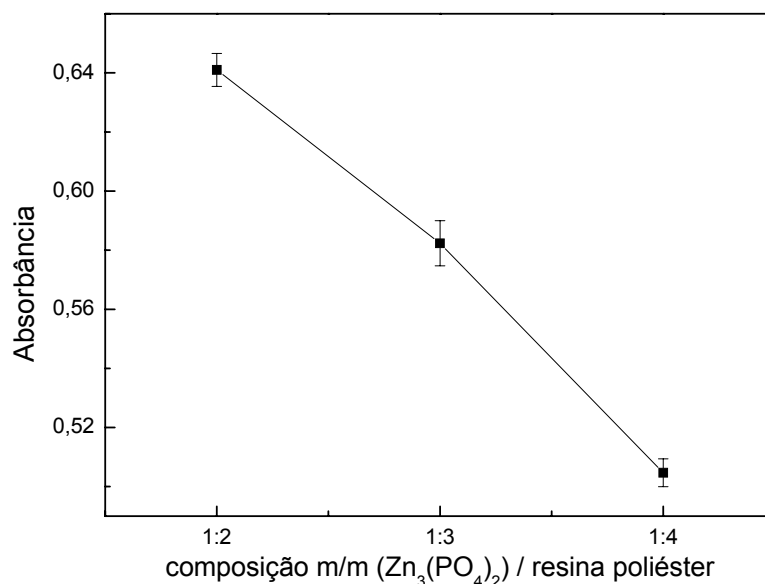


FIGURA 4.3. Estudo da composição m/m de $Zn_3(PO_4)_2$ e resina poliéster (1:2, 1:3 e 1:4) sobre o sinal analítico para uma concentração de N-acetilcisteína $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do transportador borato de sódio $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e concentração do reagente VAS $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Demais condições experimentais ver Figura 4.1.

A granulometria das partículas introduzidas no reator em fase sólida é um importante fator para um melhor desempenho e eficiência do reator, pois se são introduzidas partículas muito grandes ($> 500 \mu\text{m}$) a magnitude dos sinais analíticos é afetada devido à pequena superfície de contato entre a zona de amostra e o reagente imobilizado. Por outro lado, se as partículas são muito pequenas ($< 100 \mu\text{m}$) geram uma grande pressão hidrodinâmica no sistema em fluxo. Posto isso, duas faixas de tamanhos de partículas foram investigadas neste trabalho (100-350 μm e 350-500 μm). A faixa de 100-350 μm apresentou uma maior magnitude do sinal analítico, provavelmente devido à maior superfície de contato

das partículas contendo o reagente imobilizado com a zona de amostra injetada. Ademais, não houve dificuldades operacionais para a preparação dos reatores ou problemas de pressão hidrodinâmica com esse tamanho de partícula.

A Figura 4.4 apresenta a influência do comprimento do reator na magnitude do sinal analítico. O comprimento do reator foi avaliado na faixa de 3 a 9 cm (mantendo fixo o diâmetro interno do RFS em 2,0 mm), estando a solução transportadora a uma vazão de 1,2 mL min⁻¹. O sinal analítico aumentou gradualmente do reator de 3 cm até o de 7 cm, mantendo-se constante para o reator de 9 cm. O sinal analítico do reator de 3 cm foi bem menor que aquele obtido com o reator de 5 cm, devido provavelmente ao curto tempo de residência da zona de amostra dentro do reator o que permitiu a produção de uma pequena quantidade do complexo Zn(II)-N-acetilcisteína. Comprimentos superiores a 9 cm ocasionaram um aumento acentuado da pressão hidrodinâmica do sistema levando ao rompimento do RFS do sistema em fluxo. Devido a esses fatores, foi selecionado o RFS de 7 cm para o desenvolvimento do trabalho, pois foi possível obter boa estabilidade da linha base, boa repetibilidade dos sinais transientes e alta frequência de amostragem empregando esse reator.

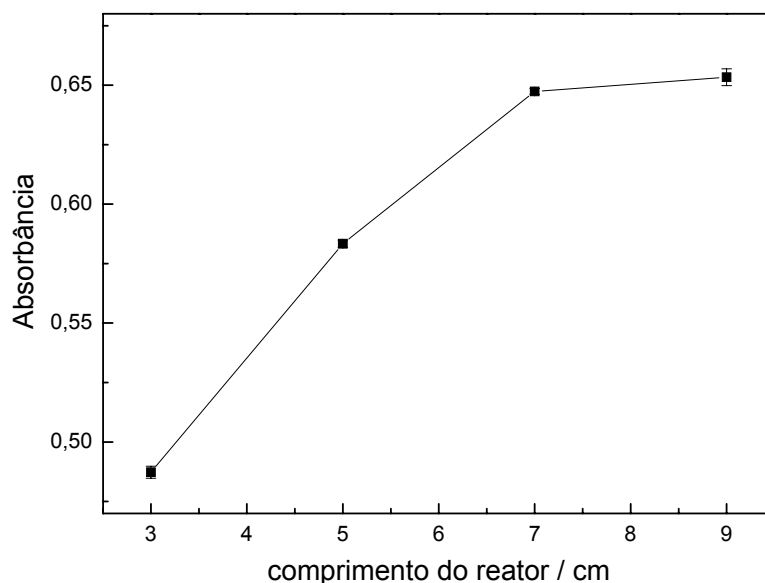


FIGURA 4.4. Estudo do comprimento do RFS sobre o sinal analítico para uma concentração de N-acetilcisteína $1,8 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, concentração do transportador borato de sódio $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, concentração do reagente VAS $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, composição m/m de Zn₃(PO₄)₂ e resina poliéster (1:2). Demais condições ver Figura 4.1.

4.1.3. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA

Foram estudados os parâmetros físicos do sistema FIA para investigar as melhores condições para a formação do complexo $Zn(VA-BO_3)_3$.

O volume da alça de amostragem foi avaliado variando-se o comprimento da alça entre 100 e 500 μL . Como pode ser verificado pela Figura 4.5, a magnitude do sinal analítico aumentou acentuadamente entre 300 e 400 μL , permanecendo praticamente constante em volumes superiores. Esses resultados indicam que se trata da quantidade máxima de N-acetilcisteína necessária para a formação do complexo. Sendo assim, selecionou-se um volume de 400 μL de amostra para o restante do trabalho por apresentar uma boa repetibilidade dos sinais analíticos e uma melhor frequência de amostragem em relação ao volume de 500 μL .

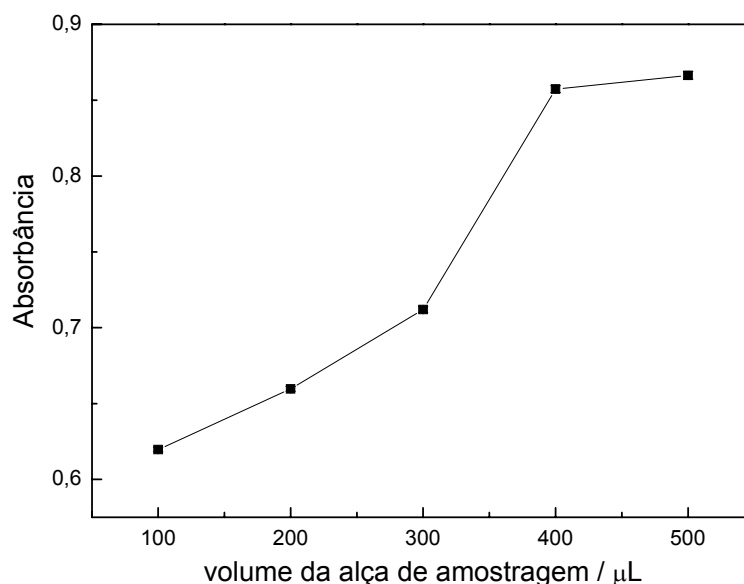


FIGURA 4.5. Estudo do volume da alça de amostragem sobre o sinal analítico para uma concentração de N-acetilcisteína $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do transportador borato de sódio $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do reagente VAS $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, RFS (7,0 cm \times 2,0 mm d.i.; tamanho de partícula 100-350 μm contendo $Zn_3(PO_4)_2$ imobilizado em resina poliéster na proporção 1:2) e vazões do reagente VAS e do carregador de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$.

A influência da bobina helicoidal B (colocada após o ponto de confluência X, Figura 3.1) sobre o sinal analítico foi avaliada no intervalo de 50 a 150 cm. Como mostrado na Figura 4.6, verificou-se um aumento do sinal analítico até o comprimento de 100 cm, e uma diminuição do sinal analítico para comprimentos maiores. Isso se deve ao fato de que para bobinas helicoidais maiores o efeito da dispersão é mais significativo, o que acarreta em uma maior

dispersão da zona de amostra e conseqüentemente a diminuição do sinal analítico. Como a cinética da reação de formação do complexo $Zn(VA-BO_3)_3$ é rápida, a dispersão prevalece e a absorbância diminui. Deste modo, uma bobina helicoidal de 100 cm foi utilizada no restante do trabalho por apresentar maior valor de absorbância.

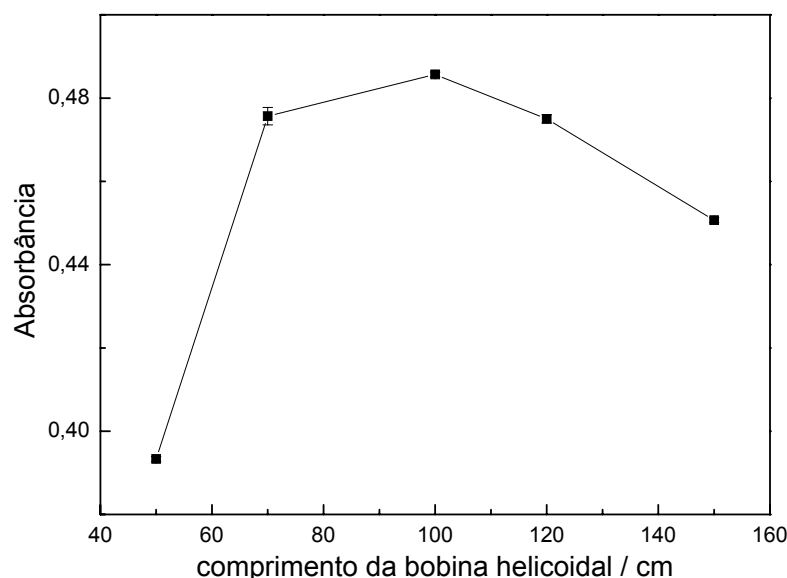


FIGURA 4.6. Estudo do comprimento da bobina helicoidal sobre o sinal analítico para uma concentração de N-acetilcisteína $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do transportador borato de sódio $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do reagente VAS $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, RFS (7,0 cm \times 2,0 mm d.i.; tamanho de partícula 100-350 μm contendo $Zn_3(PO_4)_2$ imobilizado em resina poliéster na proporção 1:2 m/m), volume da alça de amostragem de 400 μL e vazões do reagente VAS e do carregador de 1,2 mL min^{-1} .

O efeito da vazão da solução transportadora (borato de sódio $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi avaliado entre 0,7 e 2,9 mL min^{-1} . Verificou-se a diminuição do sinal analítico a partir da vazão de 1,2 mL min^{-1} , devido provavelmente à dispersão da zona de amostra em vazões maiores. Como o desvio padrão relativo foi maior para os valores de absorbância obtidos para a vazão de 1,2 mL min^{-1} , selecionou-se a vazão de 1,6 mL min^{-1} considerando-se a relação repetibilidade dos sinais analíticos e frequência de amostragem.

A vazão da solução do reagente VAS foi avaliada entre 0,7 e 3,0 mL min^{-1} , mantendo-se a vazão da solução transportadora em 1,6 mL min^{-1} . O sinal analítico diminuiu gradualmente com o aumento da vazão, provavelmente devido à maior dispersão da zona de amostra para vazões maiores. Em consequência disso, uma vazão de 0,7 mL min^{-1} foi escolhida por apresentar maior magnitude dos sinais analíticos e pelo menor consumo de reagente.

Após a otimização de todos os parâmetros físicos e químicos envolvidos para o desenvolvimento do sistema em fluxo, manteve-se o mesmo reator durante as demais etapas de desenvolvimento do sistema para avaliar seu tempo de vida útil. O tempo de vida do reator foi avaliado de modo similar ao proposto por JURKIEWICZ *et al.*¹⁵⁹ observando-se as inclinações das curvas analíticas (sensibilidade do procedimento em fluxo) obtidas periodicamente no intervalo de 10 dias, utilizando-se o mesmo RFS. Durante esse período, foram realizadas cerca de 600 injeções de N-acetilcisteína no intervalo de concentração de $3,0 \times 10^{-5}$ a $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A sensibilidade do procedimento proposto manteve-se por volta de 90 % da resposta inicial após as 600 injeções.

A Tabela 4.1 apresenta os parâmetros avaliados e os selecionados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas.

TABELA 4.1. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de N-acetilcisteína empregando um RFS contendo Zn₃(PO₄)₂ imobilizado em resina poliéster.

Parâmetros	Faixa estudada	Selecionado
[borato de sódio] / 10 ⁻² mol L ⁻¹	0,05 a 5	1
[VAS] / 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	0,1 a 8	5
composição m/m de Zn ₃ (PO ₄) ₂ e resina poliéster no reator	1:2, 1:3 e 1:4	1:2
tamanho das partículas (µm)	100-350 e 350-500	100-350
comprimento do reator (cm)	3 a 9	7
alça de amostragem (µL)	100 a 500	400
bobina helicoidal / cm	30 a 90	70
vazão da solução transportadora / mL min ⁻¹	0,7 a 2,9	1,6
vazão do reagente VAS / mL min ⁻¹	0,7 a 2,9	0,7

VAS = vermelho de alizarina S

4.1.4. Estudo dos Interferentes em Potencial

O efeito de interferentes em potencial na determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas foi avaliado para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais (Tabela 4.2). As substâncias

avaliadas foram: cloreto de benzalcônio, sacarina, bicarbonato de sódio, benzoato de sódio, sacarose, frutose e EDTA. O estudo foi realizado adicionando-se concentrações de cada excipiente em uma solução de referência e o sinal obtido foi comparado com o sinal analítico obtido de uma solução de referência sem adição da substância em estudo. Nesses experimentos, foram utilizadas soluções de referência contendo N-acetilcisteína $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com cada um dos possíveis interferentes em concentrações de $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

TABELA 4.2. Estudo dos possíveis interferentes na determinação de N-acetilcisteína em amostras comerciais empregando o sistema FIA proposto.

Excipiente	Razão de concentração (Excipiente:N-acetilcisteína [*])	Interferência %
cloreto de benzalcônio	10:1	5
sacarina	10:1	3
bicarbonato de sódio	10:1	4
sacarose	10:1	5
frutose	10:1	4
benzoato de sódio	10:1	5
EDTA	1:10	-60

* [N-acetilcisteína] = $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Como pode ser observado na Tabela 4.2 somente o EDTA causou uma interferência significativa na determinação de N-acetilcisteína mesmo quando presente em uma concentração dez vezes menor que a concentração do analito. O EDTA causou uma interferência negativa da ordem de 60% sobre o sinal analítico, devido à complexação dos íons Zn(II) do reator pelo EDTA, gerando o complexo Zn(II)-EDTA que possui uma constante de estabilidade de $3,02 \times 10^{16}$ que provavelmente deve ser maior que a do complexo Zn(VA-BO₃)₃. Cabe ressaltar que o teor desse excipiente nos produtos farmacêuticos analisados é inferior aos investigados nesse estudo.

4.1.5. Teste de Recuperação

Nos testes de recuperação do analito, três concentrações diferentes da solução de referência de N-acetilcisteína, a saber: 3,0, 6,0 e 9,0 $\times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foram adicionadas a três amostras comerciais contendo uma concentração de N-acetilcisteína de aproximadamente 2,0 $\times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os resultados obtidos dessas soluções foram comparados com o sinal analítico das soluções de referência de mesma concentração. Os valores percentuais de recuperação variaram entre 95 e 103%, sugerindo ausência de interferência significativa da matriz no procedimento proposto. Os valores de recuperação estão apresentados na Tabela 4.3.

TABELA 4.3. Resultados do teste de recuperação de N-acetilcisteína adicionada a três amostras comerciais empregando o sistema em fluxo.

Amostras	N-acetilcisteína / 10^{-5} mol L ⁻¹		Recuperado / %
	Adicionado	Encontrado	
A	3,0	3,0 \pm 0,2	100
	6,0	5,9 \pm 0,1	98
	9,0	8,9 \pm 0,3	99
B	3,0	2,9 \pm 0,2	97
	6,0	6,2 \pm 0,1	103
	9,0	9,1 \pm 0,4	101
C	3,0	2,9 \pm 0,3	97
	6,0	5,7 \pm 0,2	95
	9,0	8,9 \pm 0,4	99

n=3

4.1.6. Estudo da Repetibilidade dos Sinais Analíticos e Frequência de Amostragem

Estudou-se a repetibilidade dos sinais analíticos do procedimento em fluxo desenvolvido, para concentrações de solução padrão de N-acetilcisteína 5,0 $\times 10^{-5}$ e 8,0 $\times 10^{-5}$ mol L⁻¹, obtendo-se desvios padrão relativos de 0,2 e 0,4%, respectivamente (Figura 4.7). A frequência de amostragem para o procedimento em fluxo desenvolvido foi de 60 determinações por hora.

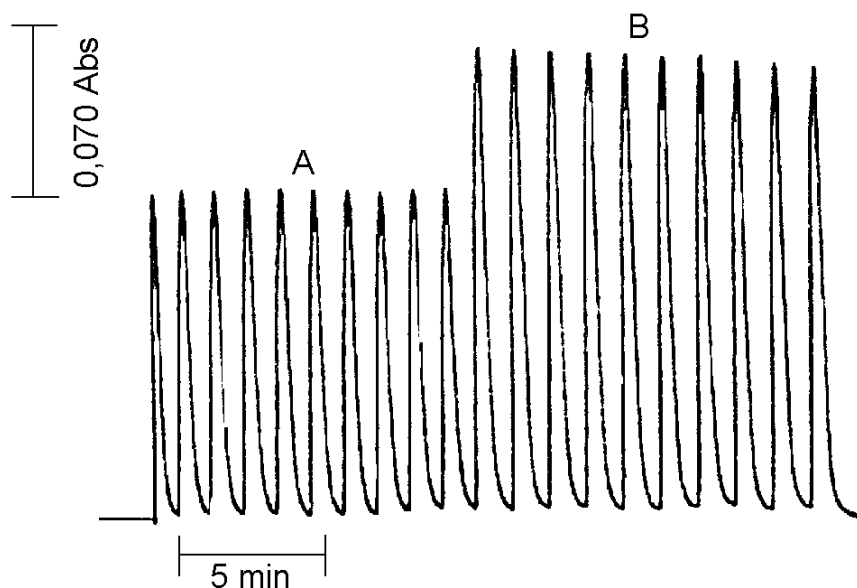


FIGURA 4.7. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de N-acetilcisteína nas concentrações de (A) $5,0 \times 10^{-5}$ e (B) $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. As condições experimentais para a realização desse estudo são apresentadas no item 3.2.5

4.1.7. Curva Analítica

A curva analítica (Figura 4.8) foi linear no intervalo de concentração de N-acetilcisteína entre $3,0 \times 10^{-5}$ e $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($A = 0,00921 + 784,5 C$; $r = 0,999$ onde A é a absorbância e C a concentração de N-acetilcisteína em mol L⁻¹) e apresentou um limite de detecção de $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica).

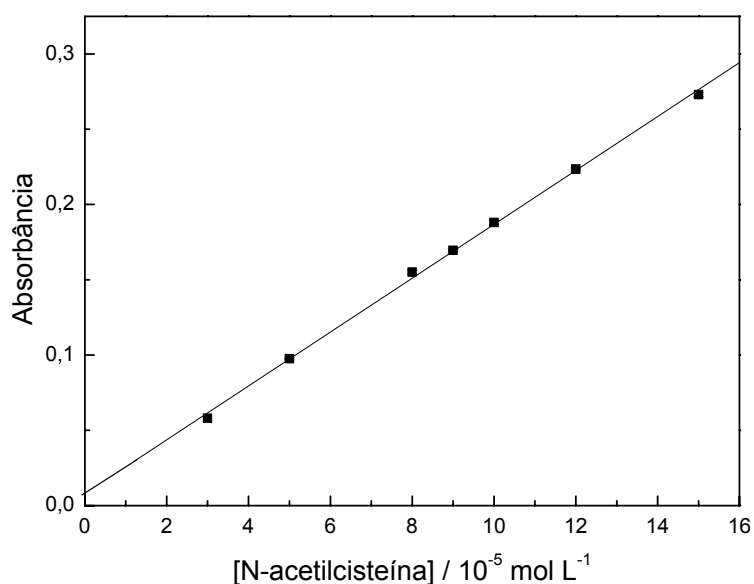


FIGURA 4.8. Curva analítica para a determinação de N-acetilcisteína utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto.

Os sinais transientes obtidos em triplicatas das soluções de referência de N-acetilcisteína e das quatro amostras, são apresentados na Figura 4.9.

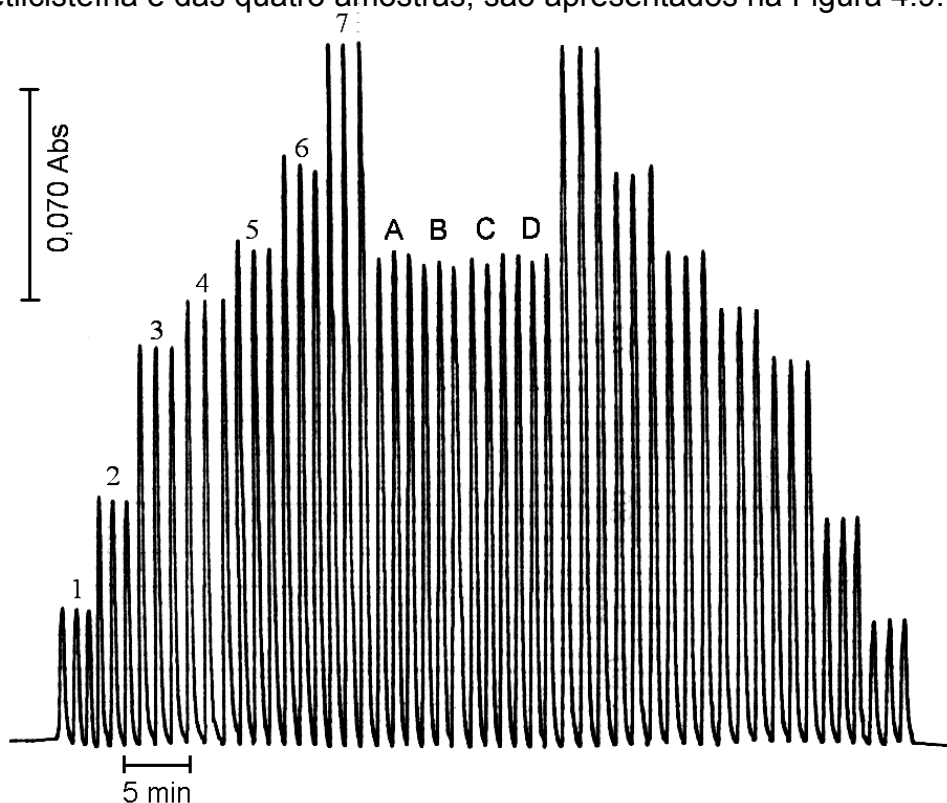


FIGURA 4.9. Sinais transientes obtidos na determinação de N-acetilcisteína em produtos farmacêuticos utilizando um reator em fase sólida contendo $Zn_3(PO_4)_2$ acoplado ao sistema de análise por injeção em fluxo. Da esquerda para a direita, os sinais correspondem a triplicatas das soluções de referência de N-acetilcisteína nas concentrações de $3,0 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-5}$; $8,0 \times 10^{-5}$; $9,0 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-4}$; $1,2 \times 10^{-4}$ e $1,5 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} seguidos de triplicatas das soluções das amostras (A, B, C e D) e das soluções de referência novamente em concentrações decrescentes. As condições empregadas para a obtenção dos sinais transientes são apresentadas no item 3.2.5.

4.1.8. Aplicação

O método proposto foi aplicado na determinação de N-acetilcisteína em quatro formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram comparados com um método oficial descrito na Farmacopéia Brasileira e são mostrados na Tabela 4.4. O teste-t pareado foi aplicado aos resultados obtidos, resultando em um valor de t calculado de 0,332, menor que o valor de t tabelado (3,182), indicando que o procedimento proposto possui boa exatidão, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos, a um nível de confiança de 95%.

TABELA 4.4. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto e o método oficial da Farmacopéia Brasileira²⁶.

Amostras	N-acetilcisteína / mg g ⁻¹		E / %		
	Rotulado	Método Oficial	Procedimento Proposto	Er ₁	Er ₂
A	20	20,2 ± 0,6	19,7 ± 0,5	-1,5	-2,5
B	20	19,7 ± 0,5	19,6 ± 0,4	-2,0	- 0,5
C	40	39,6 ± 0,4	39,7 ± 0,3	-0,7	0,2
D	40	39,7 ± 0,5	39,8 ± 0,1	-0,5	0,2

n =3

Er₁ = erro relativo entre o procedimento proposto e o valor rotulado

Er₂ = erro relativo entre o procedimento proposto e o método oficial

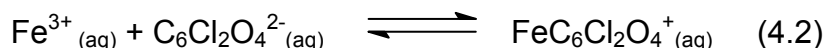
O emprego do reator em fase sólida contendo fosfato de zinco imobilizado em resina poliéster permitiu o uso de reagentes mais baratos³⁹, uma boa frequência de amostragem^{37,39,42} e um menor limite de detecção^{37,39} quando comparado com outros procedimentos espectrofotométricos empregando sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de N-acetilcisteína em amostras comerciais.

4.2. Determinação Espectrofotométrica de Captopril Utilizando um Reator de Cloranilato de Prata Imobilizado em Resina Poliéster Acoplado ao Sistema FIA

Um sal de cloranilato, o cloranilato de bário ($\text{BaC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$), foi proposto para a determinação de sulfato em água¹⁶⁰. O método baseou-se no fato do ânion SO_4^{2-} (aq) reagir com em meio ácido com o cloranilato de bário deslocando uma quantidade equivalente de íons cloranílico em função da menor solubilidade do sulfato de bário. Os íons cloranílico deslocados foram monitorados espectrofotometricamente em 528 nm.

Devido o captopril formar um precipitado com a prata¹⁶¹, foi desenvolvido um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de captopril em amostras comerciais empregando um reator em fase sólida contendo cloranilato de prata ($\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$) imobilizado em resina poliéster. A determinação indireta de captopril (R-SH) baseou-se na reação de precipitação desse fármaco com a Ag(I) em um reator em fase sólida contendo $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$, gerando no reator um sal insolúvel entre o captopril e a Ag(I) devido a menor solubilidade do sal formado (R-SAg) em relação ao $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$. Após a formação do R-SAg no reator ocorre o deslocamento do ânion cloranilato $\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4^{2-}$ que reage com o Fe(III) em um ponto de confluência do sistema em fluxo produzindo o complexo $\text{FeC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4^+$ que foi monitorado espectrofotometricamente em 528 nm. O sinal analítico obtido foi diretamente proporcional à concentração de captopril injetada no sistema em fluxo. O emprego do Fe(III) como reagente cromogênico aumentou substancialmente a magnitude do sinal analítico quando comparado com o monitoramento do ânion cloranilato, pois o complexo formado Fe(III)-cloranilato possui uma absortividade molar maior do que a absortividade molar do ânion cloranilato.

O princípio da determinação de captopril usando um reator de cloranilato de prata ($\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_{4(s)}$) é baseado nas seguintes reações de precipitação (4.1) e complexação (4.2) onde R-SH representa o captopril e $\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4^{2-}$ o ânion cloranilato.



$$\lambda = 528 \text{ nm}$$

4.2.1. Estudo dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA

Inicialmente, foram estudados os parâmetros químicos do sistema FIA de modo a investigar as melhores condições para a reação de precipitação (formação do precipitado entre o captopril e Ag(I) no RFS) e complexação (formação do cromóforo entre o ânion cloranilato deslocado do reator e o Fe(III)). Os parâmetros químicos do sistema em fluxo foram otimizados para obtenção dos melhores resultados em termos de repetibilidade e magnitude do sinal analítico. Foram testadas inicialmente as soluções transportadoras mais adequadas, pois o tempo de vida do reator em fase sólida está diretamente relacionado com a solução que flui pelo mesmo, devido a isso foram estudadas as seguintes soluções transportadoras, a saber: água desionizada e ácido nítrico. Não foi estudado tampão acetato, pois esse forma um complexo com Fe(III), tampão fosfato devido a provável formação de $\text{FePO}_{4(\text{s})}$, os ácidos sulfúrico, clorídrico e fosfórico e as bases hidróxido de sódio e potássio, uma vez que esses sais e essas bases formam sais insolúveis com os íons prata.

Os melhores resultados em termos de magnitude e repetibilidade dos sinais analíticos foram obtidos utilizando-se água desionizada como solução transportadora. Pois, os sinais de absorvância obtidos empregando uma solução de HNO_3 $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram 20% menor do que utilizando água desionizada como solução transportadora. Essa queda do sinal analítico se deve a dificuldade da desprotonação do hidrogênio ácido da molécula de captopril (R-SH) quando emprega-se solução transportadora ácida, pois em meio ácido ocorre o deslocamento da reação em direção aos reagentes dificultando a formação do $\text{AgS-R}_{(\text{s})}$, como mostrado pela equação 4.1.

O efeito da concentração do Fe(III) sobre o sinal analítico foi avaliado na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 4.10 mostra que a absorvância aumentou com o aumento da concentração de Fe(III) até $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e manteve-se praticamente inalterada nas concentrações superiores. Houve um aumento da magnitude do sinal analítico devido a maior

disponibilidade de Fe(III) para a formação do complexo $\text{FeC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4^+$. Portanto, a concentração de $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada para a continuidade do trabalho.

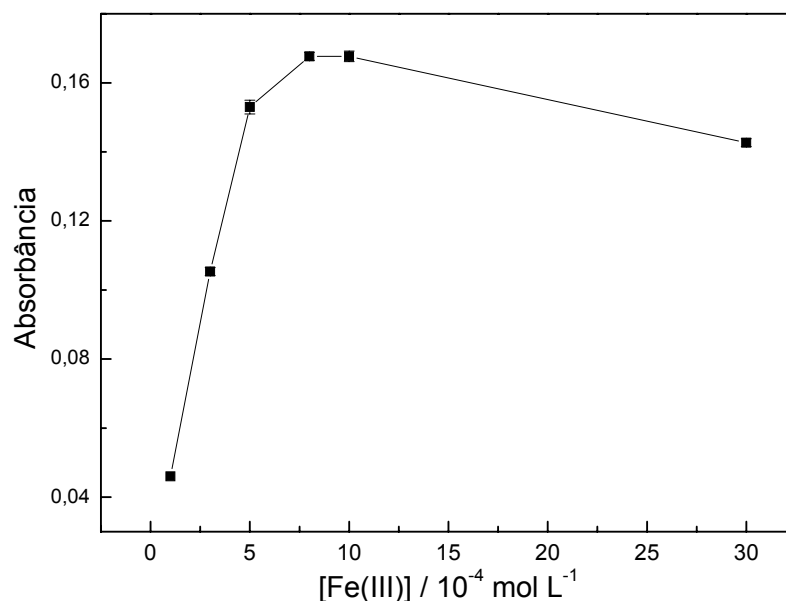


FIGURA 4.10. Estudo da concentração do Fe(III) sobre o sinal analítico (n=3) para uma concentração de captopril $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, RFS (5,0 cm \times 2,0 mm d.i.; tamanho de partícula 100-350 μm contendo $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ imobilizado em resina poliéster na proporção 2:1), volume da alça de amostragem de 150 μL , bobina helicoidal de 50 cm, vazões do Fe(III) e da solução transportadora (água desionizada) de 1,2 mL min^{-1} e 2,2 mL min^{-1} , respectivamente.

4.2.2. Efeito dos Parâmetros do Reator em Fase Sólida (RFS)

Os principais fatores relacionados ao reator em fase sólida foram avaliados, a saber: proporção em massa do sal imobilizado/resina poliéster, tamanho das partículas e comprimento do reator.

O efeito de três diferentes composições sobre o sinal analítico foi investigado, nas seguintes razões $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ e resina poliéster (2:1, 1:1 e 1:2 m/m) para verificar o efeito dessas sobre o sinal analítico. Foi observado um aumento contínuo do sinal analítico com o aumento da quantidade de $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ incorporado na resina até a proporção de 2:1 ($\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ /resina poliéster). Essa proporção foi à quantidade máxima de $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ que pode ser agregada a resina poliéster, uma vez que quantidades maiores do sal impossibilitaram na homogeneização da mistura. Como a composição 2:1 resultou na quantidade máxima de $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ que pode ser agregada a resina poliéster, essa foi selecionada por apresentar uma maior

magnitude dos sinais analíticos e também garantir um maior tempo de vida para o RFS.

Como mencionando no item 4.1.2, a granulometria das partículas introduzidas no reator é um importante fator para um melhor desempenho do reator. Assim, duas faixas de tamanhos de partículas foram investigadas neste trabalho (100-350 μm e 350-500 μm). A faixa de 100-350 μm foi selecionada devido à melhor magnitude do sinal analítico, provavelmente devido à maior superfície de contato das partículas contendo o reagente imobilizado com a zona de amostra injetada. Ademais, não houve dificuldades operacionais para a preparação dos reatores ou problemas de pressão hidrodinâmica com esse tamanho de partícula.

A Figura 4.11 apresenta a influência do comprimento do reator na magnitude do sinal analítico. O comprimento do reator foi avaliado na faixa de 3 a 10 cm, estando à solução transportadora a uma vazão de 2,2 mL min^{-1} e a concentração da solução de referência de captopril $3,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} . O sinal analítico aumentou gradualmente até o reator de 5 cm, havendo uma queda do sinal para comprimentos superiores a 5 cm. O sinal analítico obtido pelo reator de 5 cm foi maior que aquele obtido com o reator de 7 cm, devido provavelmente a cinética de formação do precipitado entre o captopril e a Ag(I) no reator ser rápida, impossibilitando uma dispersão acentuada do ânion cloranilato liberado do reator na solução transportadora, ou seja, um maior número de mols de ânions cloranilato reage com o Fe(III) produzindo um sinal analítico de maior magnitude. Assim sendo, foi selecionado o RFS de 5 cm para o desenvolvimento do trabalho, pois foi possível obter boa estabilidade da linha base, boa repetibilidade dos sinais transientes e alta frequência de amostragem empregando esse reator.

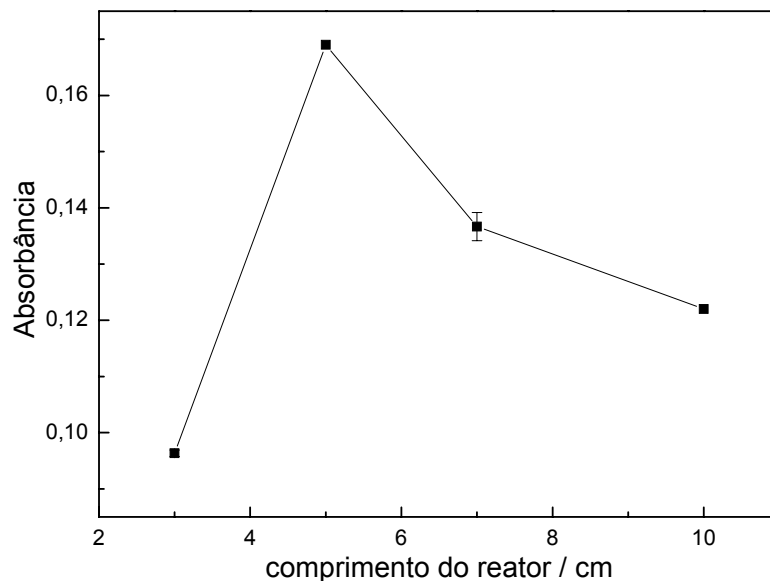


FIGURA 4.11. Estudo do comprimento do RFS sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de captopril $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do Fe(III) $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Demais condições ver Figura 4.10.

4.2.3. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA

O efeito da vazão da solução transportadora (água desionizada) foi avaliado entre $1,2$ e $3,5 \text{ mL min}^{-1}$, verificou-se a queda do sinal analítico a partir da vazão de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$, devido provavelmente à dispersão da zona de amostra em vazões maiores. Deste modo, foi selecionada a vazão de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ para a continuidade do trabalho.

A vazão da solução de Fe(III) foi avaliada entre $1,2$ e $2,4 \text{ mL min}^{-1}$, como pode-se observar na Figura 4.12 o sinal analítico diminuiu com o aumento da vazão, provavelmente devido à maior dispersão da zona de amostra para vazões maiores. Por isso, a vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ foi escolhida por apresentar uma maior magnitude dos sinais analíticos.

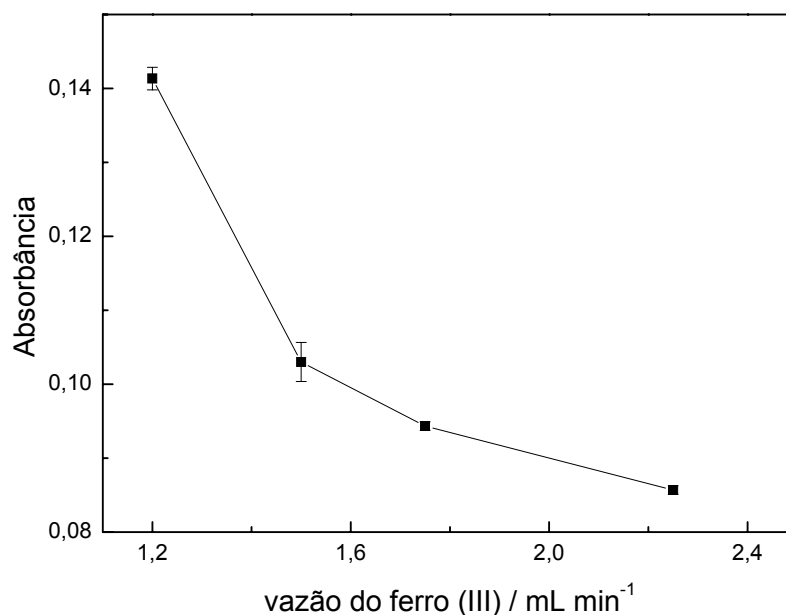


FIGURA 4.12. Estudo da vazão do Fe(III) sobre o sinal analítico para uma concentração de captopril $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do Fe(III) $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e vazão da solução transportadora $2,5 \text{ mL min}^{-1}$. Demais condições experimentais ver Figura 4.10.

O volume da alça de amostragem foi avaliado variando-se o comprimento da alça de $150 \mu\text{L}$ a $750 \mu\text{L}$ (Figura 4.13). A magnitude do sinal analítico aumentou acentuadamente entre 150 e $600 \mu\text{L}$, permanecendo praticamente constante em volumes superiores, indicando que se trata do volume limite de captopril necessário para a geração máxima do ânion cloranilato em linha. Sendo assim, selecionou-se um volume de $600 \mu\text{L}$ de amostra por apresentar uma boa repetibilidade dos sinais analíticos e maior frequência de amostragem em relação ao volume de $750 \mu\text{L}$.

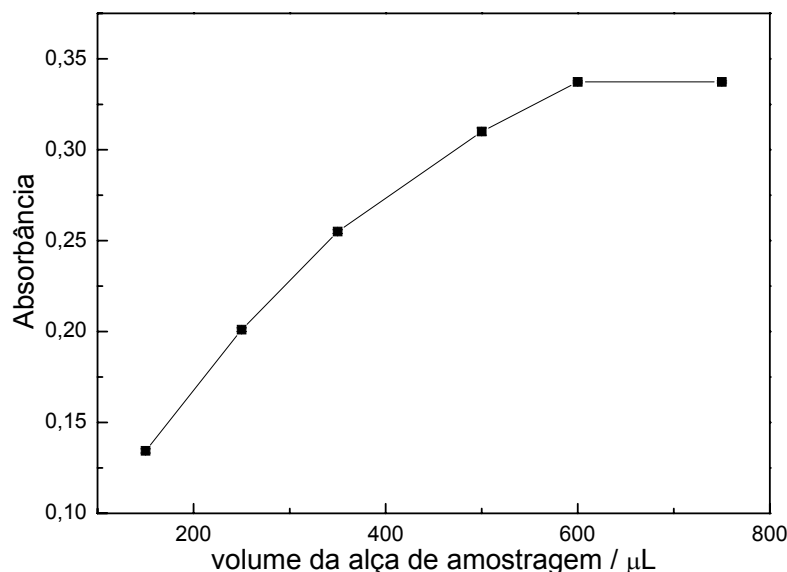


FIGURA 4.13. Estudo do volume da alça de amostragem sobre o sinal analítico para uma concentração de captopril $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do Fe(III) $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, vazão do Fe(III) de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e vazão da solução transportadora $2,5 \text{ mL min}^{-1}$. Demais condições experimentais ver Figura 4.10.

O estudo do efeito do comprimento da bobina helicoidal sobre o sinal analítico foi realizado variando-se o comprimento da bobina num intervalo de 30 a 150 cm. Como mostrado na Figura 4.14., após a bobina helicoidal de 50 cm, o sinal analítico diminui gradualmente pelo fato de o efeito da dispersão ser mais significativo. Como a cinética da reação de formação do complexo $\text{FeC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4^+$ é rápida, a dispersão prevalece e a absorbância diminui. Deste modo, uma bobina helicoidal de 50 cm foi utilizada no restante do trabalho.

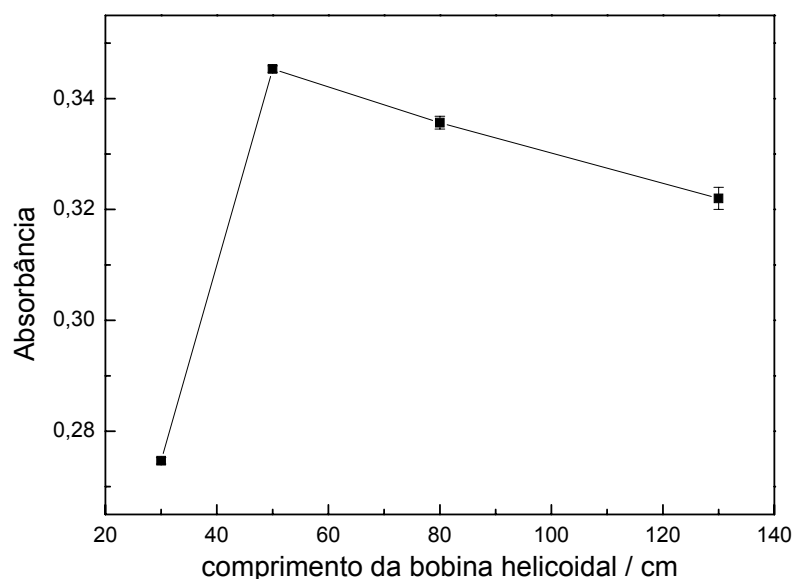


FIGURA 4.14. Estudo do comprimento da bobina helicoidal sobre o sinal analítico para uma concentração de captopril $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração do Fe(III) $8,0 \times 10^{-4}$, volume da alça de amostragem de $600 \mu\text{L}$, vazão do Fe(III) de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e vazão da solução transportadora $2,5 \text{ mL min}^{-1}$. Demais condições experimentais ver Figura 4.10.

O tempo de vida do reator foi avaliado de modo similar ao proposto por JURKIEWICZ *et al.*¹⁵⁹ e como descrito no item 4.1.3. Utilizando-se o mesmo RFS de $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ foram realizadas cerca de 500 injeções de captopril no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} . A sensibilidade do procedimento proposto manteve-se por volta de 90 % da resposta inicial após 500 injeções.

A Figura 4.15 mostra as curvas analíticas para a determinação de captopril na região de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} empregando um reator em fase sólida contendo cloranilato de prata imobilizado acoplado no sistema FIA com detecção do (■) ânion cloranilato e (●) do complexo Fe(III)-cloranilato. Como pode ser verificado nesta figura o monitoramento do complexo Fe(III)-cloranilato aumentou a sensibilidade (b = inclinação da curva analítica) do procedimento em um fator de 3, quando comparado com o método usando o ânion cloranilato. Por isso, o sistema Fe(III)-cloranilato foi selecionado para os demais experimentos.

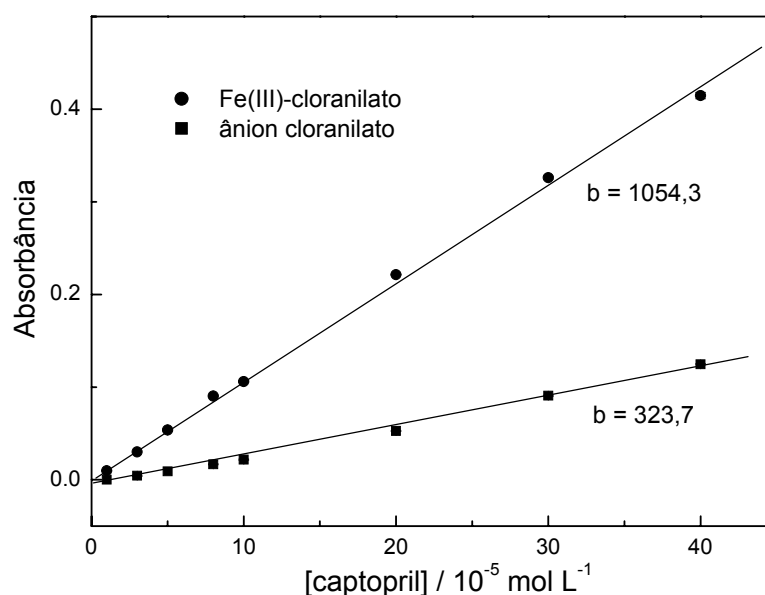


FIGURA 4.15. Curvas analíticas para a determinação de captopril em formulações farmacêuticas empregando um reator em fase sólida contendo cloranilato de prata imobilizado em resina poliéster acoplado ao sistema FIA. (●) soluções de referência de captopril variando de $1,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} empregando a formação do complexo Fe(III)-cloranilato. (■) As mesmas soluções de referência, mas como monitoramento do ânion cloranilato.

A Tabela 4.5 apresenta os parâmetros avaliados e os valores selecionados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de captopril em formulações farmacêuticas.

TABELA 4.5. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de captopril empregando um RFS de cloranilato de prata ($\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$) imobilizado em resina poliéster.

Parâmetros	Faixa estudada	Selecionado
$[\text{Fe(III)}] / 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	1 a 30	8
composição m/m de $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ e resina poliéster no reator	2:1, 1:1 e 1:2	2:1
tamanho das partículas (μm)	100-350 e 350-500	100-350
comprimento do reator (cm)	3 a 10	5
alça de amostragem (μL)	150 a 750	600
bobina helicoidal / cm	30 a 150	80
vazão da solução transportadora / mL min^{-1}	1,7 a 3,5	3,0
vazão do reagente Fe(III) / mL min^{-1}	1,2 a 2,3	1,2

4.2.4. Estudo dos Interferentes em Potencial

O efeito de interferentes em potencial na determinação de captopril em formulações farmacêuticas foi avaliado para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais (Tabela 4.6). As substâncias avaliadas foram: estearato de magnésio, celulose microcristalina, lactose e amido. O estudo foi realizado adicionando-se concentrações de cada excipiente em uma solução de referência e o sinal obtido foi comparado com o sinal analítico obtido de uma solução de referência sem adição da substância em estudo. Nesses experimentos, foram utilizadas soluções de referência de captopril $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com cada um dos possíveis interferentes em concentrações de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

TABELA 4.6. Estudo dos possíveis interferentes na determinação de captopril em amostras comerciais empregando o sistema FIA proposto.

Excipiente	Razão de concentração (Excipiente:captopril*)	Interferência %
estearato de magnésio	10:1	3
celulose microcristalina	10:1	2
lactose	10:1	4
amido	10:1	2

* [captopril] = $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Como pode ser observado na Tabela 4.6, nenhuma das substâncias investigadas causou uma interferência significativa na determinação de captopril mesmo quando presentes em uma concentração dez vezes maior que a concentração de captopril.

4.2.5. Teste de Recuperação

Nos testes de recuperação do analito, três concentrações diferentes da solução de referência de captopril, a saber: $1,0$, $4,0$ e $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas a quatro amostras comerciais diluídas na concentração de captopril $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e os resultados comparados com aqueles obtidos com as amostras não adicionadas do padrão. Os valores percentuais de recuperação variaram entre 98,2 e 105%, sugerindo ausência de interferência significativa da matriz no procedimento proposto. Os valores de recuperação estão apresentados na Tabela 4.7.

TABELA 4.7. Resultados do teste de recuperação de captopril adicionada a seis amostras comerciais empregando o sistema em fluxo.

Amostras	Captopril / 10^{-5} mol L ⁻¹		Recuperado / %
	Adicionado	Encontrado	
A	1,00	1,05 ± 0,05	105
	4,00	4,02 ± 0,02	100,5
	8,00	8,08 ± 0,07	101
B	1,00	1,03 ± 0,02	103
	4,00	4,14 ± 0,01	103,5
	8,00	8,10 ± 0,04	101
C	1,00	1,03 ± 0,05	103
	4,00	4,17 ± 0,01	104
	8,00	8,09 ± 0,02	101
D	1,00	1,00 ± 0,04	100
	4,00	4,09 ± 0,03	102
	8,00	8,30 ± 0,02	104

n=3

4.2.6. Estudo da Repetibilidade dos Sinais Analíticos e Frequência de Amostragem

Estudou-se a repetibilidade dos sinais analíticos do procedimento em fluxo desenvolvido, para concentrações de solução padrão de captopril $3,0 \times 10^{-4}$ e $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, obtendo-se desvios padrões relativos de 0,3 e 0,4%, respectivamente (Figura 4.16). A frequência de amostragem para o procedimento em fluxo desenvolvido foi de 70 determinações por hora.

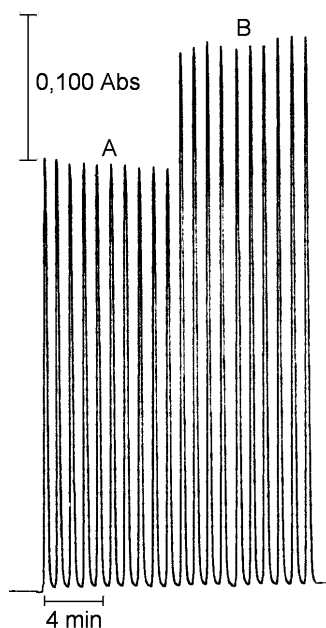


FIGURA 4.16. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de captopril nas concentrações de (A) $3,0 \times 10^{-4}$ e (B) $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. As condições experimentais para a realização desse estudo são apresentadas no item 3.3.5.

4.2.7. Curva Analítica

A curva analítica (Figura 4.17) foi linear no intervalo de concentração de captopril entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($A = -0,0022 + 1134,0 C$; $r = 0,999$ onde A é a absorbância e C a concentração de captopril em mol L⁻¹) e apresentou um limite de detecção de $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica).

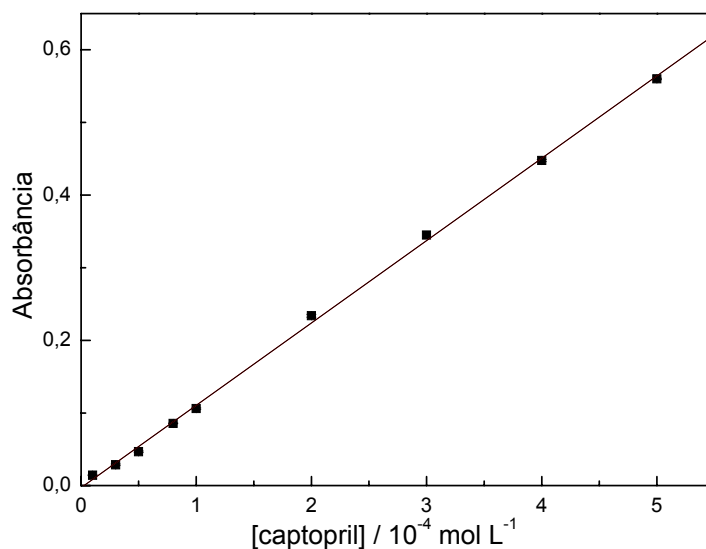


FIGURA 4.17. Curva analítica para a determinação de captopril utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto.

Os sinais transientes obtidos em triplicatas das soluções de referência de captopril e das seis amostras são apresentados na Figura 4.18.

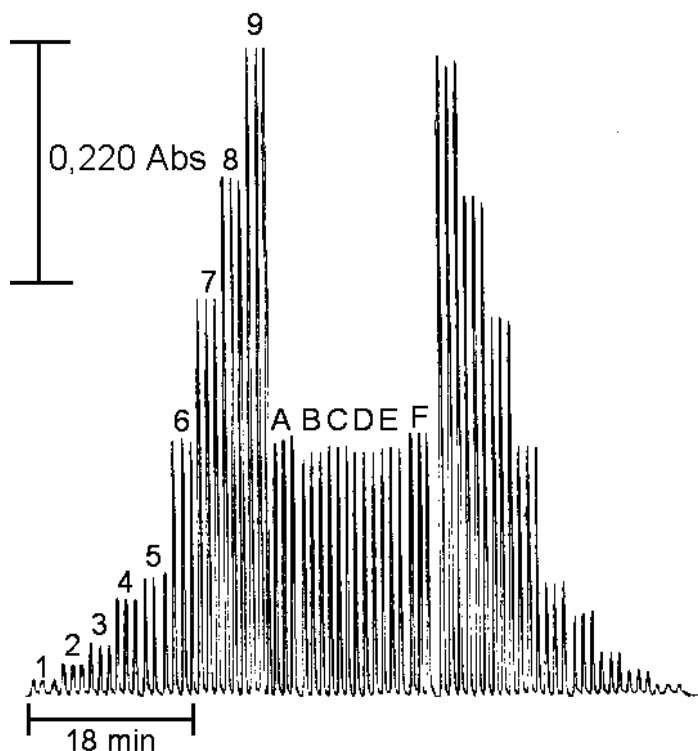


FIGURA 4.18. Sinais transientes obtidos na determinação de captopril em amostras comerciais utilizando um reator em fase sólida contendo cloranilato de prata imobilizado em resina poliéster acoplado ao sistema de análise por injeção em fluxo. Da esquerda para a direita, os sinais transientes correspondem a triplicatas das soluções de referência de captopril nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$; $3,0 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-5}$; $8,0 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-4}$; $2,0 \times 10^{-4}$; $3,0 \times 10^{-4}$; $4,0 \times 10^{-4}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ seguidos de triplicatas das soluções das amostras (A, B, C, D e F) e das soluções de referência novamente em concentrações decrescentes. As condições empregadas para a obtenção dos sinais transientes são apresentadas no item 3.3.5.

4.2.8. Aplicação

O método proposto foi aplicado na determinação de captopril em seis formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram comparados com um método descrito na literatura⁶⁵ e são mostrados na Tabela 4.8. O teste-t pareado foi aplicado aos resultados obtidos, resultando em um valor de t calculado de 0,503, menor que o valor de t tabelado (2,571), indicando que o procedimento proposto possui boa exatidão, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos, a um nível de confiança de 95%.

TABELA 4.8. Determinação de captopril em formulações farmacêuticas empregando o sistema FIA proposto e o método comparativo⁶⁵.

Amostras	captopril / mg comprimido ⁻¹			Erro	
	Rotulado	Comparativo	Proposto	Er ₁ / %	Er ₂ / %
A	25,0	25,2 ± 0,1	25,5 ± 0,1	1,2	2,0
B	25,0	24,7 ± 0,2	24,5 ± 0,1	- 0,8	- 2,0
C	25,0	25,0 ± 0,3	24,9 ± 0,2	- 0,4	- 0,4
D	12,5	12,6 ± 0,4	12,4 ± 0,2	- 1,6	- 0,8
E	12,5	12,3 ± 0,4	12,5 ± 0,2	1,6	0
F	50,0	51,6 ± 0,3	52,3 ± 0,4	1,3	4,6

n = 3

Er₁ = erro relativo entre o procedimento proposto e o valor rotuladoEr₂ = erro relativo entre o procedimento proposto e o método comparativo

O emprego do reator em fase sólida contendo cloranilato de prata imobilizado em resina de poliéster apresentou um menor limite de detecção^{69,70} e uma maior frequência de amostragem^{69,70,73,86} quando comparado com outros procedimentos espectrofotométricos empregando sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de captopril em amostras comerciais.

4.3. Determinação Espectrofotométrica de N-acetilcisteína e Captopril em Formulações Farmacêuticas Empregando a Formação do Azul da Prússia em Linha Utilizando um Sistema FIA com Zonas Coalescentes

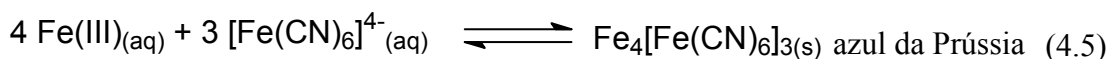
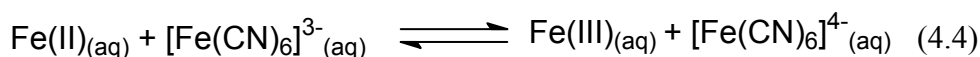
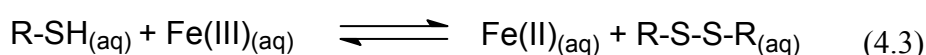
O azul da Prússia foi descoberto em 1704 por Diesbach, sendo posteriormente usado como corante para tecidos, pinturas e decorações¹⁶².

As primeiras análises a respeito da composição química e estrutura cristalina do azul da Prússia foram realizadas a partir de 1936 por Keggin e Miles via estudos por difratometria de raios-X¹⁶³.

Historicamente, a reação química de formação do azul da Prússia ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) é um teste qualitativo clássico para detectar Fe(II) usando hexacianoferrato(III) como reagente.

O azul da Prússia pode ser formado a partir da reação redox entre o Fe(III) e um tiol (R-SH) como mostrado pelas reações 4.3 a 4.5.

Inicialmente, ocorre a redução do Fe(III) pela ação do tiol, gerando um dissulfeto (R-S-S-R) e Fe(II). O Fe(II) gerado (equação 4.3) é oxidado a Fe(III) pelo hexacianoferrato(III) ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) (equação 4.4) produzindo ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$). A terceira e última etapa (equação 4.5) é a formação do azul da Prússia $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, entre o Fe(III) e o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ gerados na equação 4.4.



O complexo formado $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ (azul da Prússia) é altamente insolúvel ($K_s = 3,0 \times 10^{-41}$), porém se o Fe(III) for adicionado a um excesso de hexacianoferrato (III) de potássio, evita-se a precipitação do azul da Prússia produzindo assim uma solução coloidal solúvel $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ^{163,164} (azul da Prússia solúvel) que pode ser detectado espectrofotometricamente em 700 nm.

Assim, foi desenvolvida uma nova estratégia em fluxo para a determinação indireta de N-acetilcisteína e captopril em formulações farmacêuticas

empregando a formação do azul da Prússia em linha utilizando Fe(III) e hexacianoferrato (III) como reagentes cromogênicos.

4.3.1. Estudo dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA

Os experimentos foram conduzidos de modo a se otimizar os mesmos parâmetros físicos e químicos para os dois analitos, buscando sempre o melhor compromisso entre frequência de amostragem e magnitude do sinal analítico.

Nesse sistema, ocorre a acumulação gradativa do complexo (azul da Prússia) nas bobinas helicoidais e na cela de fluxo de caminho óptico de 1,0 cm. Essa acumulação gera instabilidade da linha base e na repetibilidade dos sinais analíticos. Então, para evitar a acumulação gradativa do azul da Prússia, foi inserido na configuração inicial do sistema em fluxo um fluxo intermitente de solução de ácido oxálico 0,5% (m/v) em meio de NaOH 0,1 mol L⁻¹ para dissociar o complexo aderido nas paredes dos tubos de polietileno e na cela de fluxo. Essa configuração permitiu ainda um aumento na frequência de amostragem.

Inicialmente, os experimentos foram realizados para a escolha da solução carregadora ideal para a formação do azul da Prússia em linha. Estudou-se a influência da água desionizada; HNO₃ e H₂SO₄ nas concentrações de 5,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ e 5,0 × 10⁻² mol L⁻¹ sobre a magnitude do sinal analítico. Nesses experimentos, foram utilizadas soluções de referência de N-acetilcisteína e captopril 2,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹, concentração de hexacianoferrato de potássio 1,0 × 10⁻² mol L⁻¹, vazão da solução transportadora 4,1 mL min⁻¹, alça da amostra e do reagente (Fe(III)) de 450 µL e bobinas helicoidais B1 e B2 de 60 e 80 cm, respectivamente.

Empregando-se HNO₃ e H₂SO₄ na concentração de 5,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ como soluções transportadoras não houve nenhum aumento do sinal de absorvância em relação aos valores de absorvância obtidos utilizando água desionizada como solução transportadora. Entretanto, empregando os mesmos ácidos na concentração de 5,0 × 10⁻² mol L⁻¹ houve um aumento do sinal analítico do branco, diminuindo assim a sensibilidade do procedimento. Dessa maneira, selecionou-se a água desionizada como solução transportadora.

O efeito da concentração do Fe(III) sobre o sinal analítico foi avaliado na faixa de concentração de 5,0 × 10⁻⁴ a 3,0 × 10⁻³ mol L⁻¹, mantendo-se fixa a concentração de N-acetilcisteína e de captopril em 2,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹. Como pode ser

observado na Figura 4.19, a magnitude do sinal analítico aumentou até uma concentração de Fe(III) de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para ambos analitos, sendo essa, a concentração de Fe(III) selecionada

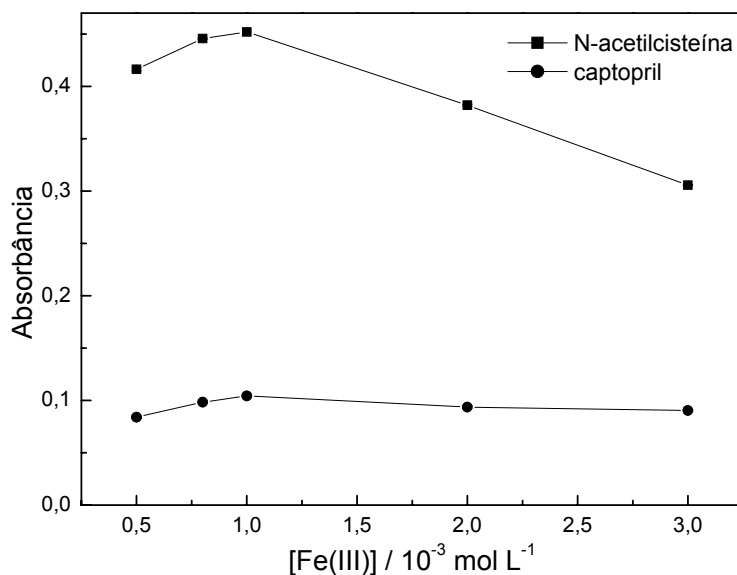


Figura 4.19. Estudo da concentração do reagente Fe(III) sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de N-acetilcisteína e captopril de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, vazão da solução transportadora água desionizada ($4,1 \text{ mL min}^{-1}$), volume da alça de amostragem e do reagente de $450 \mu\text{L}$, fluxo intermitente de ácido oxálico 0,5% (m/v) em meio de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($6,3 \text{ mL min}^{-1}$), concentração de hexacianoferrato $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,7 \text{ mL min}^{-1}$), bobinas helicoidais B1 e B2 de 60 e 80 cm, respectivamente.

Como foi supracitado, para evitar a precipitação do azul da Prússia na bobina helicoidal 2 e na cela de fluxo é necessário empregar excesso de hexacianoferrato. Assim, fixou-se a concentração desse reagente em $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, cinco vezes maior que a concentração de Fe(III) otimizada ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

4.3.2. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA

O efeito da vazão da solução transportadora (água desionizada) foi avaliado entre $2,2$ e $4,9 \text{ mL min}^{-1}$, mantendo-se constante a vazão do hexacianoferrato em $1,7 \text{ mL min}^{-1}$. A Figura 4.20 mostra a queda do sinal analítico, com o aumento da vazão, devido provavelmente à dispersão da zona de amostra em vazões maiores. Como a frequência de amostragem ficaria comprometida empregando a vazão de $2,2 \text{ mL min}^{-1}$, optou-se pela vazão de $3,4 \text{ mL min}^{-1}$ por apresentar uma maior frequência de amostragem.

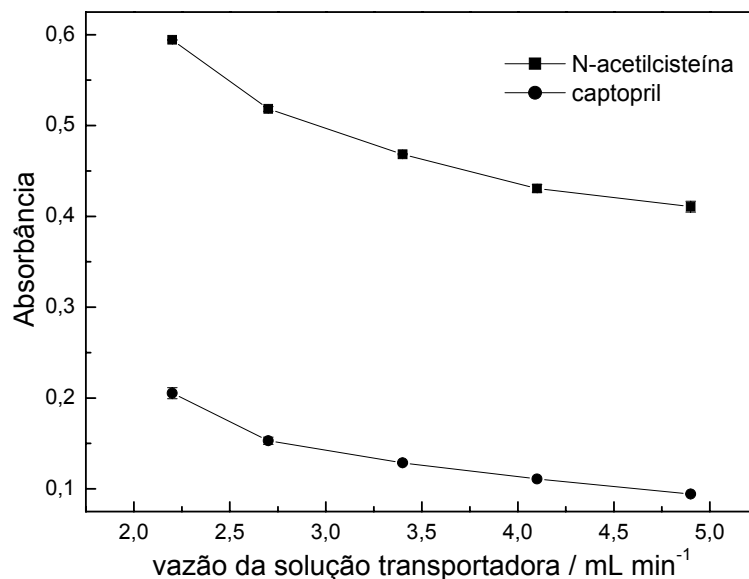


Figura 4.20. Estudo da vazão da solução transportadora sobre o sinal analítico (n=3) empregando concentração de Fe(III) $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Demais condições experimentais ver Figura 4.19.

A Figura 4.21 mostra o efeito da vazão do hexacianoferrato no intervalo entre 0,7 e 2,7 mL min⁻¹ sobre o sinal analítico. Utilizando-se soluções de N-acetilcisteína e captopril na concentração de $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Observou-se a diminuição do sinal analítico com o aumento da vazão, devido ao curto período de tempo para a formação do azul da Prússia na bobina helicoidal 2, sendo assim a vazão de 0,7 mL min⁻¹ foi selecionada para estudos posteriores por apresentar maior magnitude do sinal analítico.

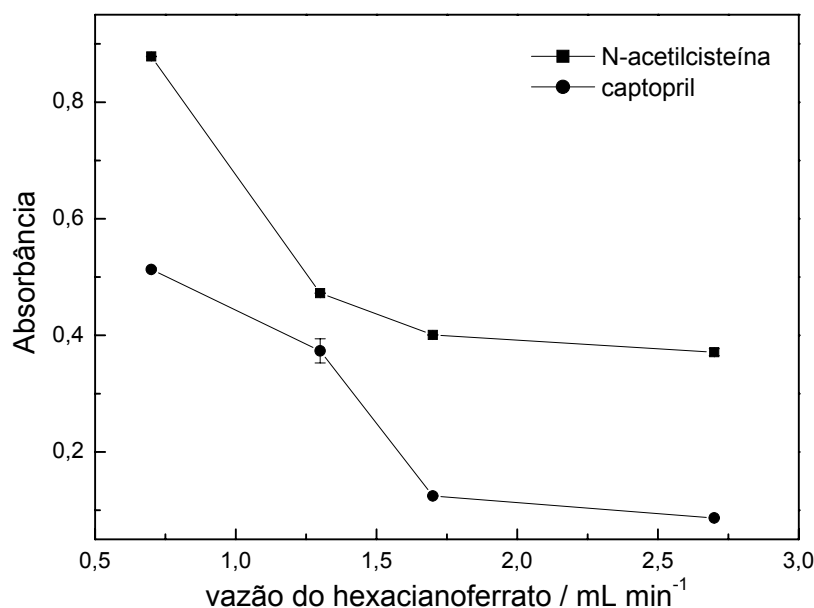


FIGURA 4.21. Estudo da vazão do hexacianoferrato sobre o sinal analítico (n=3) empregando concentração de Fe(III) $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e vazão da solução transportadora água desionizada (4,1 mL min⁻¹). Demais condições experimentais ver Figura 4.19.

O efeito da variação dos volumes da amostra e do reagente, foram estudados variando-se simultaneamente as alças L1 (amostra) e L2 (Fe(III)). Os volumes das alças foram variados no intervalo de 150 a 450 μL , sendo mantida a concentração de N-acetilcisteína e captopril em $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Como mostrada na Figura 4.22, a magnitude do sinal analítico aumentou até um volume de amostra e reagente injetados de 450 μL . Houve um aumento progressivo do sinal analítico devido ao aumento do volume de analito e Fe(III) terem sido introduzidos no percurso analítico, o que aumentou a formação do azul da Prússia. Não foram estudados volumes maiores das alças, pois a frequência de amostragem ficaria comprometida. Conseqüentemente, volumes da amostra e do reagente de 450 μL foram selecionados.

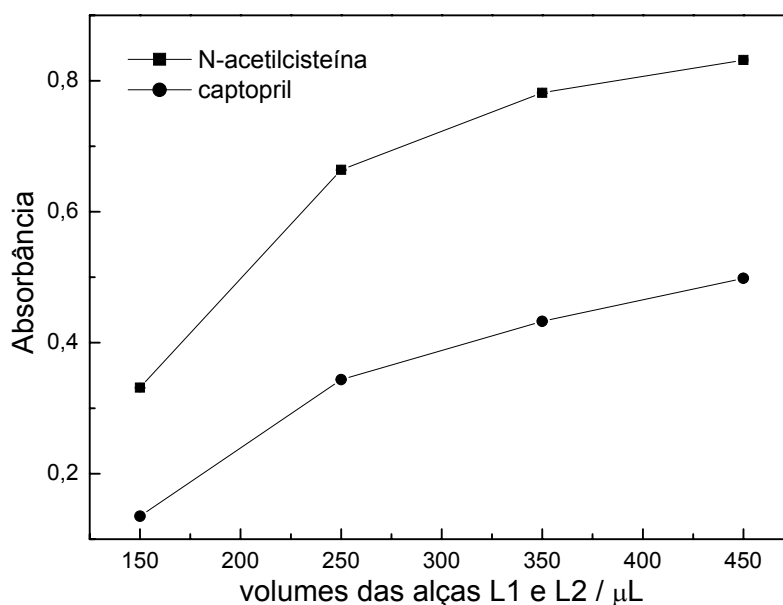


FIGURA 4.22. Estudo dos volumes das alças L1 e L2 sobre o sinal analítico ($n=3$) empregando concentração do reagente Fe(III) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, vazão da solução transportadora água desionizada de $3,4 \text{ mL min}^{-1}$ e vazão do hexacianoferrato de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. Demais condições experimentais ver Figura 4.19.

O efeito do comprimento da bobina helicoidal (B1) foi estudado na faixa de 30-70 cm. Nessa bobina, ocorre a redução do Fe(III) para Fe(II) pela ação do analito e a formação do dissulfeto como mostrado na equação 4.1. Como pode ser visto pela Figura 4.23, a magnitude do sinal analítico ficou praticamente constante para a N-acetilcisteína com o aumento do comprimento da bobina helicoidal 1 de 30 para 70 cm e um houve um ligeiro acréscimo do sinal analítico de 30 para 50 cm para o captopril. Bobinas helicoidais menores que 30 cm não permitiram uma mistura homogênea da zona da amostra com o reagente Fe(III) acarretando

instabilidade da linha base. Assim, a bobina helicoidal de 50 cm foi escolhida como a melhor combinação entre magnitude do sinal analítico e frequência de amostragem.

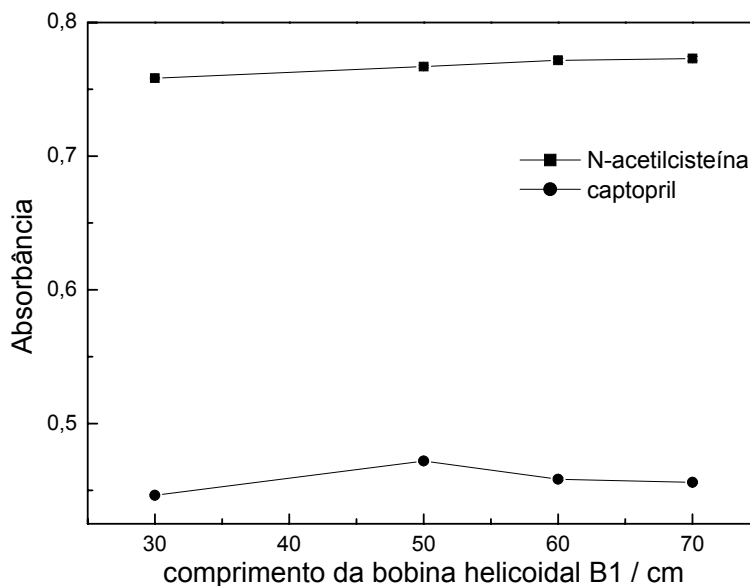


FIGURA 4.23. Estudo do comprimento da bobina helicoidal B1 sobre o sinal analítico (n=3) empregando vazão da solução transportadora água desionizada ($3,4 \text{ mL min}^{-1}$), concentração de Fe(III) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem e do reagente de $450 \mu\text{L}$ e concentração de hexacianoferrato $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,7 \text{ mL min}^{-1}$). Demais condições experimentais ver Figura 4.19.

A influência do comprimento da bobina helicoidal 2 sobre o sinal analítico foi avaliada no intervalo de 70 a 150 cm. Nessa bobina ocorre a formação do azul da Prússia entre o Fe(II) gerado na bobina helicoidal 1 e o hexacianoferrato. Como apresentada na Figura 4.24, a magnitude do sinal analítico decresceu gradualmente com o aumento do comprimento da bobina de 70 para 150 cm para o estudo com a N-acetilcisteína, devido provavelmente ao efeito de dispersão. Para o estudo empregando o captopril houve um ligeiro acréscimo do sinal de absorbância quando variou-se o comprimento da bobina 2 de 70 para 120 cm. Contudo, a bobina helicoidal 2 de 90 cm foi selecionada, objetivando o melhor compromisso entre magnitude do sinal analítico e frequência de amostragem.

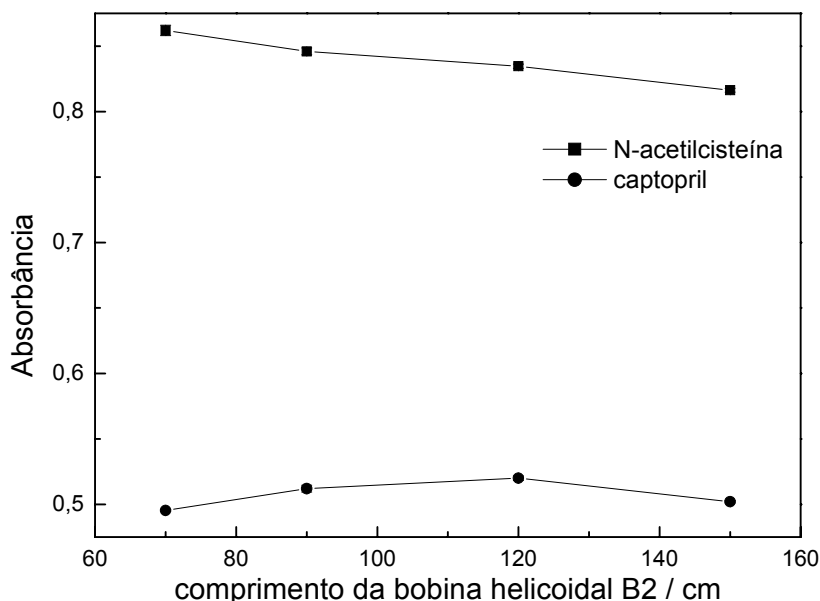


FIGURA 4.24. Estudo do comprimento da bobina helicoidal B2 sobre o sinal analítico empregando vazão da solução transportadora água desionizada ($3,4 \text{ mL min}^{-1}$), concentração de Fe(III) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem e do reagente de $450 \text{ }\mu\text{L}$, concentração de hexacianoferrato $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,7 \text{ mL min}^{-1}$) e bobina helicoidal 1 de 50 cm . Demais condições experimentais ver Figura 4.19.

A Tabela 4.9 apresenta os parâmetros avaliados e os selecionados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de N-acetilcisteína e captopril em formulações farmacêuticas.

TABELA 4.9. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de N-acetilcisteína e captopril empregando o sistema FIA proposto

Parâmetros	Faixa estudada	Selecionado
$[\text{Fe(III)}] / 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	0,5 a 3,0	1,0
vazão da solução transportadora / mL min^{-1}	2,2 a 4,9	3,4
vazão do hexacianoferrato/ mL min^{-1}	0,7 a 2,7	0,7
alça da amostra e do reagente (μL)	150 a 450	450
comprimento da bobina helicoidal 1 / cm	30 a 70	50
comprimento da bobina helicoidal 2 / cm	70 a 150	90

4.3.3. Estudo de Interferentes e Teste de Recuperação

A seletividade do método proposto para a determinação de N-acetilcisteína foi testada estudando-se o efeito de excipientes comumente

encontrados em formulações farmacêuticas. Para uma concentração de N-acetilcisteína $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, nenhuma interferência foi observada para as seguintes substâncias presentes em uma concentração dez vezes maior que a concentração de N-acetilcisteína: frutose, sacarina, sacarose, bicarbonato de sódio, benzoato de sódio e cloreto de benzalcônio. Uma interferência negativa de 15% no sinal analítico foi causada pelo fosfato de sódio dibásico quando presente na mesma concentração da N-acetilcisteína, devido provavelmente a formação de um sal insolúvel entre o íon fosfato e Fe(III).

No teste de recuperação, três concentrações de soluções de referência de N-acetilcisteína ($1,0 \times 10^{-5}$, $3,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) foram adicionadas a cinco soluções das amostras de produtos farmacêuticos contendo aproximadamente N-acetilcisteína ($5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e os resultados foram comparados com aqueles obtidos das soluções de referência de mesma concentração sem a adição das soluções de amostras. Os valores percentuais de recuperação variaram entre 96,2 e 104% sugerindo a ausência significativa de interferência da matriz e a exatidão do procedimento proposto.

O efeito de interferentes em potencial na determinação de captopril em formulações farmacêuticas foi avaliado para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais. Nesses experimentos, foram utilizadas soluções de referência de captopril $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ adicionadas com cada um dos possíveis interferentes em concentrações de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (lactose, celulose microcristalina, estearato de magnésio e amido) e os resultados foram comparados com aqueles obtidos com a solução de referência de captopril $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Nenhuma interferência foi observada para as substâncias estudadas, demonstrando a seletividade do método proposto para a determinação de captopril.

No teste de recuperação, três concentrações de soluções de referência de captopril ($3,0 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-5}$ e $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) foram adicionadas a seis soluções das amostras de produtos farmacêuticos contendo aproximadamente captopril ($7,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e os resultados foram comparados com aqueles obtidos das soluções de referência de mesma concentração sem a adição das soluções de amostras. Os valores percentuais de recuperação variaram entre 97,1 e 102,4%, sugerindo ausência de interferência significativa da matriz no procedimento proposto.

4.3.4. Estudo da Repetibilidade e Frequência de Amostragem

Estudou-se a repetibilidade do procedimento desenvolvido empregando soluções padrões de N-acetilcisteína e de captopril nas concentrações de $5,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, obtendo-se desvios padrões relativos menores que 2% para ambos analitos (Figura 4.25). A frequência de amostragem para a determinação de N-acetilcisteína e captopril foi de 60 determinações por hora.

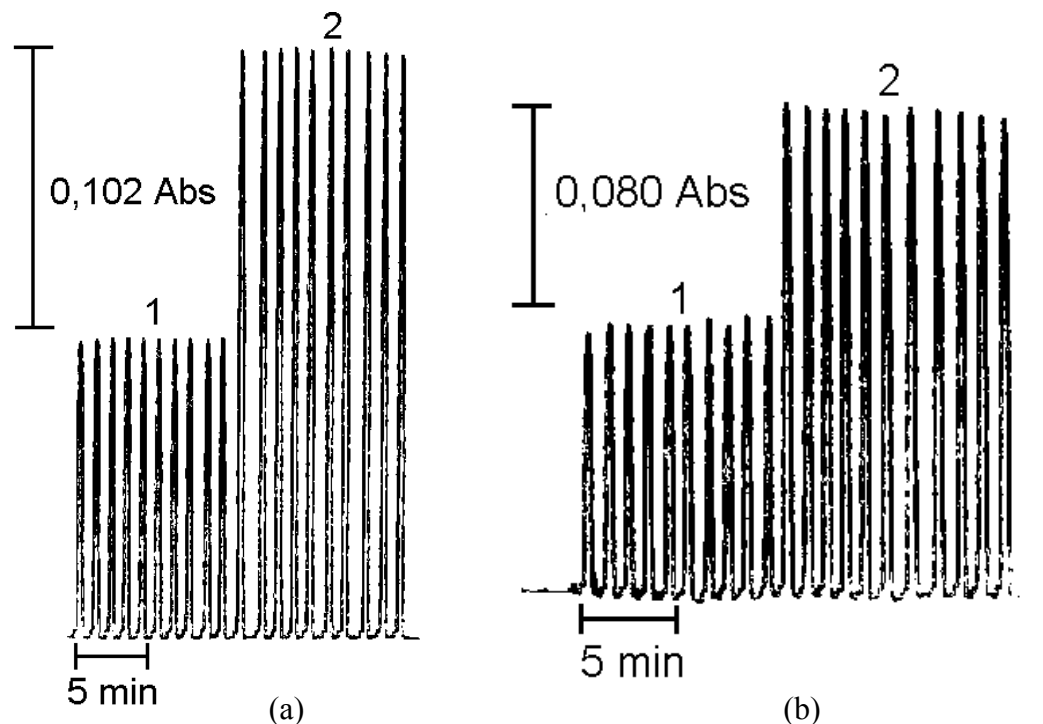


FIGURA 4.25. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de (a) N-acetilcisteína e de (b) captopril nas concentrações de (1) $5,0 \times 10^{-5}$ e (2) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

4.3.5. Curva Analítica

A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de N-acetilcisteína entre $3,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($A = -0,05439 + 3124,60 C$; $r = 0,999$ onde A é a absorbância e C a concentração de N-acetilcisteína em mol L⁻¹) e para o captopril a curva de calibração foi linear na região de concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($A = -0,0831 + 2218,25 C$; $r = 0,999$ onde A é a absorbância e C a concentração de captopril em mol L⁻¹). Os limites de detecção (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica) obtidos foram de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $3,9 \times 10^{-5}$ para a N-acetilcisteína e captopril, respectivamente. As curvas analíticas obtidas são apresentadas na Figura 4.26.

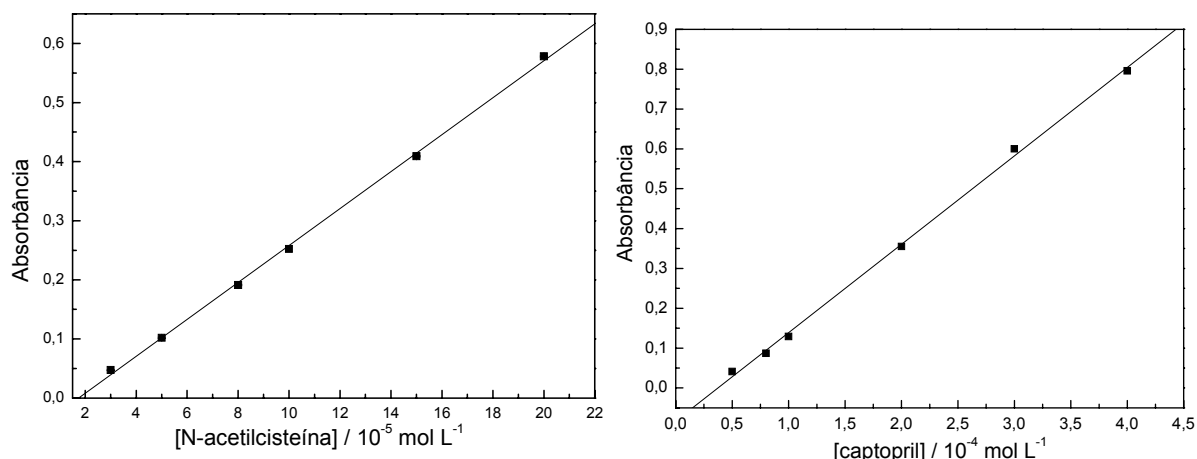


FIGURA 4.26. Curvas analíticas para determinação de N-acetilcisteína e captopril utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto.

O procedimento proposto foi aplicado na determinação de N-acetilcisteína e captopril em formulações farmacêuticas. Triplicatas das soluções de referência de N-acetilcisteína, captopril e das soluções das amostras foram injetadas no sistema em fluxo ilustrado na Figura 3.3. Os sinais transientes obtidos para a determinação de N-acetilcisteína e captopril estão apresentados na Figura 4.27.

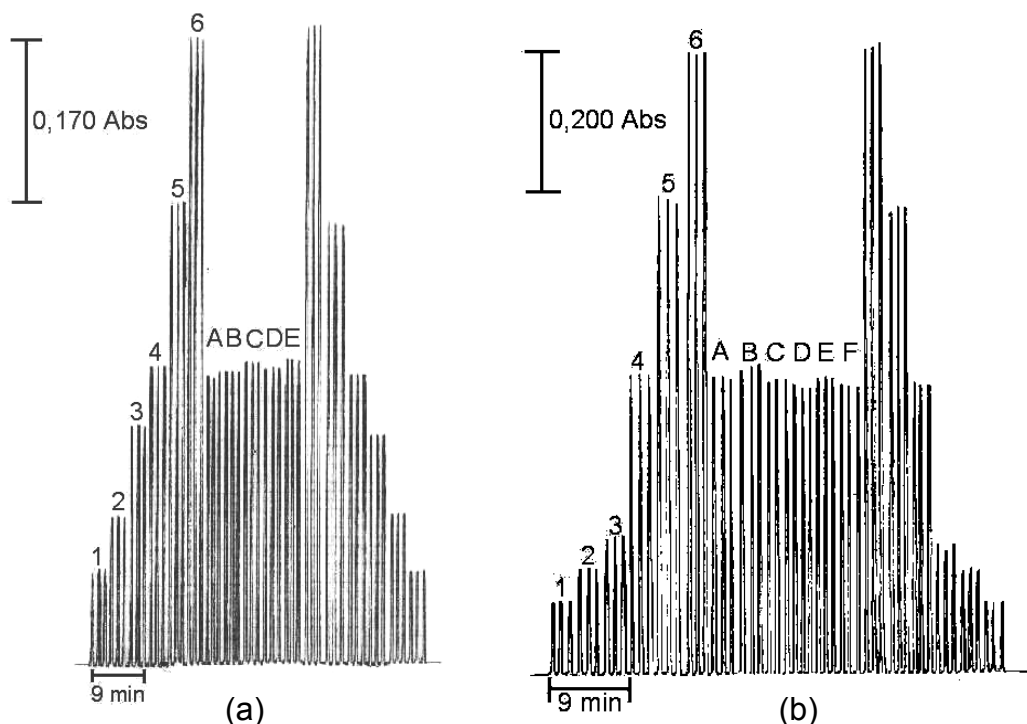


FIGURA 4.27. Sinais transientes em triplicatas das soluções de referência de (a) N-acetilcisteína nas concentrações de (1) $3,0 \times 10^{-5}$, (2) $5,0 \times 10^{-5}$, (3) $8,0 \times 10^{-5}$, (4) $1,0 \times 10^{-4}$, (5) $1,5 \times 10^{-4}$ e (6) $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e das cinco amostras A, B, C, D e E seguidos das soluções de referência novamente em concentrações decrescentes e (b) captopril nas concentrações de (1) $5,0 \times 10^{-5}$, (2) $8,0 \times 10^{-5}$, (3) $1,0 \times 10^{-4}$, (4) $2,0 \times 10^{-4}$, (5) $3,0 \times 10^{-4}$ e (6) $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e das seis amostras A, B, C, D, E e F seguidos das soluções de referência novamente em concentrações decrescentes.

4.3.6. Aplicações

O método proposto foi aplicado na determinação de N-acetilcisteína e captopril em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos utilizando um método oficial para a N-acetilcisteína e um método comparativo para o captopril. O teste-t pareado foi aplicado aos resultados obtidos, gerando em um valor de t calculado de 0,781, menor que o valor de t tabelado (2,776) para a N-acetilcisteína e para o captopril o valor de t calculado foi de 0,925, menor que o valor de t tabelado (2,571) indicando que o procedimento proposto possui boa exatidão, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos, a um nível de confiança de 95%. Os resultados obtidos na determinação de N-acetilcisteína e captopril estão mostrados nas Tabelas 4.10 e 4.11, respectivamente.

TABELA 4.10. Determinação de N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o métodos oficial²⁶.

Amostras	N-acetilcisteína			Erro relativo/%	
	Rotulado	Método Oficial	Procedimento Proposto	Er ₁	Er ₂
A*	200,0	194,6 ± 0,1	192,0 ± 0,2	-4,0	-1,4
B*	200,0	201,3 ± 0,3	196,0 ± 0,1	-2,0	-2,6
C*	100,0	101,5 ± 0,4	103,2 ± 0,3	3,2	1,6
D*	100,0	98,5 ± 0,2	98,7 ± 0,2	-1,3	0,2
E**	40,0	42,6 ± 0,3	41,4 ± 0,4	3,5	-2,9

n=3

*mg envelope⁻¹

**mg mL⁻¹

Er₁ = erro relativo entre o procedimento proposto e o valor rotulado

Er₂ = erro relativo entre o procedimento proposto e o método oficial

TABELA 4.11. Determinação de captopril em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o métodos comparativo⁶⁵.

Amostras	Captopril mg comprimido ⁻¹		Erro relativo/%		
	Rotulado	Método comparativo	Procedimento Proposto	Er ₁	Er ₂
A	25,0	25,2 ± 0,1	24,7 ± 0,2	-1,2	-2,0
B	25,0	25,2 ± 0,4	25,4 ± 0,1	1,6	0,8
C	25,0	25,1 ± 0,2	24,6 ± 0,3	-1,6	-2,0
D	12,5	12,7 ± 0,1	12,2 ± 0,2	-2,4	-4,1
E	12,5	12,0 ± 0,3	12,4 ± 0,1	-1,6	3,2
F	50,0	49,7 ± 0,4	48,8 ± 0,4	-2,4	-1,8

n=3

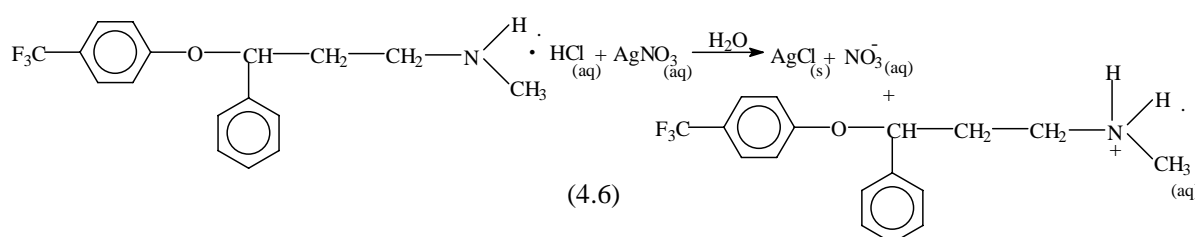
Er₁ = erro relativo entre o procedimento proposto e o valor rotuladoEr₂ = erro relativo entre o procedimento proposto e o método comparativo

As características analíticas obtidas com o sistema em fluxo desenvolvido e trabalhos com detecção espectrofotométrica previamente publicados para a determinação de N-acetilcisteína e captopril foram comparados. A região linear para a determinação de N-acetilcisteína foi comparável com Fornazari *et al.*⁴² e Vieira & Fatibello-Filho⁴³ e para o captopril a região linear foi maior que aquela obtida por Karlicek & Solich⁷⁴ e menor que aquela obtida por Tzanavaraz *et al.*^{69,70} e Suarez *et al.*⁷³ O limite de detecção para a determinação de N-acetilcisteína e captopril obtidos respectivamente foram menores que aqueles obtidos nos trabalhos de Suarez *et al.*^{37,73} e Tzanavaraz *et al.*⁶⁹.

Para a determinação de N-acetilcisteína e captopril, o procedimento desenvolvido apresentou uma melhor região linear (10 a 100 vezes maior), melhor repetibilidade dos sinais analíticos e uma menor sensibilidade em relação aos trabalhos quimiluminescentes descritos na literatura^{51,52,81-83}. Entretanto, nestes métodos analíticos foram empregados um detector de custo elevado.

4.4. Determinação Turbidimétrica de Cloridrato de Fluoxetina em um Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com Zonas Coalescentes Empregando Nitrato de Prata como Reagente Precipitante

Nesta etapa do trabalho, foi desenvolvido um sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes e fluxo intermitente com detecção turbidimétrica, para a determinação de cloridrato de fluoxetina em produtos farmacêuticos. O sistema baseou-se na reação entre o cloreto do cloridrato de fluoxetina e o nitrato de prata (AgNO_3), formando o ($\text{AgCl}_{(s)}$) que foi monitorado turbidimetricamente em 420 nm. A medida que os íons cloreto reagem com os íons $\text{Ag}^+_{(aq)}$, os íons H^+ (H_3O^+) devem continuar na molécula (protonação do amino grupo da fluoxetina). A equação química da reação de precipitação entre o cloridrato de fluoxetina com o nitrato de prata é mostrada a seguir (equação 4.6).



Tipicamente, a formação de precipitado em linha tende a sedimentar na bobina helicoidal e na cela de fluxo, provocando a elevação da linha base. Para eliminar esse acúmulo de precipitado, foi inserido na configuração inicial do sistema, um fluxo intermitente com água desionizada, a uma vazão de $6,3 \text{ mL min}^{-1}$, como fluxo de limpeza. Essa configuração permitiu um aumento na frequência de amostragem de 30 h^{-1} para 60 h^{-1} e uma melhor estabilidade da linha base.

4.4.1. Estudos dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA

Inicialmente, foram estudados os parâmetros químicos do sistema em fluxo para investigar as melhores condições para a formação do $\text{AgCl}_{(s)}$ em linha.

O estudo para a otimização da melhor solução transportadora foi realizado em um sistema FIA com volume das alças da amostra e do reagente de $350 \mu\text{L}$, vazão da solução transportadora de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$, bobina helicoidal de

120 cm e manteve-se a concentração de cloridrato de fluoxetina em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A configuração do sistema em fluxo empregado nessas determinações é mostrada na Figura 3.4.

Foram avaliadas como soluções transportadoras ácido nítrico na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e água desionizada. Os melhores resultados em termos de magnitude do sinal analítico foram obtidos empregando água desionizada, entretanto, os melhores resultados em termos de repetibilidade foram obtidos utilizando-se ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Dessa maneira, selecionou-se o ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ como solução transportadora devido a melhor repetibilidade dos sinais analíticos, para manter a força iônica constante e para evitar a hidrólise do Ag(I) .

A adição de colóides protetores ou surfactantes nas soluções é muitas vezes requerida, pois a presença destes agentes é uma garantia adicional de nucleação uniforme do precipitado, melhorando a repetibilidade e a magnitude dos sinais analíticos. Dessa forma, estudou-se o efeito do polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), Triton X-100 e Agar-Agar nas concentrações de 0,010, 0,030 e 0,050% (m/v) sobre o sinal analítico, estabilidade da linha base e repetibilidade dos sinais transientes. Os melhores resultados em termos de repetibilidade e magnitude dos sinais analíticos foram obtidos utilizando-se Triton X-100 0,030% (v/v). Em virtude desses resultados, selecionou-se o surfactante Triton X-100 na concentração de 0,030% v/v para o preparo da solução transportadora e da amostra.

Estudou-se a influência da concentração do reagente nitrato de prata no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o sinal analítico. Uma maior magnitude de sinal analítico e melhor estabilidade da linha base foram obtidas para a concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ desse reagente de precipitação, sendo selecionada essa concentração. Para concentrações maiores, diminuição pouco acentuada do sinal analítico (tendência à estabilização) e perda da estabilidade da linha base.

4.4.2. Estudos dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA

O efeito da variação dos volumes da amostra e do reagente (Figura 4.28) foi estudado variando-se simultaneamente as alças L1 (amostra) e L2 (reagente). Os volumes das alças foram variados no intervalo de 200 a 500 μL

(comprimentos de 20, 50, 70 e 100 cm), sendo mantida a concentração de cloridrato de fluoxetina em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Neste estudo, observou-se que a magnitude do sinal analítico aumentou até um volume de amostra e reagente injetado de 500 μL . Houve um aumento progressivo do sinal analítico, devido a menor dispersão da zona da amostra com o aumento do volume injetado. Porém, devido a uma melhor repetibilidade dos sinais analíticos e uma maior frequência de amostragem, o volume de 350 μL foi selecionado para continuidade do trabalho.

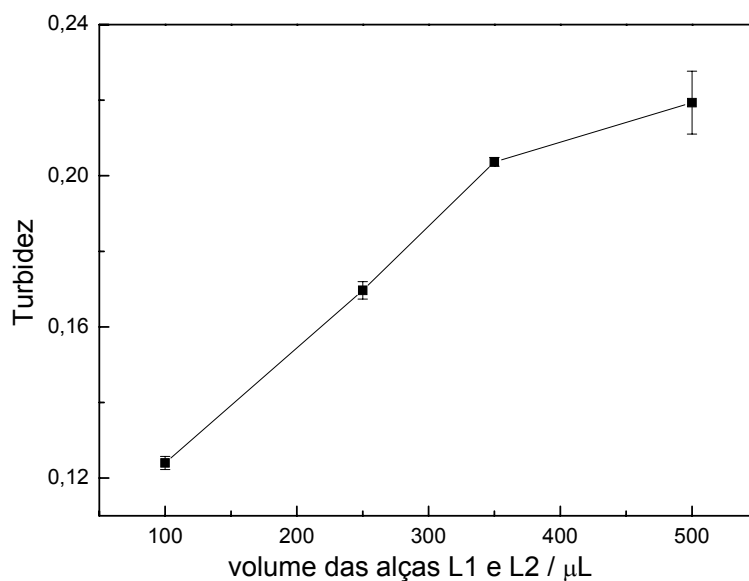


FIGURA 4.28. Estudo do volume das alças L1 (amostra) e L2 (reagente) sobre o sinal analítico para uma concentração de cloridrato de fluoxetina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, concentração de AgNO_3 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

A influência do comprimento da bobina helicoidal (Figura 4.29) sobre o sinal analítico foi avaliada no intervalo de 70 a 120 cm. A magnitude do sinal analítico aumenta até o comprimento de 100 cm, diminuindo para o comprimento da bobina de 120 cm, provavelmente devido ao efeito de dispersão. Como a cinética da reação de formação do precipitado é rápida, a dispersão prevalece e a turbidez diminui. Considerando-se a magnitude do sinal analítico, a bobina helicoidal de 100 cm foi selecionada para dar sequência aos estudos.

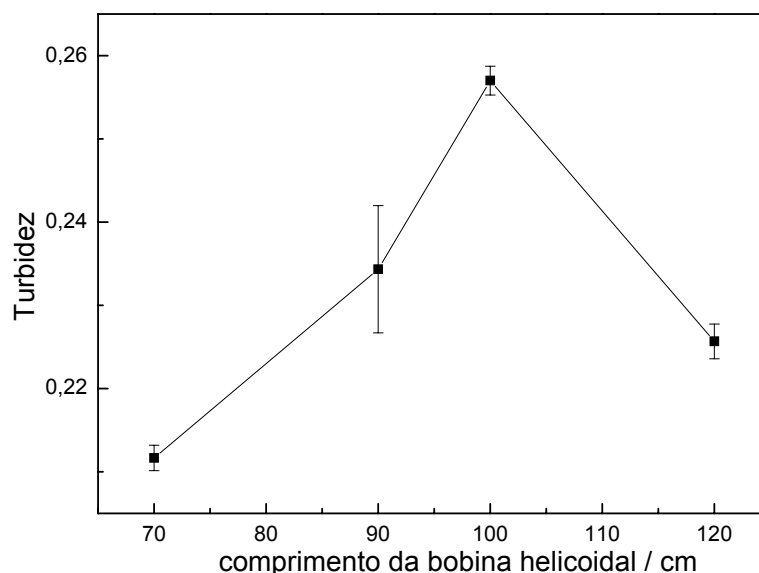


FIGURA 4.29. Efeito do comprimento da bobina helicoidal sobre o sinal analítico para uma concentração de cloridrato de fluoxetina e de AgNO_3 em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e volume da alça da amostra e do reagente de $350 \mu\text{L}$.

A Figura 4.30 mostra o efeito da vazão da solução transportadora (ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em Triton X-100 0,03% (v/v)) sobre o sinal analítico foi estudada no intervalo entre $2,2$ e $4,1 \text{ mL min}^{-1}$. Utilizando-se uma solução de cloridrato de fluoxetina na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, o sinal analítico diminuiu com o aumento da vazão, possivelmente, devido a um menor tempo de residência para a formação do precipitado. Observou-se uma maior magnitude de sinal analítico e melhor estabilidade da linha base empregando-se a menor vazão ($2,2 \text{ mL min}^{-1}$), que foi então selecionada para estudos posteriores.

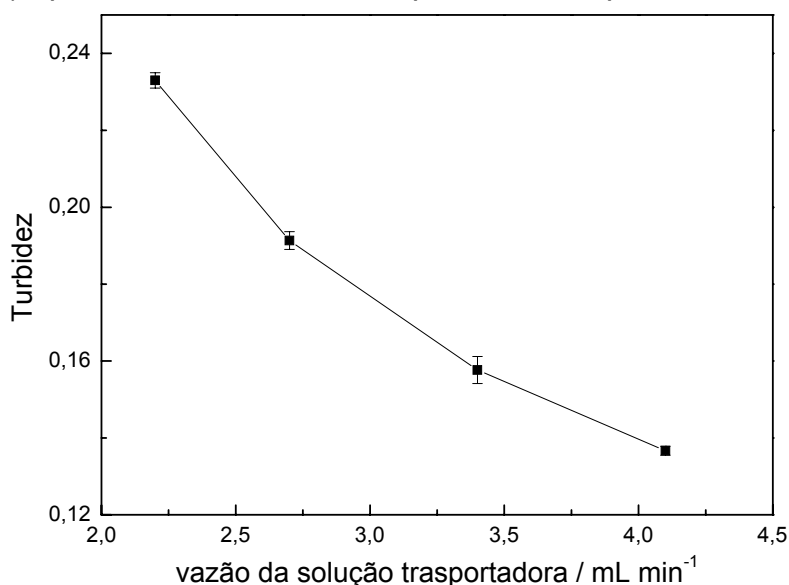


FIGURA 4.30. Estudo da vazão da solução transportadora ácido nítrico sobre o sinal analítico ($n=3$) para uma concentração de cloridrato de fluoxetina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem e do reagente de $350 \mu\text{L}$, bobina helicoidal de 100 cm e fluxo intermitente de água desionizada ($6,3 \text{ mL min}^{-1}$).

A Tabela 4.12 apresenta os parâmetros avaliados e os selecionados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas.

TABELA 4.12. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de cloridrato de fluoxetina empregando o sistema FIA proposto

Parâmetros	Faixa estudada	Selecionado
[AgNO ₃] / 10 ⁻² mol L ⁻¹	0,05 a 5,0	0,1
[HNO ₃] / 10 ⁻² mol L ⁻¹	0,1 a 5,0	1,0
alça da amostra e do reagente / (µL)	100 a 500	350
bobina helicoidal / cm	70 a 120	100
vazão da solução transportadora / mL min ⁻¹	2,2 a 4,1	2,7
surfactantes	PVA [#] , PEG [*] , Triton X-100 e Agar-Agar	Triton X-100

[#]álcool polivinílico; ^{*}polietilenoglicol

4.4.3. Estudo de Interferentes em Potencial

Foram avaliados alguns excipientes normalmente presentes em formulações farmacêuticas que podem interferir na determinação de cloridrato de fluoxetina (Tabela 4.13). As substâncias avaliadas foram: sacarina sódica, metabissulfito de sódio, estearato de magnésio, celulose microcristalina, dióxido de silício, amido e ciclamato de sódio, em várias razões de concentração, sendo o cloridrato de fluoxetina mantido na concentração de $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para este estudo. Alguns destes excipientes são insolúveis e/ou possuem baixa solubilidade. Estearato de magnésio, ciclamato de sódio e amido não causaram interferência na determinação de cloridrato de fluoxetina, mesmo quando presentes em concentrações dez vezes maiores que aquela de fluoxetina. Entretanto, a sacarina sódica apresentou interferência positiva de 7 % quando presente em concentração dez vezes maior que aquela do cloridrato de fluoxetina. A interferência positiva da sacarina se deve a formação do sacarinato de prata, de baixa solubilidade, aumentando assim a turbidez da zona de amostra e, conseqüentemente, a magnitude do sinal analítico. O metabissulfito apresentou interferência negativa de 15 % quando presente na mesma concentração do cloridrato de fluoxetina. Essa interferência ocorre devido ao poder de redução desse concomitante reduzindo a Ag⁺ a Ag⁰, que promove uma diminuição na formação do precipitado de AgCl_(s).

Cabe ressaltar que os teores desses excipientes nos produtos farmacêuticos são inferiores aos investigados nesse estudo.

TABELA 4.13. Efeito dos excipientes como possíveis interferentes em potencial na determinação de cloridrato de fluoxetina.

Excipiente	Razão de concentração* (Excipiente:FX.HCl)	Interferência%
sacarina	1:5	0,5
metabissulfito de sódio	1:5	1,0
estearato de magnésio	10:1	1,0
amido	10:1	0,5
ciclamato de sódio	10:1	1,5

*FX.HCl = [cloridrato de fluoxetina] = $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹

4.4.4. Teste de Recuperação

No teste de recuperação, três concentrações diferentes de cloridrato de fluoxetina, a saber: $1,0 \times 10^{-5}$, $4,0 \times 10^{-5}$ e $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foram adicionadas a cinco amostras comerciais e os resultados comparados com aqueles obtidos com as amostras não adicionadas do padrão. Os valores percentuais apresentados na Tabela 4.14 para duas amostras variaram entre 99,6 e 103 % sugerindo assim ausência significativa de interferência da matriz da amostra.

TABELA 4.14. Estudo de recuperação de cloridrato de fluoxetina em duas formulações farmacêuticas.

Amostras	cloridrato de fluoxetina / 10^{-5} mol L ⁻¹		Recuperado / %
	Adicionado	Encontrado	
A	1,00	1,01 ± 0,02	101
	4,00	4,05 ± 0,03	101
	6,00	5,98 ± 0,05	99,6
B	1,00	1,03 ± 0,01	103
	4,00	4,07 ± 0,03	102
	6,00	6,16 ± 0,02	103

n=3

4.4.5. Estudo da Repetibilidade e Frequência de Amostragem

Estudou-se a repetibilidade do procedimento desenvolvido para concentrações de soluções padrões de cloridrato de fluoxetina de $2,0 \times 10^{-4}$ e $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, obtendo-se desvios padrões relativos de 0,5% e 0,9%, respectivamente (Figura 4.31). A frequência de amostragem foi de 60 determinações por hora.

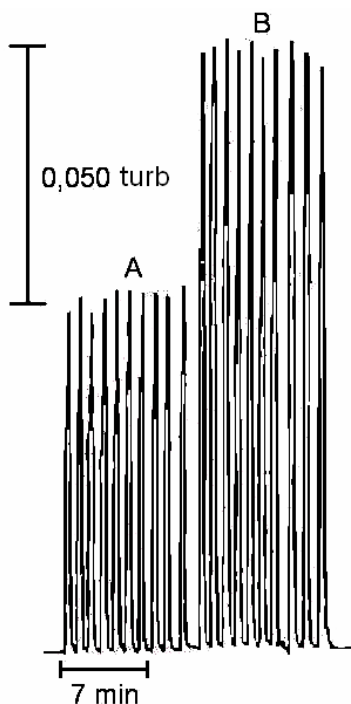


FIGURA 4.31. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de cloridrato de fluoxetina nas concentrações de (A) $2,0 \times 10^{-4}$ e (B) $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. As condições experimentais para a realização desse estudo são apresentadas no item 3.5.3.

4.4.6. Curva Analítica

A curva analítica (Figura 4.32) foi linear no intervalo de concentração de cloridrato de fluoxetina entre $3,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($T = 0,00372 + 387,1 C$; $r = 0,998$ onde T é a turbidez e C a concentração de cloridrato de fluoxetina em mol L⁻¹) e apresentou um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica).

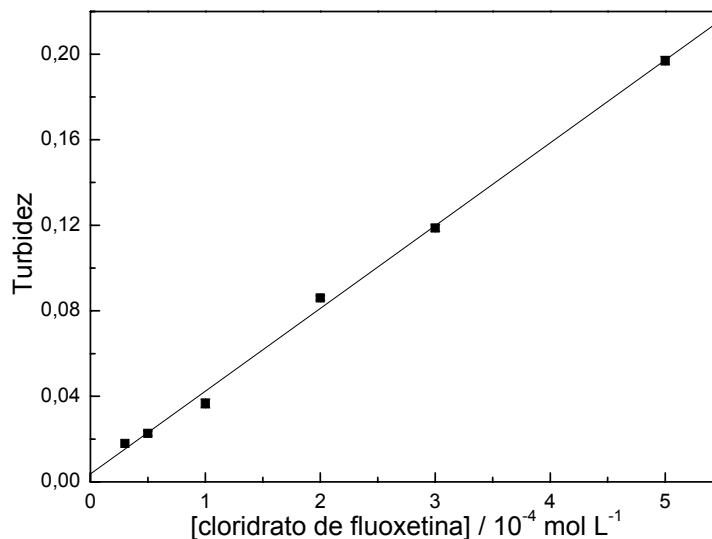


FIGURA 4.32. Curva analítica para determinação de cloridrato de fluoxetina utilizando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto.

Os sinais transientes obtidos em triplicatas ($3,0 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-4}$, $2,0 \times 10^{-4}$, $3,0 \times 10^{-4}$ e $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) das soluções de referência de cloridrato de fluoxetina e das soluções das amostras, são mostrados na Figura 4.33.

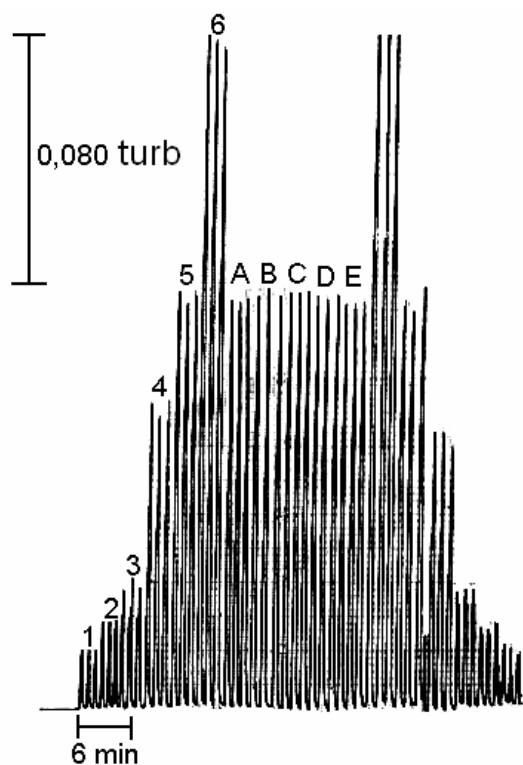


FIGURA 4.33. Sinais transientes em triplicatas das soluções de referência de cloridrato de fluoxetina nas concentrações de (1) $3,0 \times 10^{-5}$, (2) $5,0 \times 10^{-5}$, (3) $1,0 \times 10^{-4}$, (4) $2,0 \times 10^{-4}$, (5) $3,0 \times 10^{-4}$ e (6) $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e das quatro amostras A, B, C e D seguidos das soluções de referência novamente em concentrações decrescentes. As condições do sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.5.3.

4.4.7. Aplicações

O método proposto foi aplicado na determinação de cloridrato de fluoxetina em cinco formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram comparados com um método descrito na Farmacopéia Americana¹²⁴ e são mostrados na Tabela 4.15. O teste-t pareado foi aplicado aos resultados obtidos, resultando em um valor de t calculado de 1,129, menor que o valor de t tabelado (2,776), indicando que o procedimento proposto possui boa exatidão, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos, a um nível de confiança de 95%.

TABELA 4.15. Determinação de cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o método oficial¹²⁴.

Amostras	cloridrato de fluoxetina			Erro	
	Valor	Método	Procedimento	Er ₁ / %	Er ₂ / %
	Rotulado	oficial	Proposto		
A	20,00*	19,60 ± 0,01	19,20 ± 0,03	-2,1	-4,1
B	22,36*	22,20 ± 0,02	23,30 ± 0,01	4,7	4,0
C	22,36**	22,00 ± 0,01	23,00 ± 0,02	4,4	2,8
D	22,36**	22,40 ± 0,03	22,32 ± 0,01	-0,4	-0,2
E	22,40**	21,90 ± 0,02	21,40 ± 0,03	-2,3	-4,7

n=3

* mg mL⁻¹

** mg drágea⁻¹

Er₁ = erro relativo entre o procedimento proposto e o valor rotulado

Er₂ = erro relativo entre o procedimento proposto e o método oficial

As características analíticas do método proposto foram comparadas com aquelas obtidas por outros procedimentos em fluxo para a determinação de cloridrato de fluoxetina. O método proposto possui um limite de detecção menor que aquele obtido no método espectrofotométrico¹²³ e superior aqueles obtidos nos demais métodos^{119,122}. Outrossim, a frequência de amostragem foi igual aquela obtida no método espectrofotométrico¹¹⁹ e foi menor que aquelas obtidas nos demais métodos^{122,123}.

4.5. Determinação de Dipirona em Formulações Farmacêuticas Empregando: Um Sistema de Análise em Fluxo Utilizando um Microssistema Analítico Construído com LTCC e um Sistema FIA com Zonas Coalescentes

A dipirona é um derivado das pirazolonas, classe de compostos caracterizados pela presença de um anel aromático de 5 átomos contendo dois nitrogênios conhecido como pirazolina. A cetoderivação da pirazolina, isto é, 1-fenilpirazolina-5-ona, é a base da molécula de dipirona (Figura 4.34). Substituintes no átomo de carbono na posição 4 determinam as propriedades químicas e farmacológicas específicas de cada composto¹⁶⁵.

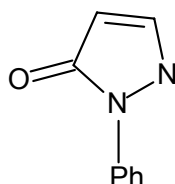


FIGURA 4.34. Estrutura molecular da 1-fenilpirazolina-5-ona.

Nesta parte do trabalho foram desenvolvidos dois sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas utilizando Fe(III) como reagente cromogênio. No primeiro procedimento foi empregado um microssistema analítico construído com LTCC e no segundo foi utilizado um sistema FIA com zonas coalescentes sem o acoplamento do microssistema. Nestes sistemas, sucede a formação em linha de um cromóforo de cor azul a partir da reação entre o Fe(III) e a dipirona em meio ácido.

Inicialmente realizou-se a aquisição do espectro do complexo empregando batelada. Para tal, adicionaram-se 2,0 mL de dipirona $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em uma cubeta de quartzo (1,0 cm de caminho óptico e volume de 4,0 mL), contendo 2,0 mL de uma solução de Fe(III) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de HNO_3 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser observado pela Figura 4.35, com a adição da solução de dipirona na cubeta, prontamente ocorreu a formação de um composto de coloração azul intensa que apresentou um valor de absorvância em torno de 0,6 para o comprimento de onda de 622 nm.

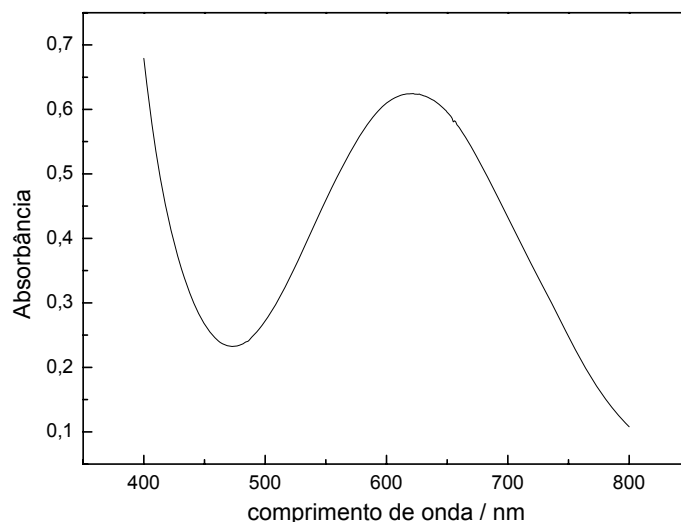


FIGURA 4.35. Espectro de absorção molecular na região do visível do cromóforo gerado na reação entre o Fe(III) e a dipirona

A Figura 4.36 apresenta um gráfico em três dimensões, constituído de 3 eixos: comprimento de onda (nm) na região do visível, tempo (s) e absorbância (Abs). Este gráfico representa o branco, ou seja, sem a adição do analito, tendo somente Fe(III) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ na cubeta.

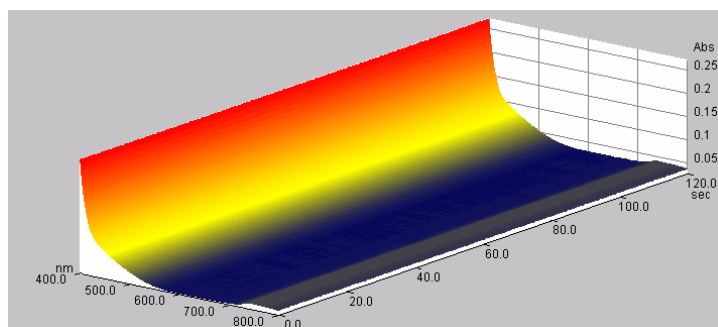


FIGURA 4.36. Espectro de absorção em três dimensões do branco obtido em uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico contendo Fe(III) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 4.37 apresenta o espectro de formação do cromóforo a partir da reação entre o Fe(III) e a dipirona. Como pode ser observado nesta figura, a formação do cromóforo é observado nos primeiros segundos de reação entre a dipirona e Fe(III), com o máximo de absorção verificado em 622 nm, sendo então este comprimento de onda fixado para o desenvolvimento do trabalho. Pode também ser observado, no eixo do tempo reacional, que o cromóforo formado é relativamente instável, tendo um tempo de vida de 40s, nestas condições experimental do trabalho. A instabilidade desse complexo parece ser causada pela fotorredução do complexo dipirona-Fe(III)⁹⁴. Entretanto, esta fotorredução pode ser

evitada pela adição de um agente quelante (e.g. EDTA) para mascarar o excesso de íons férrico após o aparecimento do cromóforo azul.

No entanto, empregando sistema de análise por injeção em fluxo, é possível o monitoramento de compostos instáveis, visto que é possível detectar a concentração do cromóforo formado no máximo de sua absorção sem perda de sensibilidade (inclinação da curva analítica), com boa precisão, exatidão e repetibilidade. Para isto, é necessário que algum dos parâmetros da configuração do sistema FIA sejam ajustados como tamanho da bobina reacional reduzida e/ou vazão da solução transportadora alta, além de temperatura, emprego de estabilizadores etc.

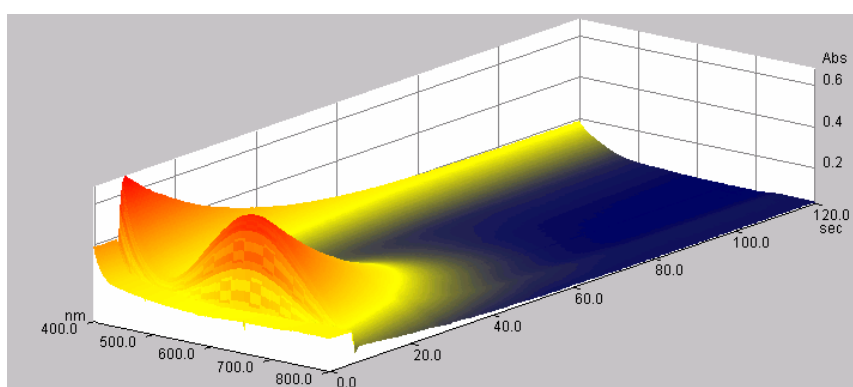


FIGURA 4.37. Espectro de absorção em três dimensões do cromóforo gerado a partir da reação da dipirona $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com Fe(III) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

4.5.1. Estudo dos Parâmetros Químicos do Sistema FIA Empregando o Microsistema Analítico

Inicialmente, foram estudados os parâmetros químicos do sistema em fluxo para investigar as melhores condições para a reação de formação do complexo entre a dipirona e o ferro(III) empregando o microsistema.

O estudo para a otimização da melhor solução transportadora foi realizado em um sistema FIA com volume das alças da amostra e do reagente de $200 \mu\text{L}$, vazão total da solução transportadora $5,6 \text{ mL min}^{-1}$, concentração de Fe(III) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, e manteve-se uma concentração de dipirona fixa em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Foram testadas soluções transportadoras que influenciassem positivamente na obtenção de melhores sinais de absorbância. Devido a isso, não

foram estudadas soluções alcalinas, pois produzem complexos de ferro(III) e também $\text{Fe}(\text{OH})_{3(s)}$ e óxidos. Por outro lado, tampão acetato poderia levar a formação de complexos de Fe(III) com o ânion acetato, $\text{Fe}_3(\text{OH})_2(\text{CH}_3\text{COO})_6$ e, o tampão fosfato, causaria a precipitação do sal insolúvel de Fe(III), $\text{FePO}_{4(s)}$. Assim, foram investigadas os seguintes transportadores: ácido nítrico e água desionizada. O ácido nítrico foi avaliado na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} . Não houve nenhuma influência no sinal analítico empregando ácido nítrico como solução transportadora em relação aos sinais obtidos com água desionizada, porém, para manter a força iônica constante e evitar a hidrólise dos íons Fe(III), selecionou-se a concentração de ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} para a continuidade do trabalho.

O efeito da concentração de Fe(III) foi investigado no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} a $7,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} (Figura 4.38). No estudo da concentração desse reagente empregando o micro sistema, verificou-se que a absorvância aumentou até a concentração de $5,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} , mas como esse aumento foi de apenas 7% em relação à absorvância obtida com a concentração de $3,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} , selecionou-se a concentração de Fe(III) $3,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} para os estudos posteriores.

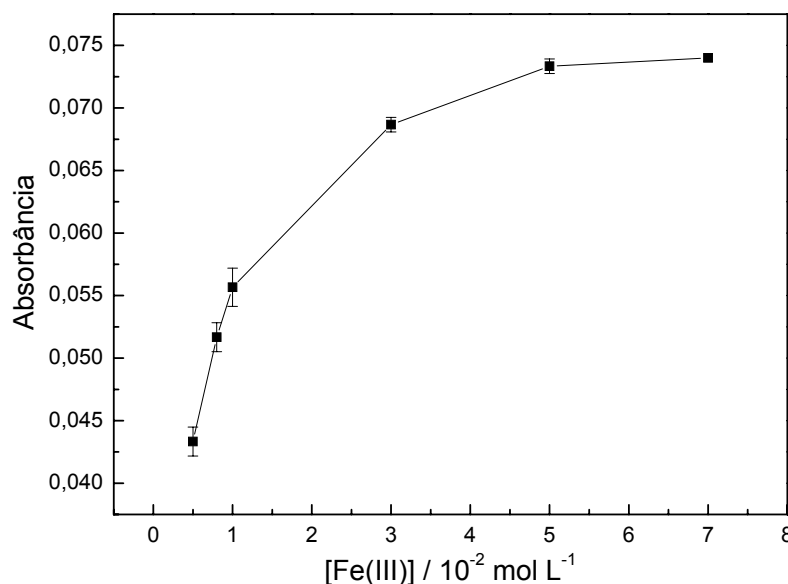


FIGURA 4.38. Efeito da concentração de Fe(III) sobre o sinal analítico para uma concentração de dipirona $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , vazão da solução transportadora $5,6 \text{ mL min}^{-1}$ e volume da alça e do reagente de $200 \mu\text{L}$.

4.5.2. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA Empregando o Microssistema Analítico

O efeito da vazão total da solução transportadora (ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) foi avaliado entre $1,5$ e 13 mL min^{-1} . Empregando uma concentração de dipirona $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, verificou-se que o sinal analítico a partir da vazão de $5,6 \text{ mL min}^{-1}$ permaneceu praticamente constante. Entretanto, foi selecionada a vazão de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$ para a continuidade do trabalho, pois empregando essa vazão uma frequência de amostragem maior foi obtida em relação a vazão de $5,6 \text{ mL min}^{-1}$. Ademais, como a solução transportadora selecionada foi ácido nítrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ não haveria problema com a quantidade de resíduo químico gerado.

O efeito da variação dos volumes da amostra e do reagente foi estudado variando-se simultaneamente as alças L1 (amostra) e L2 (reagente). Os volumes das alças foram variados no intervalo de 200 a $500 \mu\text{L}$, sendo mantida a concentração de dipirona em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Como mostrada na Figura 4.39, a magnitude do sinal analítico aumentou até um volume de amostra e reagente injetado de $300 \mu\text{L}$, permanecendo constante para volumes maiores. Como o sinal de absorvância para o volume de $300 \mu\text{L}$ foi somente 7% maior que o volume de $200 \mu\text{L}$, foi selecionado o volume de $200 \mu\text{L}$ para reduzir o consumo de reagente uma vez que este estava na concentração de $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

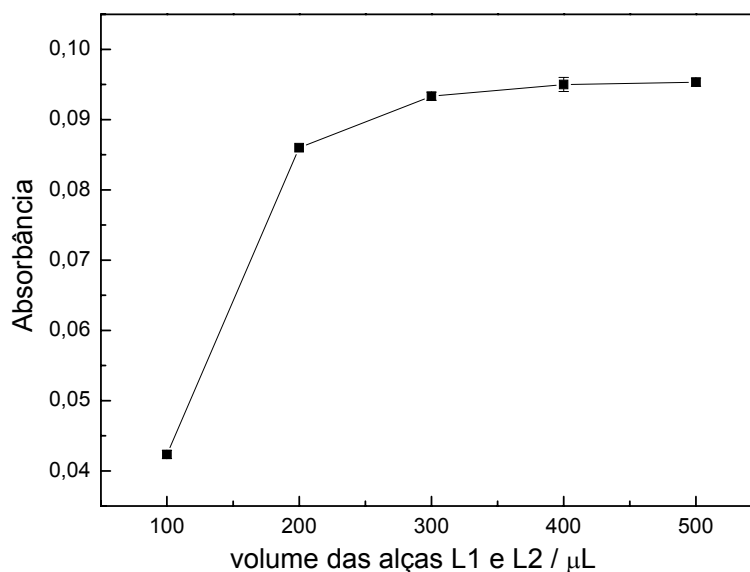


FIGURA 4.39. Estudo do volume das alças L1 (amostra) e L2 (reagente) sobre o sinal analítico para uma concentração de dipirona $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de Fe(III) $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e vazão da solução transportadora $11,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Para a comparação dos resultados obtidos empregando o microssistema analítico, foi desenvolvido um sistema FIA com zonas coalescentes como detalhadamente descrito no item 3.7.3. A Tabela 4.16 apresenta os parâmetros químicos e físicos avaliados e selecionados empregando os dois procedimentos desenvolvidos.

TABELA 4.16. Parâmetros físicos e químicos estudados e selecionados empregando o microssistema acoplado ao sistema FIA e o sistema FIA com zonas coalescentes

Parâmetros	Faixa estudada	Microssistema acoplado ao sistema FIA	Sistema FIA com zonas coalescentes
Fe(III) / mol L ⁻¹	5,0 × 10 ⁻³ a 7,0 × 10 ⁻²	3,0 × 10 ⁻²	1,0 × 10 ⁻²
Volume da alça da amostra e do reagente / µL	200 a 500	200	300
Vazão da solução transportadora / mL min ⁻¹	1,5 a 13,0	11,5	4,0
Bobina helicoidal / cm	20 a 100	*	50

* canais de comprimento fixos dentro do microssistema

4.5.3. Estudos de Interferentes em Potencial e Testes de Recuperação Empregando o Microssistema Analítico e o Sistema FIA com Zonas Coalescentes

O efeito de interferentes em potencial na determinação de dipirona em formulações farmacêuticas foi avaliado para excipientes normalmente presentes em

amostras comerciais. Nestes experimentos, foram utilizadas soluções de referência de dipirona $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com cada um dos possíveis interferentes (sorbitol, cloreto de sódio, sacarina, glicerina, frutose, sacarose, lactose, monofosfato de sódio e bissulfito de sódio) em concentrações de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Nenhuma das substâncias investigadas causou qualquer interferência na determinação de dipirona com exceção do metabissulfito encontrado concomitantemente em algumas das amostras comerciais, que causou uma interferência negativa da ordem de 30% sobre o sinal analítico, mesmo em concentração 10 vezes menor que a concentração de dipirona. Esta interferência deve-se ao fato do metabissulfito ser um ótimo agente redutor, reduzindo Fe(III) para Fe(II), mas como o teor de bissulfito é bem menor que o teor de dipirona, amostras contendo este composto associado puderam ser analisadas sem problemas.

Nos testes de recuperação do analito, três concentrações diferentes de dipirona foram adicionadas a três amostras de formulações farmacêuticas e os resultados comparados com aqueles obtidos com as amostras não adicionadas do padrão. Os valores percentuais de recuperação variaram entre 97,0 e 104 %, sugerindo ausência de interferência significativa da matriz na determinação de dipirona nessas amostras, empregando os procedimentos propostos.

4.5.4. Estudo da Repetibilidade dos Sinais Analíticos e Frequência de Amostragem

Estudou-se a repetibilidade do procedimento desenvolvido empregando o microssistema acoplado ao sistema FIA (Figura 4.40) nas concentrações de $5,0 \times 10^{-4}$ e $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo-se desvios padrão relativos menores que 0,5%.

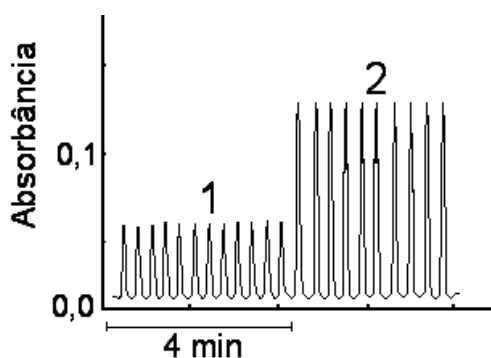


FIGURA 4.40. Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos empregando o microssistema analítico para soluções de referência de dipirona nas concentrações de (1) $5,0 \times 10^{-4}$ e (2) $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As condições do sistema FIA empregado para a realização desse estudo são apresentadas no item 3.7.

Empregando o sistema FIA com zonas coalescentes, obteve-se desvios padrões relativos menores que 0,8% no estudo da repetibilidade dos sinais analíticos para concentrações de dipirona $1,0 \times 10^{-4}$ e $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Figura 4.41)

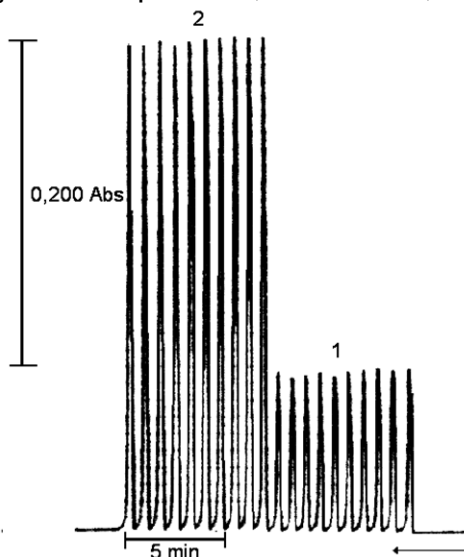


FIGURA 4.41. Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos empregando o sistema FIA com zonas coalescentes para soluções de referência de dipirona nas concentrações de (1) $1,0 \times 10^{-4}$ e (2) $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A seta indica a direção em que os sinais transientes foram obtidos. As condições do sistema FIA empregado para a realização desse estudo são apresentadas no item 3.6.3.

A frequência de amostragem para a determinação de dipirona empregando o microsistema acoplado ao sistema FIA e o sistema FIA com zonas coalescentes foram de 150 e 70 h⁻¹, respectivamente.

4.5.5. Curva Analítica

Para o sistema FIA no qual foi acoplado o microsistema, a curva analítica foi linear no intervalo de concentração de dipirona entre $1,0 \times 10^{-4}$ e $3,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ ($A = 0,00907 + 91,69 C$; $r = 0,999$ onde A é a absorvância e C a concentração de dipirona em mol L⁻¹) e para o sistema FIA com zonas coalescentes a curva de calibração foi linear na região de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($A = 0,01068 + 904,23 C$; $r = 0,999$ onde A é a absorvância e C a concentração de dipirona em mol L⁻¹). Os limites de detecção (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica) obtidos para o sistema FIA empregando o microsistema e o sistema FIA com zonas coalescentes foram de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $2,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente.

As Figuras 4.42 e 4.43 apresentam as curvas analíticas obtidas empregando o microsistema analítico construído com LTCC acoplado ao sistema FIA e o sistema FIA com zonas coalescentes, respectivamente.

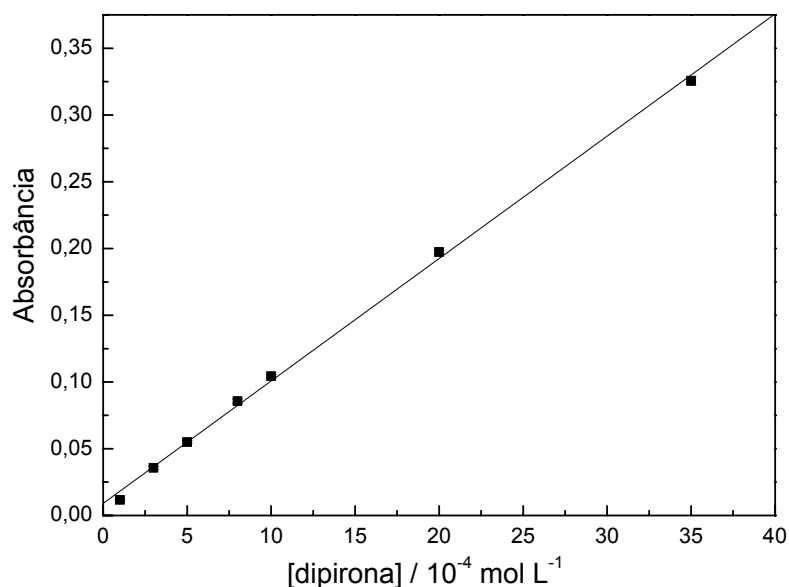


FIGURA 4.42. Curva analítica para a determinação de dipirona utilizando o sistema FIA empregando o microsistema analítico construído com LTCC.

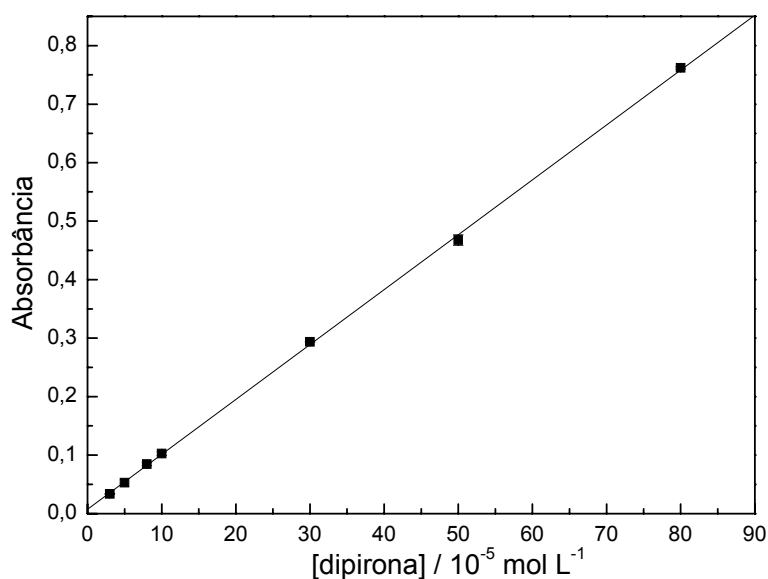


FIGURA 4.43. Curva analítica para a determinação de dipirona utilizando o sistema FIA com zonas coalescentes.

Os procedimentos desenvolvidos foram aplicados na determinação de dipirona em formulações farmacêuticas. Os sinais transientes obtidos em triplicatas das soluções de referência de dipirona e triplicatas das soluções das amostras estão apresentados nas Figuras 4.44 (empregando o microsistema) e 4.45 (empregando o sistema FIA com zonas coalescentes).

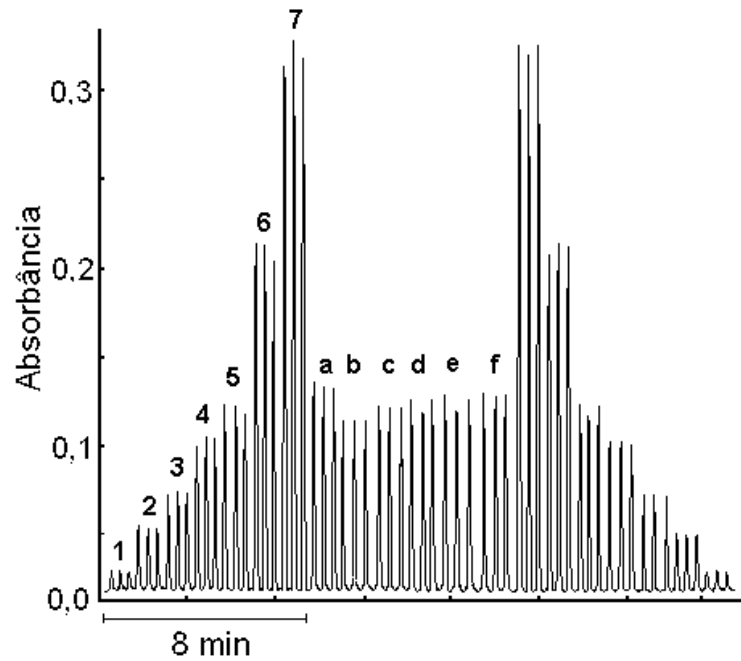


FIGURA 4.44. Sinais transientes obtidos (empregando o microsistema) em triplicatas das soluções de referência de dipirona nas concentrações de (1) $1,0 \times 10^{-4}$, (2) $3,0 \times 10^{-4}$, (3) $5,0 \times 10^{-4}$, (4) $8,0 \times 10^{-4}$, (5) $1,0 \times 10^{-3}$, (6) $2,0 \times 10^{-3}$ e (7) $3,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e das seis amostras A, B, C, D, E e F seguidos das soluções de referência novamente em concentrações decrescentes.

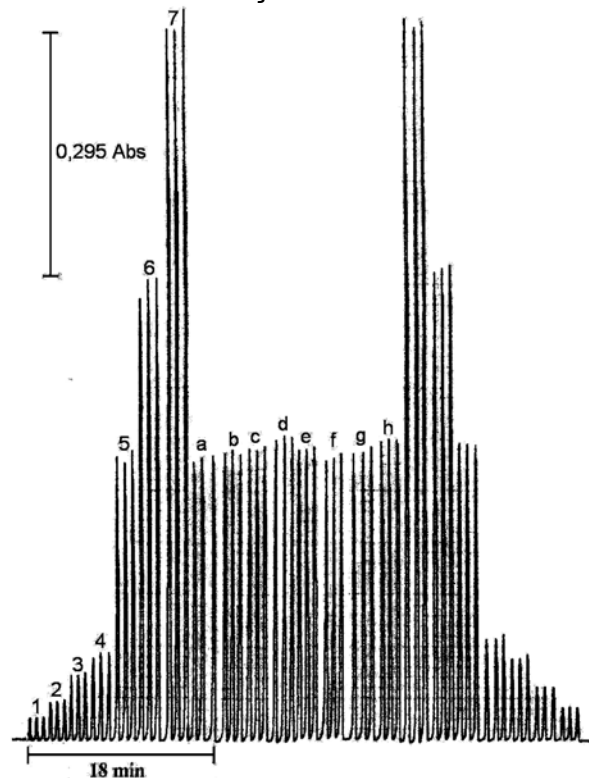


FIGURA 4.45. Sinais transientes obtidos empregando o sistema FIA com zonas coalescentes em triplicatas das soluções de referência de dipirona nas concentrações de (1) $1,0 \times 10^{-5}$, (2) $3,0 \times 10^{-5}$, (3) $5,0 \times 10^{-5}$, (4) $8,0 \times 10^{-5}$, (5) $1,0 \times 10^{-4}$, (6) $3,0 \times 10^{-4}$ (7) $5,0 \times 10^{-4}$ e (8) $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e das oito amostras A, B, C, D, E, F, G e H seguidos das soluções de referência novamente em concentrações decrescentes.

4.5.6. Aplicações

O método proposto foi aplicado na determinação de dipirona em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos utilizando o método descrito na Farmacopéia Brasileira¹⁰⁸ para a quantificação dipirona. O teste-t pareado foi aplicado aos resultados obtidos empregando ambos os métodos, resultando em um valor de t calculado de 0,510, menor que o valor de t tabelado (2,571) para os resultados obtidos empregando o microssistema e os resultados obtidos empregando o sistema com zonas coalescentes o valor de t calculado foi de 0,468, menor que o valor de t tabelado (2,365), indicando que os procedimentos propostos possuem boa exatidão, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos, a um nível de confiança de 95%. Os resultados obtidos empregando o microssistema acoplado ao sistema FIA e o sistema FIA com zonas coalescentes são mostrados nas Tabelas 4.17 e 4.18, respectivamente.

TABELA 4.17. Determinação de dipirona em formulações farmacêuticas empregando o microssistema acoplado ao sistema FIA e o método oficial¹⁰⁸.

Amostras	Dipirona			Erro relativo/%	
	Rotulado	Método Oficial	Procedimento Proposto	Er ₁	Er ₂
A	500*	503,2 ± 0,6	520,2 ± 0,4	3,9	3,3
B	500*	489,2 ± 0,4	481,1 ± 0,3	-3,9	-1,7
C	500*	494,6 ± 0,4	501,5 ± 0,4	0,3	1,4
D	500*	509,1 ± 0,3	504,6 ± 0,3	0,9	-0,9
E	500**	504,3 ± 0,4	510,2 ± 0,7	2,0	1,2
F	500**	510,5 ± 0,1	514,2 ± 0,4	2,8	0,7

n=3

Er₁ = erro relativo entre o procedimento proposto e o valor rotulado

Er₂ = erro relativo entre o procedimento proposto e o método oficial

* mg mL⁻¹

** mg comprimido

TABELA 4.18. Determinação de dipirona em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA com zonas coalescentes e o método oficial¹⁰⁸.

Amostras	Rotulado	Dipirona		Erro relativo/%	
		Método Oficial	Procedimento Proposto	Er ₁	Er ₂
A	500*	516,3 ± 0,6	520,2 ± 0,4	3,9	0,8
B	500*	483,5 ± 0,5	485,0 ± 0,3	-3,1	0,3
C	500*	489,6 ± 0,4	490,2 ± 0,4	-2,0	0,1
D	500*	507,7 ± 0,5	520,6 ± 0,3	4,0	2,5
E	500**	491,3 ± 0,4	483,6 ± 0,5	-3,4	-1,6
F	500**	478,7 ± 0,1	480,8 ± 0,4	-4,0	0,4
G	50*	48,65 ± 0,3	48,45 ± 0,4	-3,2	-0,4
H	300**	303,5 ± 0,3	312,0 ± 0,1	3,9	2,7

n=3

Er₁ = erro relativo entre o procedimento proposto e o valor rotuladoEr₂ = erro relativo entre o procedimento proposto e o método oficial* mg mL⁻¹** mg comprimido⁻¹

O procedimento empregando o microssistema analítico construído com LTCC apresentou uma maior frequência de amostragem em relação aos procedimentos em fluxo relatados na literatura^{97,99,102,104} e mesmo com um caminho óptico reduzido, um melhor limite de detecção em relação a alguns artigos previamente publicados^{99,102} dedicados para a determinação de dipirona foi obtido.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

5.1. Considerações Finais

Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a viabilidade do uso de sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de N-acetilcisteína, captopril, dipirona e cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas.

Todos os procedimentos propostos apresentaram resultados satisfatórios quando comparados com um método oficial ou com métodos descritos na literatura, e sendo necessário pouco o pré-tratamento das amostras comerciais analisadas.

O tempo de vida, a facilidade de preparação e substituição dos reatores e o baixo consumo de reagente justificaram o emprego de RFS nos sistemas em fluxo desenvolvidos.

O sistema FIA com geração de azul da Prússia em linha mostrou ser aplicável nas determinações de N-acetilcisteína e captopril e também foi estendido para a determinação de paracetamol, tornando-se então de fato um sistema polivalente, e que pode ser empregado em laboratórios com demanda de amostras diversificadas.

O sistema turbidimétrico para a determinação de fluoxetina é o sistema FIA mais simples quando comparado com os sistemas propostos na literatura para a determinação desse fármaco em amostras comerciais.

O emprego de μ -TAS construídos com LTCC para a determinação de dipirona, serviu como uma poderosa ferramenta para o monitoramento desse analito devido à alta frequência de amostragem e a portabilidade, além de ser uma tecnologia inovadora, já que não existe nenhum trabalho na literatura para determinação de analitos de interesse farmacêutico empregando LTCC. Ademais, atualmente são poucas as universidades brasileiras que vem desenvolvendo sistemas miniaturizados para fins analíticos e somente um grupo da USP tem duas publicações empregando LTCC e até o momento existem somente quatro publicações para a determinação de analitos diversos utilizando LTCC descritos na literatura.

O uso de um *LED* juntamente com o sistema miniaturizado, foi uma alternativa aos monocromadores, pois o *LED* é o meio mais eficiente de produção de luz praticamente monocromática, são de baixo custo, além de possuir grande

estabilidade e serem de pequeno porte, o que facilitou o acoplamento destes no microssistema.

A Tabela 5.1 apresenta uma sinopse das figuras de mérito obtidas nos sistemas em fluxo desenvolvidos nesse trabalho de doutorado.

TABELA 5.1. Sinopse das figuras de mérito obtidas nos procedimentos em fluxo propostos.

	linearidade / mol L ⁻¹	LD / mol L ⁻¹	freq. amost. / h ⁻¹
N-acetilcisteína / RFS	$3,0 \times 10^{-5}$ a $1,5 \times 10^{-4}$	$8,0 \times 10^{-6}$	60
captopril / RFS	$1,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$	$8,0 \times 10^{-6}$	70
N-acetilcisteína / A.P.	$3,0 \times 10^{-5}$ a $2,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-5}$	60
captopril / A.P.	$5,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-5}$	60
dipirona / FIA zonas coalescentes	$1,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-6}$	70
dipirona / LTCC	$1,0 \times 10^{-4}$ a $3,5 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-5}$	150
cloridrato de fluoxetina	$3,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$	60

A.P. = Azul da Prússia

Todos os resíduos gerados durante os experimentos foram armazenados, catalogados e enviados para a Unidade de Gestão de Resíduos da UFSCar.

CAPÍTULO 6 – ATIVIDADES FUTURAS

CAPÍTULO 6 – ATIVIDADES FUTURAS

Durante e após o desenvolvimento desse trabalho, surgiram algumas idéias de novos sistemas de análise por injeção em fluxo que podem ser desenvolvidos.

A utilização de resina poliuretana de origem vegetal para imobilização de reagentes para a construção de RFS apresenta grandes vantagens em relação à resina poliéster como: redução de riscos ao meio ambiente, redução de custo e dependência tecnológica, é produzida no Brasil (Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros (GQATP) – USP – São Carlos) e resistência a alguns solventes orgânicos. Cabe destacar que ainda não existe nenhum trabalho publicado utilizando resina poliuretana para construção de RFS.

O acoplamento de RFS em sistema em fluxo para superar algumas limitações dos microssistemas como a baixa sensibilidade que, no caso da detecção espectrofotométrica, se deve ao caminho óptico reduzido, pode ser explorado. Como a análise em fluxo é um processo caracterizado pela introdução e pré-tratamento de amostras em linha, esse problema, por exemplo, poderia ser resolvido incluindo-se um RFS no módulo de análise do sistema FIA para a pré-concentração dos analitos.

Uma ampla possibilidade de procedimentos analíticos pode ser desenvolvida utilizando LTCC para a determinação de analitos diversos. Como exemplo, a incorporação de pastas resitoras nos canais dos microssistemas durante a sua construção, para que reações químicas que necessitem ser catalisadas por aquecimento possam ser implementadas.

O acoplamento do microssistema analítico construído com LTCC em um espectrofotômetro *home-made* e o uso de micro-bombas poderia transformar o procedimento proposto para a determinação de dipirona em um sistema em fluxo realmente miniaturizado, uma vez que, o sistema em fluxo proposto nesta tese é híbrido, com uma parte miniaturizada (microssistema construído com LTCC) e outra parte não miniaturizada como, por exemplo, a bomba peristáltica e o computador acoplado para a aquisição dos sinais analíticos gerados.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VALCÁRCEL, M. "Analytical-today's definition and interpretation". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **343**: 814, 1992.
2. VALCÁRCEL, M. & LUQUE DE CASTRO, M. D. *Flow-Injection Analysis: Principles and Applications*. 1a ed. New York, John Willey & Sons, 1987.
3. RILEY, C. & ROCKS, B. "Flow-injection analysis: a new approach to quantitative measurements in clinical chemistry". *Clinic. Chem.*, **28**: 409-421, 1982.
4. MARTÍNEZ-CALATAYUD, J. M. *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals - Automation in the Laboratory*. 1a ed. New York, Taylor & Francis, 1996.
5. USP, *United states pharmacopeial XXII*, Rockville, MD: U.S Pharmacopeial Convention, 1990.
6. RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. "Flow injection analysis and its early history". *Talanta*, **29**:157, 1982.
7. RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. "Flow injection analysis 1. New concept of fast continuous-flow analysis". *Anal. Chim. Acta*, **78**:145, 1975.
8. RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. *Flow injection analysis. Chemical Analysis*. New York, Vol. 62. John Wiley & Sons, 1988.
9. ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C. & COLLINS, C. H. "Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (recomendações - IUPAC 1994)". *Quim. Nova*, **22**(1): 143-146, 1999.
10. TERRI, S. C. *A Gas Chromatography System Fabricated on a Silicon Wafer Using Integrated Circuit Technology*. Stanford, Department of Electrical Engineering. Tese de doutorado, Stanford University, 1975.
11. TERRY, S. C.; JERMAN, J. H. & ANGEL, J. B. "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer". *IEEE Trans. Electron. Devices*, **26**(12): 1880-1886, 1979.
12. MANZ, A.; GRABER, N. & WIDMER, H. M. "Miniaturized total chemical analysis system: a novel concept for chemical sensing". *Sens. Act. B*, **1**: 244-248, 1990
13. MANZ, A.; MIYAHARA, Y.; MIURA, J.; WATANABE, Y.; MIYAGI, H. & SATO, K. "Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology". *Sens. Act. B*, **1**: 249-255, 1990.

14. COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; CARRILHO, E.; JESUS, D. P.; SILVA, J. A. F.; SILVA, H. D. T. & LAGO, C. L. "Microsistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações". *Quim. Nova*, **30**(8): 1986-2000, 2007.
15. VILKNER, T.; JANASEK, D. & MANZ, A. "Micro total analysis systems. Recent developments". *Anal. Chem.*, **76**(12): 3373-3386, 2004.
16. DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K. & MANZ, A. "Micro total analysis systems. Latest advancements and trends". *Anal. Chem.*, **78**(12): 3887-3908, 2006.
17. REYES, D.R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P.A. & MANZ, A. "Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory and technology". *Anal. Chem.*, **74**(12): 2623-2636, 2002.
18. AUROUX, P.A.; IOSSIFIDIS, D.; REIS, D.R. & MANZ, A. "Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications". *Anal. Chem.*, **74**(12): 2637-2652, 2002.
19. IBÁÑEZ-GARCÍA, N.; GONÇALVES, R. D. M.; ROCHA, Z. M.; GONGORA-RUBIO, M. R.; SEABRA, A. C. & ALONSO, J. "LTCC meso-analytical system for chloride ion determination in drinking waters". *Sens. Act. B*, **118**: 67-72, 2006.
20. IBÁÑEZ-GARCÍA, N.; PUYOL, M.; AZEVEDO, C. M.; MARTÍNEZ-CISNEROS, C. S.; VILLUENDAS, F.; GONGORA-RUBIO, M. R.; SEABRA, A. C. & ALONSO, J. "Vortex configuration flow cell based on low temperature cofired ceramics as a compact chemiluminescence microsystem". *Anal. Chem.*, **80**(14): 5320-5324, 2008.
21. LLOPIS, XAVIER.; IBÁÑEZ-GARCÍA, N.; ALEGRET, S. & ALONSO, J. "Pesticide determination by enzymatic inhibition and amperometric detection in a low temperature cofired ceramics microsystem". *Anal. Chem.*, **79**(10): 3662-3666, 2007.
22. IBÁÑEZ-GARCÍA, N.; MERCARDER, M. B.; ROCHA, Z. M.; SEABRA, A. C.; GONGORA-RUBIO, M. R. & ALONSO, J. "Continuous flow analytical microsystems based on low-temperature co-fired ceramic technology. integrated potentiometric detection based on solvent polymeric ion-selective electrodes". *Anal. Chem.*, **78**(9): 2985-2992, 2006.
23. IBÁÑEZ-GARCÍA, N.; MARTÍNEZ-CISNEROS, C. S.; VÁLDES, F. & ALONSO, J. "Green-tape ceramics. New technological approach for integrating

- electronics and fluidics in microsystems". *Trends Anal. Chem.*, **27**(1): 24-33, 2008.
24. GONGORA-RUBIO, M. R.; ESPINOZA-VALLEJOS, P.; SOLA-LAGUNA, L. & SANTIAGO-AVILÉS, J. J. "Overview of low temperature co-fired ceramics tape technology for meso-system technology (MsST)". *Sens. Act. A*, **89**: 222-241, 2001.
25. Conselho Federal de Farmácia. *Legislação Farmacêutica e Sanitária – Preceitos Básicos*. Brasília, Imprensa Nacional, 1980.
26. *Farmacopéia Brasileira*. 3a ed. São Paulo, Organização Andrei Editora, 1977.
27. Ministério da Saúde – Secretária de Vigilância Sanitária. Boas Práticas para a Fabricação de Produtos Farmacêuticos. Brasília, Companhia Brasileira de Artes Gráficas, 1994, Cap. 1 e 3.
28. SANTORO, M. I. R. M. *Introdução ao Controle de Qualidade de Medicamentos*. São Paulo, Editora Atheneu, 1988, Cap. 1.
29. <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=239> – visitado em 22/01/2009.
30. <http://www.abpi.org.br/textoapoio/pdf/CPAlteraRDC333.pdf> - visitado em 22/01/2009.
31. SILVA, P. *Farmacologia*; 4a ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1994. p. 715.
32. de VRIES, N. & De FLORA, S. "N-Acetyl-L-Cysteine". *J. Cell. Biochem.*, **17**: 270-277, 1993.
33. WIKLUND, O.; FAGER, G. & ANDERSSON, A. "N-acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels". *Atherosclerosis*, **119**(1): 99-106, 1996.
34. de FLORA, S.; ROSSI, G. A. & De FLORA, A. "Metabolic, desmutagenic and anticarcinogenic effects of N-acetylcysteine". *Respiration*, **50**: 43, 1986.
35. JACKSON, I. M.; BARNES, J. & COOKSEY, P. "Efficacy and tolerability of oral acetylcysteine(Fabrol) in chronic bronchitis: a double-blind placebo controlled study". *J. Int. Med. Res*, **12**(3):198-206, 1984.
36. BORGSTROM, L.; KAGEDAI, B. & PAULSEN, O. "Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man". *Eur. J. Clin. Pharmacol*, **31**(2): 217-222, 1986.
37. SUAREZ, W. T.; VIEIRA, H. J. & FATIBELLO-FILHO, O. "Generation and destruction of unstable reagent in flow injection system: determination of

- acetylcysteine in pharmaceutical formulations". *J. Pharm. Biom Anal.*, **37**(4): 771-775, 2005.
38. RAGGI, M. A.; CAVRINI, V. & DIPIETRA, A. M. "Colorimetric determination of N-acetylcysteine, penicillamine, and mercaptopropionylglycine in pharmaceutical dosage forms". *J. Pharm Sci.*, **71**(12): 1384-1386, 1982.
39. SÀNCHEZ-PEDREÑO, C.; ALBERO, M. I.; GARCÍA, M. S. & RODENAS, V. "Determination of N-acetylcysteine in pharmaceutical samples by flow injection". *Analyst*, **117**(5): 925-926, 1992.
40. ALVAREZ-COQUE, M. C. G.; HERNANDEZ, M. J. M.; CAMANAS, R. M. V. & FERNANDEZ, C. M. "Spectrophotometric determination of N-acetylcysteine in drug formulations with o-phthalaldehyde and isoleucine". *Analyst*, **114**(8): 975-979, 1989.
41. HERNANDEZ, M. J. M.; ALVAREZ-COQUE, M. C. G.; DOMINGO, E. B. & CAMANAS, R. M. V., "FIA-spectrophotometric assay of N-acetylcysteine by ortho-phthalaldehyde derivatization". *Pharmazie*, **45**(10): 745-747, 1990.
42. FORNAZARI, A. L. D. T.; SUAREZ, W. T.; VIEIRA, H. J. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection spectrophotometric system for N-acetyl-L-cysteine determination in pharmaceuticals". *Acta Chim. Slov.*, **52**(2): 164-167, 2005.
43. VIEIRA, H. J. & FATIBELLO-FILHO, O. "Determinação indireta de N-acetil-L-cisteína por injeção em fluxo empregando Ce(IV) e ferroína". *Quim. Nova*, **28**(5): 797-800, 2005.
44. ABU-EID, M. "Spectrophotometric determination of cysteine and N-acetylcysteine in pharmaceutical preparations". *Mikrochim. Acta*, **129**(1-2): 91-95, 1988.
45. LENARCZUK, T.; ROSZCZYK, I. & KONCKI, R. "Quick cuvette test for thiol compounds". *Anal. Lett.*, **33**(1): 137-144, 2000.
46. KOLAR, M. & DOBCNIK, D. "Chemically prepared silver electrode for determination of N-acetyl-L-cysteine by flow injection potentiometry". *Pharmazie*, **58**(1): 25-28, 2003.
47. SHAHROKHIAN, S.; KAMALZADEH, Z.; BEZAATPOUR, A. & BOGHAEI, D. M. "Differential pulse voltammetric determination of N-acetylcysteine by the electrocatalytic oxidation at the surface of carbon nanotube-paste electrode modified with cobalt salophen complexes". *Sens. Act. B*, **133**(2): 599-606, 2008.

48. BANICA, F. G.; MOREIRA, J. C. & FOGG, A. G. "Application of catalytic stripping voltammetry for the determination of organic sulfur-compounds at a hanging mercury drop electrode – behavior of cysteine, cystine and N-acetylcysteine in the presence of nickel ion". *Analyst*, **119**(2): 309-318, 1994.
49. SUAREZ, W. T.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. & FATIBELLO-FILHO, O. "Voltammetric determination of N-acetylcysteine using a carbon paste electrode modified with copper(II) hexacyanoferrate(III)". *Microchem. J.*, **82**(2): 163-167, 2006.
50. do CARMO D. R.; SILVA, R. M. & STRADIOTTO, N. R. "Electrocatalytic and voltammetric determination of sulfhydryl compounds through iron nitroprusside modified graphite paste electrode". *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**(4): 616-620, 2003.
51. DU, J.; LI, Y. & LU, J. "Investigation on the chemiluminescence reaction of luminol–H₂O₂–S₂/R–SH system". *Anal. Chim. Acta*, **448**(1-2): 79-83, 2001.
52. LI, Y. H.; ZHANG, A. H.; DU, J. X. & LU, J. R. "Flow injection chemiluminescence determination of thiol-containing drugs based on a quinine-sensitized permanganate reaction". *Anal. Lett.*, **36**(4): 871-879, 2003.
53. AL-GHANNAM, S.; EL-BRASHY, A. & AL-FARHAN, B. "Fluorimetric determination of some thiol compounds in their dosage forms". *Il Farmaco*, **57**(8): 625-629, 2002.
54. JANEGITZ, B. C.; SUAREZ, W. T.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. & FATIBELLO-FILHO, O. "Conductometric determination of N-acetylcysteine in pharmaceutical formulations". *Anal Lett.*, **41**(18): 3264-3271, 2008.
55. TSAI, F. Y.; CHEN, C. J. & CHIEN, C. S. "Determination of the cysteine derivatives N-acetylcysteine, S-carboxymethylcysteine and methylcysteine in pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A*, **697**(1-2): 309-315, 1995.
56. SUAREZ, W. T.; VIEIRA, H. J. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection turbidimetric determination of acetylcysteine in pharmaceutical formulations using silver nitrate as precipitant reagent". *J. Braz. Chem. Soc.*, **18**(5): 1028-1033, 2007.
57. USP, *United States Pharmacopeial National Formulary XXI*, Rockville MD: U.S. Pharmacopeial Convention, 1985. p.19.
58. DAVIS, R.; RIBNER, H.; KEUNG, E.; SONNENBLICK, E. & LE-JEMTEL, T. "Treatment of chronic congestive heart-failure with captopril, and oral inhibitor

- of angiotensin-converting enzyme". *New England J. Med.*, **301**(3): 117-121, 1979.
59. http://portal.saude.sp.gov.br/resources/geral/acoes_da_sessp/assistencia_farmaceutia/lista_medicamentos_dose_certa/captopril_memento_srep_sac.pdf – visitado em 25/01/2009.
60. AL-GHANNAM, S. M.; EL-BRASHY, A. M. & AL-FARHAN, B. S. "Fluorimetric determination of some thiol compounds in their dosage forms". *Il Farmaco*, **57**(8): 625-629, 2002.
61. CAVRINI, V., GATTI, R.; ROVERI, P. & CESARONI, M. R. "Use of 4-(6-methylnaphthalen-2-yl)-4-oxobut-2-enoic acid as a reagent for the spectrophotometric and fluorimetric determination of aliphatic thiol drugs". *Analyst*, **113**: 1447-1452, 1988.
62. PASSAMONTI, P.; BARTOCCI, V. & PUCCIARELLI, F. "Determination of captopril using adsorptive cathodic differential pulse stripping voltammetry with the HDME". *J. Electroanal. Chem.*, **230**(1-2): 99-108, 1987.
63. ZIYATDINOVA, G. K.; BUDNIKOV, G. K. & POGORELTSEV, V. I. "Determination of captopril in pharmaceutical forms by stripping voltammetry". *J. Anal. Chem.*, **61**(8): 798-800, 2006.
64. STEFAN, R. I.; VAN-STADEN, J. F. & ABOUL-ENEIN, H. Y. "A new construction for a potentiometric, enantioselective membrane electrode – its utilization to the s-captopril assay". *Talanta*, **48**(5): 1139-1143, 1999.
65. RIBEIRO, P. R.; SANTINI, A. O.; PEZZA, H. R. & PEZZA, L. "Potentiometric determination of captopril in pharmaceutical formulations". *Eclet. Quim.*, **28**(1): 39-44, 2003.
66. MOHAMED, E. M., ABOUL-ENEIN, H. Y. & GAD-KARIEM, E. A. "Potentiometric and visual titrimetric methods for analysis of captopril and its pharmaceutical forms". *Anal. Lett.*, **16**(1): 45-55, 1983.
67. NIKOLIC, K. & VELASEVIC, K. "Conductometric determination of captopril". *Pharmazie*, **44**(22): 155-156, 1989.
68. LOURENÇÃO, B. C.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. & FATIBELLO-FILHO, O. "Determinação condutométrica de captopril em formulações farmacêuticas utilizando sulfato de cobre(II) como titulante". *Quim. Nova*, **31**(2): 349-352, 2008.
69. TZANAVARAS, P. D.; THEMELIS, D. G.; ECONOMOU, A. & THEODORIDIS,

- G. "Flow and sequential injection manifolds for the spectrophotometric determination of captopril based on its oxidation by Fe(III)". *Microchim. Acta*, **142**(1-2): 55, 2003.
70. TZANAVARAS, P. D.; THEMELIS, D. G.; ECONOMOU, A. & THEODORIDIS, G. "Reversed flow-injection manifold for the spectrophotometric determination of captopril based on its inhibitory effect on the Co(II)-2,2'-dipyridyl-2-pyridylhydrazone complex formation". *Talanta*, **57**(3): 575-581, 2002.
71. SHAMA, S. A.; EL-SAYED, A. A. & OMARA, H. "Colorimetric microdetermination of captopril in pure form and in pharmaceutical formulations". *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.*, **102**(2): 261-268, 2006.
72. ASKAL, H. F. "New spectrophotometric methods for determination of captopril bulk drug and tablets". *Talanta*, **38**(10): 1155, 1991.
73. SUAREZ, W. T.; MADI, A. A.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow-injection spectrophotometric system for captopril determination in pharmaceuticals". *J. Braz. Chem. Soc.*, **18**(6): 1215-1219, 2007.
74. KARLICEK, R. & SOLICH, P. "Flow-injection spectrophotometric determination of captopril using on-line solid phase extraction". *Pharmazie*, **53**(8): 549, 1998.
75. PIMENTA, A. M.; ARAUJO, A. N. & MONTENEGRO, M. C. B. S. M. "Sequential injection analysis of captopril based on colorimetric and potentiometric detection". *Anal. Chim. Acta*, **438**(1-2): 31-38, 2001.
76. ALBERO, M. I.; SÁNCHEZ-PETREÑO, C.; GARCÍA, M. S. & RÓDENAS, V. "Determination of captopril in pharmaceutical samples by flow injection analysis". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11**(10): 887-891, 1993.
77. OVANOVIC, T.; STANOVIC, B. & KORICANAC, Z. "Spectrophotometric investigation on complex-formation of captopril with palladium(II) and its analytical application". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13**(3): 213, 1995.
78. EMARA, K. M.; MOHAMED, A. M. I.; ASKAL, H. F. & DARWISH, I. A. "Spectrophotometric determination of some pharmaceutical compounds using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl". *Anal. Lett.*, **26**(11): 2385, 1993.
79. ZHANG, X. R.; BAYENS, W. R. G.; VANDERWEKEN, G.; CALOKERINOS, A. C. & NAKASHIMA, K. "Chemiluminescence determination of captopril based on a rhodamine-B sensitized cerium(IV) method". *Anal. Chim. Acta*, **303**(1): 121-125, 1995.

80. ZHANG, Z. D.; BAYENS, W. R. G.; ZHANG, X. R. & VANDERWEKEN, G. "Chemiluminescence flow-injection analysis of captopril applying a sensitized rhodamine 6G method". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**(8-10): 939-945, 1996.
81. ECONOMOU, A.; THEMELIS, D. G.; THEODORIDIS, G. & TZANAVARAS, P. D. "Sensitive determination of captopril by flow injection analysis with chemiluminescence detection based on the enhancement of the luminol reaction". *Anal. Chim. Acta.*, **463**(2): 249-255, 2002.
82. XINRONG, Z.; BAEYENS, W. R. G.; VANDERWEKEN, G.; CALOKERINOS, A. C. & NAKASHIMA, K. "Chemiluminescence analysis of captopril - Comparison between luminol and rhodamine B-sensitized cerium(IV) methods". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13**(4-5): 425, 1995.
83. PULGARÍN, J. A. M; BERMEJO, F. L. G. & LÓPES, P. F. "Sensitive determination of captopril by time-resolved chemiluminescence using the stopped-flow analysis based on potassium permanganate oxidation". *Anal. Chim. Acta.*, **546**(1): 60-67, 2005.
84. LI, Y. H.; ZHANG, A. H.; DU, J. X. & LU, J. R. "Flow injection chemiluminescence determination of thiol-containing drugs based on a quinine-sensitized permanganate reaction". *Anal. Lett.*, **36**(4): 871, 2003.
85. DU, J. X.; LI, Y. H. & LU, J. R. "Flow injection chemiluminescence determination of captopril based on its enhancing effect on the luminol-ferricyanide/ferrocyanide reaction". *Luminesc.*, **17**(3):165-1667, 2002.
86. PALOMEQUE, M. E. & BAND, B. S. F. "Flow injection biamperometric determination of captopril". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**(3): 547, 2002.
87. MIRZA, T. & TAN, H. S. I. "Determination of captopril in pharmaceutical tablets by anion-exchange HPLC using indirect photometric detection; a study in systematic method development". *J. Pharm Biomed. Anal.*, **25**(1): 39-52, 2001.
88. *USP, The United States pharmacopeia*: United States Pharmacopoeial Convention, 24th ed. Rockville, 2000, p. 296.
89. KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. *Química Farmacêutica*. 1 edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988, p. 193-195.
90. LEVY, M.; ZYLBERKATZ, E. & ROSENKRANZ B. "Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites". *Clin. Pharmacokinet.*, **28**: 216, 1995.
91. VASSILEVA-ALEXANDROVA, P. & SHISHMANOV, P. S. "Spectrophotometric determination of dipyron with neotetrazolium chloride". *Anal. Chem.*, **47**(8):

- 1432-1435, 1975.
92. PEZZA, L.; TUBINO, M.; MELIOS, C. B. & PEZZA, H. R. "Rapid spot test analysis for the detection of dipyrone in pharmaceutical preparations". *Anal. Scienc.*, **16**(3): 313-315, 2000.
 93. SAKIARA, K. A.; PEZZA, L.; MELIOS, C. B.; PEZZA, H. R. & de MORAES, M. "Spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations by using chromotropic acid". *Il Farmaco*, **54**(9): 629-637, 1999.
 94. QURESHI, S. Z.; SAEED, A. & HAQUE, S. "Some observations on a simple method for the determination of novalgin in drug formulations with iron(III)-1,10-phenanthroline". *Microchem. J.*, **41**(3): 362-365, 1990.
 95. QURESHI, S. Z.; SAEED, A. & HASSAN, T. "Spectrophotometric determination of novalgin in tablets by use of potassium iodate". *Talanta*, **36**(8): 869-871, 1989.
 96. WEINERT, P. L.; FERNANDES, J. B.; PEZZA, L. & PEZZA, H. R. "Flow-injection spectrophotometric determination of novalgin in pharmaceuticals using micellar medium". *Anal. Scienc.*, **23**: 1383-1389, 2007.
 97. LIMA, J. L.; OLIVEIRA-SÁ, S. M.; SANTOS, J. L. & ZAGATTO, E. A. G. "Mult pumping flow system for the spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**(4-5): 1011-1017, 2003.
 98. PEREIRA, A. V.; PENCKOWSKI, L.; VOSGERAU, M.; SASSÁ, M. F. & FATIBELLO-FILHO, O. "Determinação espectrofotométrica de dipirona em produtos farmacêuticos por injeção em fluxo pela geração de íons triiodeto". *Quim. Nova*, **25**(4): 553-557, 2002.
 99. MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; SOUZA, R. A.; FATIBELLO-FILHO, O.; MORAES, F. C. & TEIXEIRA, M. F. S. "Flow-injection spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations using ammonium molybdate as chromogenic reagent". *Anal. Lett.*, **38**(14): 2315-2326, 2005.
 100. OLIVEIRA, S. C. B.; COELHO, E. C. S.; SELVA, T. M. G.; SANTOS, F. P.; ARAÚJO M. C. U.; ABREU, F. C. & NASCIMENTO, V. B. "A coulometric flow cell for in-line generation of reagent, titrant or standard solutions". *Microchem. J.*, **82**(2): 220-225, 2006.
 101. ZAMORA, L. L. & MARTÍNEZ-CALATAYUD, J. "Immobilization of reagents by polymeric materials. Determination of metamizol". *Talanta*, **40**(7): 1067, 1993.

102. MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BONIFÁCIO, V. G. & FATIBELLO-FILHO, O. "Determinação turbidimétrica de dipirona em fluxo utilizando um reator contendo cloreto de prata imobilizado em resina poliéster". *Quim. Nova*, **28**(5): 783-787, 2005.
103. MATOS, R. C.; ANGNES, L.; ARAUJO, M. C. U. & SALDANHA, T. C. B. "Modified microelectrodes and multivariate calibration for flow injection amperometric simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, epinephrine and dipyrone". *Analyst*, **125**(11): 2011-2015, 2000.
104. PEREZ-RUIZ, T.; LOZANO, C. M. & TOMAS, V. "Flow-injection determination of novalgin using amperometric detection at a glassy-carbon electrode". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12**(9): 1109-1113, 1994.
105. MEDEIROS, E. P.; CASTRO, S. L.; FORMIGA, F. M.; SANTOS, S. R. B.; ARAUJO, M. C. U. & NASCIMENTO, V. B. "A flow injection method for biamperometric determination of dipyrone in pharmaceuticals". *Microchem. J.*, **78**(1): 91-96, 2004.
106. HUANG, Y. M.; ZHANG, C.; ZHANG, X. R. & ZHANG, Z. J. "Chemiluminescence analysis of menadione sodium bisulfite and analgin in pharmaceutical preparations and biological fluids". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21**(4): 817-825, 1999.
107. PEREZ-RUIZ, T.; MARTINEZ-LOZANO, C.; TOMAS, V. & CARPENA, J. "Flow-injection fluorimetric determination of novalgin in pharmaceutical preparations". *Microchem. J.*, **47**(3): 296-301, 1993.
108. *Farmacopéia Brasileira*, 3a ed. São Paulo, Atheneu Editora, 1977. p. 408.
109. BALDESSARINI, R. J. *Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos da ansiedade. As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 11a ed. Rio de Janeiro, Mc Graw-Hill, 2006.
110. OLIVEIRA, I. R. Antidepressivos. In: *Farmacologia*, 4a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.
111. DARWISH, I. A. "Development and validation of spectrophotometric methods for determination of fluoxetine, sertraline, and paroxetine in pharmaceutical dosage forms". *J. AOAC Int.*, **88**: 38-45, 2005.
112. ONAL, A; KEPEKÇI, S. E; ÇETIN. S. M. & ERTURK, S. "Spectrophotometric determination of certain antidepressants in pharmaceutical preparations". *J. AOAC Int.*, **89**(4): 966-971, 2006.

113. STARCZEWSKA, B. & MIELICH, K. "Application of chrome azurol S for the extractive spectrophotometric determination of fluoxetine and fluvoxamine". *J. Pharm. Biom. Anal.*, **23**: 243, 2000.
114. STARCZEWSKA, B. "Spectrophotometric determination of fluvoxamine maleate and fluoxetine hydrochloride". *J. Trace Micropr. Techn.* **19**(1): 19-24, 2001.
115. BEBAWY, L. I.; EL-KOUSY, N.; SUDDIK, J. K. & SHOKRY, M. "Spectrophotometric determination of fluoxetine and sertraline using chloranil, 2, 3 dichloro-5, 6 dicyano benzoquinone and iodine". *J. Pharm. Biom. Anal.*, **21**: 133-142, 1999.
116. SILVA, A. M. S. R.; LIMA, J. C.; TELES, M. T. O. & BRETT, A. M. O. "Electrochemical studies and square wave adsorptive stripping voltammetry of the antidepressant fluoxetine". *Talanta*, **49**(3): 611-617, 1999.
117. LENCASTRE, R. P.; MATOS, C. D.; GARRIDO, J.; BORGES, F. & GARRIDO, E. M. "Voltammetric quantification of fluoxetine: Application to quality control and quality assurance processes". *J. Food. Drug. Anal.*, **14**: 242-246, 2006.
118. ERTUCK, S.; ÇETIN, S. M.; ATMACA, S.; ERSOY, L. & BAKTR, G. "A sensitive HPLC method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma with fluorescence detection". *Ther. Drug Monit.*, **27**: 38-43, 2005.
119. SHAH, J.; JAN, M. R. & REHMAN, F. "Flow injection spectrophotometric determination of fluoxetine in bulk and in pharmaceutical preparations". *J. Chil. Chem. Soc.*, **53**(3): 1605-1608, 2008.
120. GONZÁLEZ-MÁRTIN, M. I. & GONZÁLES-PÉREZ, C. "Batch and flow injection fluorimetric determination of fluoxetine". *Anal. Lett.*, **30**(14): 2493-2502, 1997.
121. NOUWS, H. P. A.; DELERUE-MATOS, C.; BARROS, A. A.; RODRIGUES, J. A.; SILVA, A. S. & BORGES, F. "Square-wave adsorptive-stripping voltammetric detection in the quality control of fluoxetine". *Anal. Lett.*, **40**: 1131-1146, 2007.
122. MARQUES, K. L.; SANTOS, J. L. M. & LIMA, J. L. F. C. "Application of pulsed flow analysis for chemiluminescent screening of fluoxetine counterfeit pharmaceuticals". *Anal. Lett.*, **40**(11): 2241-2251, 2007.
123. AFKHAMI, A., MADRAKIAN, T. & KHALAFI, L. "Spectrophotometric determination of fluoxetine by batch and flow injection methods". *Chem.*

- Pharm. Bull.*, **54**(12): 1642-1646, 2006.
124. *The United States Pharmacopoeia*, XXIV ed., United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2000. p. 739.
 125. REIS, B. F.; GINÉ, M. F. & KRONKA, E. A. M. "A análise por injeção em fluxo contínuo". *Quim. Nova*, **12**(1): 82-91, 1989.
 126. KRUG, F. J.; BERGAMIN, F. H. & ZAGATTO, E. A.G., "Commutation in flow injection analysis ". *Anal. Chim. Acta.*, **179**: 103-118, 1986.
 127. CARRILHO, E.; MIRANDA, C. E. S. M.; GERVASIO, A. P. & GINÉ, M. F. "Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar(FIA-CE): desafios, aplicações e perspectivas" *Quim. Nova*, **25**(3): 412, 2002.
 128. BERGAMIN, F. H.; REIS, B. F. & ZAGATTO, E. A. G. "A new device for improving sensitivity and stabilization in flow-injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **97**: 427-431, 1978.
 129. REIS, B. F.; BERGAMIN, F. H.; ZAGATTO, E. A. G. & KRUG, F. J. "Merging zones in flow injection analysis : Part 3. Spectrophotometric determination of aluminium in plant and soil materials with sequential addition of pulsed reagents". *Anal. Chim. Acta*, **107**: 309, 1979.
 130. REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; JACINTHO, A. O.; KRUG, F. J. & BERGAMIN, F. H. "Merging zones in flow injection analysis : Part 4. Simultaneous spectrophotometric determination of total nitrogen and phosphorus in plant material". *Anal. Chim. Acta*, **119**(2): 305-311, 1980.
 131. SILVA, R. C.; VIEIRA, H. J.; CANAES, L. S.; NÓBREGA, J. A. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection spectrophotometric method for chloride determination in natural waters using Hg(SCN)₂ immobilized in epoxy resin". *Talanta*, **65**: 965-970, 2005.
 132. MARTÍNEZ-CALATAYUD, J. & MATEO, J. V. G. "Online solid-phase reactors for unsegmented continuous-flow drug analysis". *Trends Anal. Chem.*, **12**(10): 428-436, 1993.
 133. ZAMORA, L. L.; MATEO, J. V. G. & MARTÍNEZ-CALATAYUD, J. "Entrapment of reagents in polymeric materials. Indirect atomic absorption spectrometric determination of isoniazid by oxidation with manganese dioxide incorporated in polyester resin beads in a flow-injection system". *Anal. Chim. Acta*, **265**: 81, 1992.

134. RIVAS, G. A. & MARTÍNEZ-CALATAYUD, J. M. "FIA-AAS determination of salicylic acid by a solid-phase reactor of cooper carbonate incorporated in polyester resin beads". *Talanta*, **42**: 1285, 1995.
135. PEREIRA, A. V. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical formulations with on-line solid-phase reactor containing copper (II) phosphate". *Anal. Chim. Acta*, **366**(1): 55-62, 1998.
136. PEREIRA, A. V.; MARCOLINO, L. H. & FATIBELLO-FILHO, O. "Determinação espectrofotométrica de aspartame em adoçantes por injeção em fluxo usando um reator em fase sólida contendo fosfato de zinco imobilizado". *Quim. Nova*, **23**(2): 167-172, 2000.
137. ICARDO, M. C; ZAMORA, L. L. & MARTINEZ-CALATAYUD, J. "Solid-phase reactors as high stability reagent sources in flow analysis: selective flow injection spectrophotometric determination of cysteine in pharmaceutical formulations". *Analyst*, **123**:1685, 1998.
138. PEREIRA, A. V. & FATIBELLO-FILHO, O. "Spectrophotometric flow injection determination of L-ascorbic acid with a packed reactor containing ferric hydroxide". *Talanta*, **47**(1): 11-18, 1998.
139. TEIXEIRA, M. F. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection spectrophotometric determination of adrenaline in pharmaceutical formulations using a solid-phase reactor containing lead(IV) dioxide immobilized in a polyester resin". *Il Farmaco*, **57**: 215-219, 2002.
140. COROMINAS, B. G. T.; PFERZSCHNER, J.; ICARDO, M. C.; ZAMORA, L. L. & MARTÍNEZ-CALATAYUD, J. "In situ generation of Co(II) by use of a solid-phase reactor in an FIA assembly for the spectrophotometric determination of penicillamine". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**: 281-284, 2005.
141. MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; TEIXEIRA, M. F. S.; PEREIRA, A. V. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection determination of levedopa in tablets using a solid-phase reactor containing lead(IV) immobilized". *Anal. Lett.*, **25**(3-4): 393-398, 2001.
142. BONIFÁCIO, V. G.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection spectrophotometric determination of isoproterenol with an on-line solid-phase reactor containing immobilized manganese dioxide". *Anal. Lett.*, **37**(10): 2111-2124, 2004.

143. COLLINS, C. H. *Introdução a métodos cromatográficos*. Ed. Unicamp, 1987, p. 79-85.
144. VASCONCELOS, M. T. S. D.; GOMES, C. A. R. & MACHADO, A. A. S. C. "Ion chromatographic determination of fluoride in welding fumes with elimination of high contents of iron by solid-phase extraction". *J. Chromatogr. A*, **685**(1): 53-60, 1994.
145. SWEILEH, J. A. & EI-NEMMA, E. M. "On-line elimination of spectral interference of iron matrix in the flame atomic absorption determination of zinc by anion-exchange separation". *Anal. Chim. Acta*, **523**: 287-292, 2004.
146. PRADA, S. M.; GUEKEZIAN, M. & SUÁREZ-ILHA, M. E. V. "Metodologia analítica para determinação de sulfato em vinhoto". *Quim. Nova*, **21**(3): 249-252, 1998.
147. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. & NIEMAN T. A. *Principles of instrumental analysis*. Chicago, Hartcourt Brace College Publishing, 1998. p. 300.
148. HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 6a ed. Rio de Janeiro, LTC, 2005. cap. 18.
149. INGLE-JÚNIOR, J. D.; CROUCH, S. R., *Spectrochemical Analysis*, New Jersey, Prentice Hall, 1988, p. 513.
150. MORAIS, I. P. A.; TÓTH, I. V. & RANGEL, A. O. S. S. "Turbidimetric and nephelometric flow analysis: Concepts and applications". *Spectros. Lett.*, **39**: 547-579, 2006.
151. KRUG, F. J.; BERGAMIN-FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G. & JORGENSEN, S. S. "Rapid determination of sulphate in natural waters and plant digests by continuous flow injection turbidimetry". *Analyst*, **102**(1216): 503-508, 1977.
152. COSTA-NETO, C. O.; PEREIRA, A. V.; ANICETO, C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection turbidimetric determination of thiamine in pharmaceutical formulations using silicotungstic acid as precipitant reagent". *Talanta*, **48**(3): 659-667, 1999.
153. CANAES, L. S. & FATIBELLO-FILHO, O. "Determinação turbidimétrica de metilbrometo de homatropina em formulações farmacêuticas empregando um sistema de análise por injeção em fluxo". *Quim. Nova*, **29**(6): 1237-1240, 2006.
154. DÍAZ-CRUZ, M. S; MENDIETA, J.; TAULER, R. & ESTEBAN, M. "Cadmium-binding properties of glutathione: A chemometrical analysis of voltammetric data". *J. Inorg. Biochem.*, **66**: 29-36, 1997.

155. KWIK, W. L. & PENG-ANG, K. "Mixed-ligand complex formation of (2,2',2"-terpyridine)copper(I) and (2,2'2"-terpyridine)copper(II) with some sulfur-containing amino acids". *Trans. Metal. Chem.*, **10**(2): 50-54, 1985.
156. CHEN, C. J. & LIAO, S. L. "Zinc toxicity on neonatal cortical neurons: involvement of glutathione chelation". *J. Neurochem.*, **85**(2): 443-453, 2003.
157. ADASHI, Y.; YOSHIKAWA, Y. & SAKURAI, H. "Antidiabetic zinc(II)-N-acetyl-L-cysteine complex: Evaluations of in vitro insulinomimetic and in vivo blood glucose-lowering activities". *Biofactors*, **29**(4): 213-223, 2007.
158. BRUMAS, V.; HACHT, B.; FILELLA, M. & BERTHON, G. "Can N-acetyl-L-cysteine affect zinc-metabolism when used as a paracetamol antidote". *Agents and Actions*, **36**(3-4): 278-288, 1992.
159. JURKIEWICZ, M.; ALEGRET, S. & FÀBREGAS, E. "Comparasion of flow injection analytical biosystems based on open-tube and packed-bed enzyme reactors". *Anal. Chim. Acta*, **370**(1): 47-58, 1998.
160. CRNKOVIC, P. M. & JACINTHO, A. O. "Emprego de reagente em suspensão em sistema de injeção em fluxo. Determinação espectrofotométrica de sulfato em águas naturais". *Quim. Nova*, **25**(2): 254-258, 2002.
161. BASAVAIHAH, K. & NAGEGOWDA, P. "Argentimetric assay of captopril in bulk drug and in tablets". *J. Iran. Chem. Soc.*, **1**(2): 106-114, 2004.
162. TOSTA, L. M. *Comportamento Eletrocrômico de Filmes de Azul da Prússia em Carbonato de Propileno*. Curitiba, Programa de Pós-Graduação em Química – UFPR, 2008. Dissertação de mestrado, 113 p.
163. BUSER, H. J.; SCHWARZENBACH, D.; PETTER, W.; LUDI, A. "The crystal structure of prussian blue". *Inorg. Chem.*, **16**(11): 2704-2710, 1977.
164. VOGEL, A. I. *Química Analítica Qualitativa*. 5a ed. São Paulo, Editora Mestre Jou, 1979. p. 273
165. MELENTYEVA, C. & ANTONOVA, L. *Pharmaceutical Chemistry*. Moscou, Mir. Publisher, 1988. p. 209