

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

Desenvolvimento de procedimentos de análise por injeção em fluxo para a determinação de furosemida, paracetamol e acetilcisteína em formulações farmacêuticas

HEBERTH JULIANO VIEIRA*

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 CAPES

São Carlos – SP
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

V658dp

Vieira, Heberth Juliano.

Desenvolvimento de procedimentos de análise por injeção em fluxo para a determinação de furosemida, paracetamol e acetilcisteína em formulações farmacêuticas / Heberth Juliano Vieira. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
129 p.

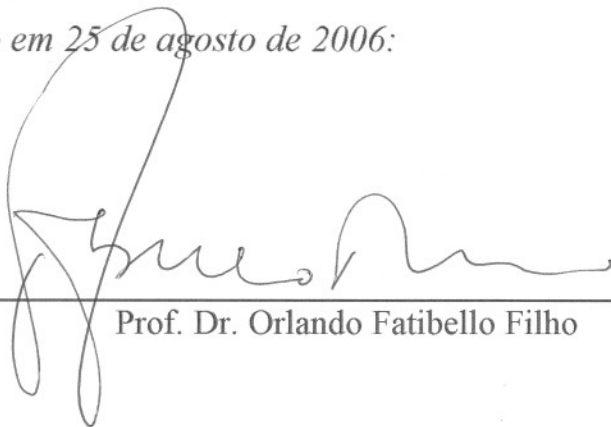
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Métodos óticos. 2. Análise por injeção de fluxo. 3. Produtos farmacêuticos. 4. Espectrofotometria. I. Título.

CDD: 543.085 (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 **Heberth Juliano Vieira** realizado em 25 de agosto de 2006:*



Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



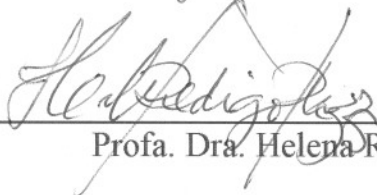
Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira



Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria



Prof. Dr. Mauro Korn



Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza

Dedico este trabalho a meus pais, Diomar e Natalina,
pelas oportunidades concedidas
e a meus irmãos, pelo apoio.

Dedico à minha amada Daniele Minholo,
pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho, pela orientação, incentivo e amizade durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Química.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade da realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina-UEL.

Às secretárias da PPG-Q pela atenção nesses anos todos.

Aos amigos do LABBES: Ana Elisa, Mirella, Cyber, Bruno, Bruna, Fernanda, Dani, Mônica, Alexandro, Geiser Gabriel, Luiz, Willian Suarez, Karina, Viviane, Roberta e Heloisy.

Aos amigos que conviveram comigo durante todos esses anos, André Oliveira, Lucas Megale, Lucas Decina, Cláudio Dias, Willy, Paulo, James, Willian, Márcio e Nelson.

Ao Oldair pelas discussões e amigável convivência.

Aos amigos dos outros grupos de pesquisa, pela agradável convivência.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e pelo estágio na Universidade Autônoma de Barcelona (UAB).

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 Métodos espectrofotométricos de análise	3
TABELA 1.2 Reações químicas envolvendo a geração de radicais hidroxila empregando peróxido e radiação ultravioleta ⁴⁹	11
TABELA 1.3 Figuras de méritos de sistemas em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de paracetamol empregando optossensores.....	21
TABELA 1.4 Figuras de méritos de sistemas em fluxo para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas.....	25
TABELA 1.5 Reagentes utilizados na determinação de paracetamol após a reação de hidrólise do fármaco.....	27
TABELA 1.6 Figuras de méritos de sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de paracetamol empregando reação de hidrólise	28
TABELA 1.7 Figuras de mérito de procedimentos analíticos para a determinação de acetilcisteína	34
TABELA 1.8 Figura de mérito de sistema em fluxo para a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas.....	34
TABELA 4.1 Estudo do efeito da concentração de H ₂ O ₂ na degradação fotoassistida do resíduo gerado do sistema em fluxo (pH 3,0)	64
TABELA 4.2 Estudo da otimização dos parâmetros do sistema em fluxo para a determinação de furosemida.....	66
TABELA 4.3 Estudo da seletividade na determinação de furosemida empregando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto	68
TABELA 4.4 Estudo da recuperação de furosemida em formulações farmacêuticas comerciais.....	69
TABELA 4.5 Determinação de furosemida em amostras farmacêuticas pelo método proposto e pelo método oficial ¹²⁴	71
TABELA 4.6 Parâmetros estudados na otimização do sistema em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de paracetamol.....	79
TABELA 4.7 Estudo da seletividade na determinação de paracetamol empregando o sistema de análise por injeção em fluxo com hipoclorito e o-tolidina como reagentes.....	80
TABELA 4.8 Estudo da recuperação de paracetamol empregando o sistema de análise por injeção em fluxo.....	81
TABELA 4.9 Determinação de paracetamol empregando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto e o método comparativo da Farmacopéia Americana ⁴⁶	82
TABELA 4.10 Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo com injeção de reagente para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas.....	88
TABELA 4.11 Avaliação das substâncias interferentes na determinação de paracetamol	91
TABELA 4.12 Estudo da recuperação de paracetamol em formulações farmacêuticas.....	92
TABELA 4.13 Equações das curvas analíticas obtidas em diferentes dias	93

TABELA 4.14 Determinação de paracetamol usando o sistema de análise por injeção em fluxo reverso	95
TABELA 4.15 Consumo de reagentes na determinação de paracetamol em diferentes procedimentos analíticos em fluxo	96
TABELA 4.16 Parâmetros analíticos dos sistema em fluxo proposto e descritos na literatura.....	97
TABELA 4.17 Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de acetilcisteína empregando Ce(IV)/ferroína como reagentes .	102
TABELA 4.18 Influência das substâncias excipientes na determinação de acetilcisteína	104
TABELA 4.19 Estudo da recuperação de acetilcisteína em produtos farmacêuticos	105
TABELA 4.20 Equações das curvas analíticas obtidas em diferentes dias de trabalhos	105
TABELA 4.21 Determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando o sistema em fluxo proposto e o método comparativo da Farmacopéia Brasileira ¹²⁶	107
TABELA 4.22 Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de acetilcisteína empregando a geração de bromo.....	112
TABELA 4.23 Estudo da seletividade na determinação de acetilcisteína	113
TABELA 4.24 Estudo da recuperação de acetilcisteína.....	114
TABELA 4.25 Equações das curvas analíticas obtidas em diferentes dias	115
TABELA 4.26 Determinação de acetilcisteína em produtos farmacêuticos empregando o procedimento em fluxo proposto e o procedimento da Farmacopéia Brasileira ¹²⁶	116

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 Esquema das unidades constituintes do sistema em fluxo. R: reagente; C: carregador; I: Injetor; S: solução de referência ou amostra; B: Bobina reacional; D: detector e W: descarte..... 6
- FIGURA 1.2 Reações envolvidas na degradação da furosemida em solução aquosa⁵⁸. (I) Furosemida; (II) Saluamina; (III) espécie furfúril; MeOH: metanol e Uv: radiação ultravioleta. 12
- FIGURA 1.3 Mecanismo reacional mostrando a citotoxicidade do paracetamol quando ingerida em grandes quantidades⁷⁵. 18
- FIGURA 3.1 Sistema de análise por injeção em fluxo usado para a determinação de furosemida em formulações farmacêuticas. C: solução transportadora (NaOH $1,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹; 2,0 mL min⁻¹); C₁: solução de hipoclorito de sódio $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em NaOH $1,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ (1,4 mL min⁻¹); C₂: solução de *o*-tolidina 9×10^{-5} mol L⁻¹ em HCl $1,9 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ (0,7 mL min⁻¹); C₃: solução de peróxido de hidrogênio 0,22 mol L⁻¹ (0,9 mL min⁻¹); L: alça de amostragem (375 µL); B₁; B₂ e B₃: bobinas reacionais (40, 60 e 310 cm, respectivamente); D: espectrofotômetro (430 nm); E: resíduo aspirado a 1,2 mL min⁻¹; Cr: câmara de radiação contendo a lâmpada que emite radiação ultravioleta (380 nm); S: solução de referência ou amostra e W: descarte. As setas indicam o sentido do fluxo das soluções. A bomba peristáltica não está indicada na Figura. 42
- FIGURA 3.2 Configuração do sistema em fluxo para estudo da fotodegradação do resíduo gerado na determinação de furosemida. C: solução de NaOH $1,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹; C₁: solução de hipoclorito de sódio $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; C₂: solução de *o*-tolidina 9×10^{-5} mol L⁻¹; C₃: solução de H₂O₂ 0,22 mol L⁻¹ (0,9 mL min⁻¹); B₁: bobina reacional de 40 cm; B₂: bobina reacional de 60 cm; CR: câmara de radiação contendo a bobina reacional de 310 cm e a lâmpada ($\lambda = 380$ nm); BP: bomba peristáltica; X, Y e Z: confluências; E: frasco contendo resíduo; e W: descarte. 43
- FIGURA 3.3 Sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando hipoclorito e *o*-tolidina como reagente. C: água desionizada (2,2 mL min⁻¹); C₁: solução de hipoclorito de sódio $9,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em solução tampão borato 0,05 mol L⁻¹ (0,9 mL min⁻¹); C₂: solução de *o*-tolidina $9,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (1,6 mL min⁻¹); C₃: solução de peróxido de hidrogênio 0,22 mol L⁻¹ (0,9 mL min⁻¹); I: injetor-comutador; L: (400 µL); B₁ e B₂: bobinas reacionais (75 e 310 cm, respectivamente); D: espectrofotômetro (430 nm); E: resíduo aspirado a 1,2 mL min⁻¹; CR: câmara de radiação contendo lâmpada que emite radiação ultravioleta (380 nm) e W: descarte. As setas indicam o sentido do fluxo das soluções. A bomba peristáltica não está indicada na Figura. 47
- FIGURA 3.4 Sistema de análise por injeção em fluxo reverso para a determinação espectrofotométrica de paracetamol empregando nitrito de sódio como reagente. S: Solução de amostra ou solução de referência de paracetamol em HCl $2,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ (2,2 mL min⁻¹); BP: bomba peristáltica; L: alça de amostragem (50 µL); R: solução de nitrito de sódio $8,2 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹; B: bobina reacional (150 cm); D: espectrofotômetro ($\lambda = 400$ nm); W: descarte. 50
- FIGURA 3.5 Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica empregado para a determinação de acetilcisteína em produtos farmacêuticos. C: solução transportadora (H₂O, 1,5 mL min⁻¹); C₁: solução de Ce(SO₄)₂ $6,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em H₂SO₄ $4,3 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ (0,9 mL min⁻¹); C₂: solução de ferroína $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (0,7 mL min⁻¹); L: alça de amostragem 350 µL; B₁: bobina reacional (65 cm); B₂: bobina reacional (65 cm); D: espectrofotômetro (500 nm); BP: bomba peristáltica; S: solução de referência ou amostra; I: injetor-comutador 2-3-2 e W: descarte. 53

FIGURA 3.6. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína. BP: bomba peristáltica; C: água desionizada; C ₁ : solução de brometo de potássio $2,2 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$; C ₂ : solução de HCl $2,4 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$; C ₃ : solução de bromato de sódio $1,25 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; C ₄ : solução de ácido ascórbico 5,0% m/v; I: injetor comutador; L: volume de amostragem (250 μL); S: solução de referência ou de amostra; B ₁ , B ₂ e B ₃ : bobinas reacionais de 140, 60 e 60 cm, respectivamente; D: espectrofotômetro e W: resíduo.....	56
FIGURA 4.1 Espectro de absorção da <i>o</i> -tolidina e do cromóforo (<i>o</i> -tolidina oxidada).....	58
FIGURA 4.2 Reação química envolvida na determinação de hipoclorito empregando <i>o</i> -tolidina como reagente.....	59
FIGURA 4.3 Efeito do comprimento da bobina reacional na determinação de solução de referência de furosemida $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).....	61
FIGURA 4.4 Efeito do volume da alça de amostragem na determinação de solução de referência de furosemida $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).....	62
FIGURA 4.5 Efeito da vazão da solução de hipoclorito de sódio na determinação de solução de referência de furosemida $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).....	63
FIGURA 4.6 Espectros de absorção da solução de <i>o</i> -tolidina oxidada empregando solução de H ₂ O ₂ antes da degradação fotoassistida (1) e depois da radiação ultravioleta (2) empregando uma solução de peróxido de hidrogênio $0,22 \text{ mol L}^{-1}$	65
FIGURA 4.7 Diagrama obtido no estudo da repetibilidade na determinação de solução de referência de furosemida (A) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	67
FIGURA 4.8 Sinais transientes obtidos na determinação de furosemida em formulações farmacêuticas empregando o sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para soluções de referência nas concentrações (1) $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (2) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (3) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (4) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (6) $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, seguidas dos sinais transientes em triplicatas para as soluções de amostras (A-E) e novamente os sinais das soluções de referência em concentrações decrescentes.....	70
FIGURA 4.9 Esquema da reação de oxidação do paracetamol ¹³⁴	72
FIGURA 4.10 Produtos da reação de paracetamol com hipoclorito. (1) N-acetil- <i>p</i> -benzoquinona imina (2) 1,4-benzoquinona (3) cloro-4-acetoaminofenol (4) dicloro-4-acetoaminofenol ¹³⁵	72
FIGURA 4.11 Efeito da concentração de hipoclorito de sódio na determinação de paracetamol (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).....	73
FIGURA 4.12 Efeito da concentração de <i>o</i> -tolidina na determinação de uma solução de referência de paracetamol $5,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).....	74
FIGURA 4.13 Efeito do pH da solução de hipoclorito de sódio $9,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na determinação de paracetamol.....	75
FIGURA 4.14 Efeito do volume da alça de amostragem na determinação uma solução de referência de paracetamol $8,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).....	76
FIGURA 4.15 Efeito da vazão da solução de hipoclorito de sódio sobre o sinal analítico para a solução de referência de paracetamol $5,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).....	77
FIGURA 4.16 Sinais transientes obtidos na determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas para soluções de referência nas concentrações (1) $8,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (2) $2,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (3) $4,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (4) $9,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (5) $1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (6) $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, seguida dos sinais transientes das soluções das amostras (A-H) e das soluções de referência novamente em ordem decrescente de concentração.....	83
FIGURA 4.17 Esquema reacional para a determinação de paracetamol empregando nitrito de sódio como reagente.....	84
FIGURA 4.18 Estudo da concentração de ácido clorídrico sobre o sinal analítico de uma concentração de paracetamol $5,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).....	86

FIGURA 4.19 Efeito do comprimento da bobina reacional na determinação de paracetamol (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).	88
FIGURA 4.20 Sinais transientes obtidos no estudo da repetibilidade do procedimento em fluxo para concentrações de paracetamol: (A) 8×10^{-4} mol L ⁻¹ e (B) $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ . as condições do sistema são as mesmas apresentadas na Figura 3.4.	90
FIGURA 4.21 Sinais transientes obtidos na determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando o sistema de análise por injeção em fluxo reverso para as soluções de referência nas concentrações (1) $4,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ ; (2) $1,6 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ ; (3) $3,2 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ ; (4) $5,4 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ ; (5) $6,5 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ e (6) $1,1 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , seguidas dos sinais transientes para as soluções de amostras (A-K).	94
FIGURA 4.22 Esquema das reações químicas envolvidas no sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína empregando Ce(IV) e ferroína como reagentes.	98
FIGURA 4.23 Efeito da concentração da solução de Ce(SO ₄) ₂ , sobre o sinal analítico para H ₂ SO ₄ $2,4 \times 10^{-2}$ mol L ⁻¹ e solução de referência de acetilcisteína $4,5 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).	99
FIGURA 4.24 Efeito do comprimento da bobina reacional B ₁ sobre o sinal analítico de uma solução de referência de acetilcisteína $9,6 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).	100
FIGURA 4.25 Efeito da vazão da solução de Ce(SO ₄) ₂ $3,3 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ na determinação de solução de referência acetilcisteína (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).	102
FIGURA 4.26 Sinais transientes obtidos para soluções de referência de acetilcisteína (1) $2,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ ; (2) $5,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ ; (3) $8,2 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ ; (4) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ ; (5) $1,3 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ , seguidos dos sinais transientes em quadruplicadas das soluções de amostras (A-C).	107
FIGURA 4.27 Reações químicas envolvidas na determinação de acetilcisteína empregando sistema de análise por injeção em fluxo utilizando a geração química de bromo (Br ₂) como reagente.	108
FIGURA 4.28 Estudo da concentração de HCl na produção de bromo (Br ₂). A absorbância refere-se à magnitude da linha base.	109
FIGURA 4.29 Estudo do efeito do comprimento das bobinas reacionais (B ₁) e (B ₂) na geração de bromo.	111
FIGURA 4.30 Sinais transientes obtidos em triplicata para a determinação de acetilcisteína: (1) $1,6 \times 10^{-4}$, (2) $3,3 \times 10^{-4}$, (3) $6,6 \times 10^{-4}$, (4) $9,8 \times 10^{-4}$ e (5) $1,6 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , seguidos de três amostras A, B e C e novamente as soluções de referência em concentração decrescente. Na determinação da amostra C empregou-se o método de adição múltipla de padrão (C _s : solução de amostra; C ₁ : $2,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ ; C ₂ : $3,3 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ ; C ₃ : $5,2 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹).	116

Resumo

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO PARA DETERMINAÇÃO DE FUROSEMIDA, PARACETAMOL E ACETILCISTEÍNA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS Neste trabalho de tese são apresentados o desenvolvimento de procedimentos de análises por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de furosemida, paracetamol e acetilcisteína em amostras de interesse farmacêutico. Um sistema em fluxo para a determinação indireta de furosemida foi otimizado monitorando-se o excesso de hipoclorito de sódio não consumido em reação com a furosemida utilizando *o*-tolidina como reagente em 430 nm. A curva analítica apresentou uma linearidade entre 5×10^{-6} a 8×10^{-5} mol L⁻¹ e um limite de detecção de $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Desvios padrão relativos menores que 2,0% (n=10) para soluções de furosemida com concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$ e 5×10^{-5} mol L⁻¹ e frequência de amostragem de 60 determinações h⁻¹ foram obtidos. Outro sistema em fluxo foi proposto para a determinação indireta de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando hipoclorito de sódio e *o*-tolidina como reagentes. Nesse sistema em fluxo o hipoclorito de sódio em excesso foi monitorado com *o*-tolidina em 430 nm. Após a otimização obteve-se uma curva analítica entre $8,5 \times 10^{-6}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Desvio padrão relativo para uma solução de paracetamol foi de $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de 1,2% (n=10) e frequência de amostragem de 60 determinações h⁻¹ foram obtidos. Nos sistemas em fluxo propostos, os quais empregaram *o*-tolidina como reagente foi acoplada uma lâmpada ultravioleta ($\lambda=380$ nm) após o detector que permitiu a destruição desse reagente empregando conjuntamente uma solução de peróxido de hidrogênio. Um sistema de análise em fluxo reverso foi também proposto para determinação de paracetamol empregando nitrito como reagente. O produto da reação foi monitorado em 430 nm. O sistema em fluxo apresentou uma curva analítica entre $4,0 \times 10^{-5}$ a $1,1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. O limite de detecção foi de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a frequência de amostragem foram 45 determinações por h⁻¹. Desvios padrão relativos menores que 2% foram obtidos para as duas soluções de referência de paracetamol nas concentrações de $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Um procedimento analítico para determinação de acetilcisteína, com detecção espectrofotométrica em 500 nm, empregando o Ce(IV) e ferroína como reagentes foi otimizado. Nesse sistema em fluxo obteve-se uma curva analítica entre $1,3 \times 10^{-5}$ a $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O limite de detecção obtido foi de $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Um desvio padrão relativo para uma solução de referência de acetilcisteína $2,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foi de 1,4 % (n=10) e uma frequência de amostragem de 60 determinações por hora foram obtidos. Outro procedimento em fluxo para a determinação de acetilcisteína empregando bromo (Br₂) gerado quimicamente foi proposto. Nesse sistema, o bromo produzido quimicamente reage com o analito e seu excesso foi monitorado em 400 nm. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de acetilcisteína de $1,6 \times 10^{-4}$ a $1,6 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e um desvio padrão relativo de 1,2% (n=10) para uma solução de acetilcisteína $5,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi obtido. O sistema apresentou uma frequência de amostragem de 60 determinações h⁻¹ e uma solução de ácido ascórbico foi empregada para destruição do bromo em linha.

Abstract

DEVELOPMENT OF FLOW INJECTION ANALYSIS PROCEDURES TO DETERMINATION OF FUROSEMIDE, PARACETAMOL AND ACETYLCYSTEINE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS. In this thesis are presented the development of flow injection analysis procedures with spectrophotometric detection for determination of furosemide, paracetamol and acetylcysteine in samples of pharmaceutical formulations. A flow injection system was optimized for indirect determination of furosemide monitoring the excess of sodium hypochlorite not consumed in the reaction with the furosemide using *o*-tolidine as reagent at 430 nm. The analytical curve was linear from 5.0×10^{-6} to 8.0×10^{-5} mol L⁻¹ and the detection limit was 2.5×10^{-6} mol L⁻¹. A RSD smaller than 2.0% (n=10) for 1.0×10^{-5} and 5.0×10^{-5} mol L⁻¹ furosemide solutions and an analytical frequency of 60 determinations h⁻¹ were obtained. Another flow injection system was proposed to determine paracetamol in pharmaceutical samples employing sodium hypochlorite and *o*-tolidine as reagents. In this flow system, sodium hypochlorite reacted with paracetamol and its concentration in excess was monitored with *o*-tolidine. After system optimization, the analytical curve was linear in the paracetamol concentration range from 8.5×10^{-6} mol L⁻¹ to 2.5×10^{-4} mol L⁻¹ with a detection limit of 5.0×10^{-5} mol L⁻¹. A RSD of 1.2% (n=10) was obtained for 1.5×10^{-4} mol L⁻¹ paracetamol solution. The analytical frequency of the system was 60 determinations h⁻¹. The *o*-tolidine and its products used in both proposed flow injection systems were on line destroyed using an ultraviolet lamp ($\lambda=380$ nm) and hydrogen peroxide solution. The reversed flow system was proposed for determination of paracetamol employing sodium nitrite as reagent. The product formed was monitored at 400 nm. The analytical curve was linear in the paracetamol concentration range from 4.0×10^{-5} to 1.1×10^{-3} mol L⁻¹ with a limit of detection of 2.0×10^{-5} mol L⁻¹ and analytical frequency of 45 determinations h⁻¹. RSD smaller than 2% were obtained for 8.0×10^{-4} and 1.0×10^{-3} paracetamol solutions. A flow system injection procedure with spectrophotometric detection to determine acetylcysteine was developed. In this procedure, acetylcysteine reacts with Ce(IV) solution and the excess of cerium (IV) was monitored with ferroin at 500 nm. An analytical curve ranged from 1.32×10^{-5} to 1.35×10^{-4} mol L⁻¹ with a limit of detection of 8.0×10^{-6} mol L⁻¹ were obtained. A RSD of 1.4% (n=10) for 2.2×10^{-5} mol L⁻¹ acetylcysteine solution and an analytical frequency of 60 determinations h⁻¹ were obtained. Another flow injection system for determine acetylcysteine using bromine (Br₂) as reagent was also proposed. In this system, Br₂ chemically generated on line reacts with the analyte and its excess monitored at 400 nm. The analytical curve obtained was linear from 1.6×10^{-4} and 1.6×10^{-3} mol L⁻¹ and RSD of 1.2 % (n=10) for 5.3×10^{-4} solution were obtained. The system showed the analytical frequency of 60 determinations h⁻¹ and ascorbic acid solution was used to destruct bromine on line.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Revisão histórica	2
1.2	Sistemas de análise por injeção em fluxo	5
1.2.1	Automação em laboratórios químicos	8
1.3	Sistema de análise por injeção em fluxo reverso (r-FIA).....	10
1.4	Fotodecomposição assistida por radiação ultravioleta	10
1.5	Furosemida	11
1.5.1	Aspectos gerais.....	11
1.5.2	Propriedades farmacológicas	12
1.5.3	Alguns métodos para a determinação de furosemida	14
1.6	Paracetamol	15
1.6.1	Aspectos gerais.....	15
1.6.2	Propriedades farmacológicas	17
1.6.3	Métodos de determinação de paracetamol	18
1.7	Acetilcisteína	29
1.7.1	Aspectos gerais.....	29
1.7.2	Propriedades Mucolíticas	29
1.8	Determinação de acetilcisteína	30
2	Objetivos	35
3	Parte Experimental	37
3.1	Instrumentação.....	38
3.1.1	Balança analítica	38
3.1.2	pHmetro.....	38
3.1.3	Eletrodo de vidro combinado.....	38
3.1.4	Espectrofotômetros	38
3.1.5	Bomba peristáltica.....	39
3.1.6	Tubos e conexões	39
3.1.7	Injetor comutador	39
3.1.8	Registrador.....	39
3.2	Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de furosemida empregando hipoclorito e o-tolidina como reagentes	40
3.2.1	Reagentes e soluções.....	40
3.2.3	Método comparativo	41
3.2.4	Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de furosemida empregando hipoclorito e o-tolidina como reagente	41
3.3	Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de paracetamol empregando hipoclorito e o-tolidina como reagente	44
3.3.1	Reagentes e soluções.....	44
3.3.2	Preparo das amostras e determinação de paracetamol.....	45
3.4.3	Método comparativo	49

3.4.4 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica para a determinação direta de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando nitrito de sódio como reagente	49
3.5 Sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação indireta de acetilcisteína empregando Ce(IV) e ferroína como reagente ¹²⁵	50
3.5.1 Reagentes e soluções	50
3.5.3 Método comparativo	52
3.6. Sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação espectrofotométrica indireta de acetilcisteína utilizando a geração química de bromo ¹²⁷	53
3.6.1 Reagentes e soluções	53
3.6.2 Preparação das amostras farmacêuticas	54
3.6.3 Método comparativo	55
3.6.4 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de acetilcisteína empregando bromo (Br ₂) gerado quimicamente como reagente	55
4 Resultados e Discussões	57
4.1 Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de furosemida em produtos farmacêuticos	58
4.1.1 Estudos dos parâmetros químicos do sistema FIA	59
4.1.2 Otimização dos parâmetros físicos do sistema de análise por injeção em fluxo ...	60
4.1.3 Fotodegradação da o-tolidina empregando radiação UV e H ₂ O ₂	63
4.1.4 Parâmetros analíticos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de furosemida	66
4.1.5 Estudo de interferência	67
4.1.6 Teste de adição e recuperação	68
4.1.7 Aplicação	69
4.2 Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de paracetamol em produtos farmacêuticos	71
4.2.1 Estudo dos parâmetros químicos do sistema FIA para a determinação de paracetamol	73
4.2.2 Estudos dos parâmetros físicos do sistema FIA	75
4.2.3 Fotodegradação da o-tolidina empregando radiação ultravioleta e H ₂ O ₂	78
4.2.4 Parâmetros analíticos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de paracetamol	79
4.2.5 Estudo de interferentes	79
4.2.6 Estudo da recuperação em amostras comerciais	80
4.2.7 Aplicação	82
4.3 Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo reverso para a determinação de paracetamol empregando nitrito de sódio como reagente	84
4.3.1 Estudos dos parâmetros químicos do sistema em fluxo	85
4.3.2 Estudo dos parâmetros físicos do sistema em fluxo	86
4.3.3 Parâmetros analíticos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de paracetamol empregando nitrito de sódio como reagente	89
4.3.4 Estudo da seletividade	89
4.3.5 Estudo da recuperação das amostras comerciais	91
4.3.6 Robustez	92
4.3.7 Aplicação	93

4.4	Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de acetilcisteína empregando sistema Ce(IV)/ferroína	97
4.4.1	Avaliação dos parâmetros químicos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas	98
4.4.2	Estudo dos parâmetros físicos do sistema em fluxo	100
4.4.3	Parâmetros analíticos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína	103
4.4.4	Estudo de interferência	103
4.4.5	Estudo da recuperação de acetilcisteína em produtos farmacêuticos.....	104
4.4.6	Robustez	105
4.4.7	Aplicação.....	106
4.5	Sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação espectrofotométrica indireta de acetilcisteína utilizando a geração química de bromo ¹²⁷	108
4.5.1	Avaliação dos parâmetros químicos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas	109
4.5.2	Estudo dos parâmetros físicos do sistema FIA	110
4.5.3	Parâmetros analíticos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína empregando bromo como reagente	112
4.5.4	Estudo de interferência	113
4.5.5	Estudo da recuperação de acetilcisteína em formulações comerciais	113
4.5.6	Robustez	114
4.5.7	Aplicações	115
5	Conclusões	117
6	Sugestões de Trabalhos Futuros	119
7	Referências Bibliográficas	121

1 Introdução

1.1 Revisão histórica

A maioria das substâncias que apresentam ação farmacológica são incolores e portanto, estudos que revelaram suas características de absorver luz somente tornaram-se possível quando, na segunda metade do século 19, foi descoberto que a interação entre vários alcalóides e outras substâncias orgânicas naturais desenvolviam cor quando tratadas com certas substâncias inorgânicas¹. Tais procedimentos desenvolvidos alavancaram o emprego nas determinações qualitativas de fármacos, sendo que algumas determinações semi-quantitativas foram dedicadas à detecção de substâncias de interesse nas análises forenses¹⁻³.

De 1900 a 1920 ocorreram os principais progressos em instrumentação óptica⁴. O aparecimento de instrumentos com partes ópticas de sílica vítrea especialmente manufaturada foi o alicerce para o desenvolvimento de procedimentos espectrofotométricos para a análise de princípios ativos, tanto qualitativo como quantitativamente⁵. Embora a instrumentação para varredura na região ultravioleta e visível do espectro estivesse disponível em 1910 e os espectros de absorção das substâncias estivessem sendo disponibilizados, a operação dos espectrofotômetros era demasiadamente morosa, sendo assim inadequados para uso em laboratórios de rotina^{3,6}.

Os fotômetros com filtros, entretanto, ampliaram a gama de aplicações da fotometria⁷. Daqueles desenvolvidos, o mais conhecido foi o fotômetro de Pulfrich no qual o feixe de radiação emergente da fonte de radiação era dividido em dois feixes de mesma intensidade; estes passam através das celas contendo a solução de amostra a ser medida e um solvente apropriado, respectivamente. Vidros coloridos foram empregados como filtros para selecionar uma faixa de comprimento de onda adequada para a determinação. A intensidade do feixe de radiação era atenuada mecanicamente, pelo uso de um diafragma calibrado, para a unidade de absorbância até que a intensidade fosse idêntica ao feixe de luz que passava através da solução de amostra na qual era monitorada pelo analista visualmente⁷. Por volta de 1941, haviam cerca de 800 trabalhos publicados no emprego em amostras clínicas que usaram este espectrofotômetro³. Medidas mais precisas e exatas, obtidas de modo confortável foram possíveis pelo acoplamento de fotocélulas para medir a intensidade da luz transmitida⁵. Uma característica desses instrumentos era que eles operavam apenas no monitoramento da radiação

transmitida na região visível do espectro, então as amostras deveriam ser convertidas em substâncias coloridas previamente à detecção.

Durante os anos 1920 e 1930, ocorreram estudos enfocados no desenvolvimento adicional e de novos testes colorimétricos qualitativos para dar suporte ao desenvolvimento de procedimentos fotométricos. Os primeiros procedimentos quantitativos foram descritos, como: a determinação de salicilato baseado na formação do complexo com Fe^{3+} (1919), a determinação de aminoácidos empregando ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (1922) e a determinação de aminas aromáticas depois da diazotização e acoplamento com β -naftol (1927)¹.

Como resultado, a fotometria tornou-se o primeiro e eficiente ramo instrumental da análise de produtos farmacêuticos, até então objetivo de procedimento volumétricos e gravimétricos¹. Procedimentos analíticos alternativos e novos procedimentos foram desenvolvidos nos anos seguintes, exemplos são apresentados na Tabela 1.1.

TABELA 1.1 Métodos espectrofotométricos de análise

analito	Reagente	Referência
Aminoácidos	1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio	<i>J. Biol. Clin.</i> , 156, 467 (1944)
Aminoácidos	Ninhidrina	<i>Analyst</i> , 80, 209 (1955)
Frutose	p-anisidina	<i>Anal. Chem.</i> , 31, 1234 (1959)
Cisteína	Formação de nitrosotiol	<i>Analyst</i> , 84, 188 (1959)

adaptado de MEITES (1963)⁸.

Um marco no desenvolvimento da espectrofotometria em análises de fármacos foi a introdução do espectrofotômetro UV-Vis Beckman DU no início dos anos 40^{1,3,6}. Anteriormente o único equipamento disponível comercialmente era o espectrofotômetro General Electric[®] Hardy, instrumento caro, de difícil operação e sua amplitude espectral restringia sua aplicação⁹. Outros dois espectrofotômetros de maior emprego, eram o espectrofotômetro Cemco e o Coleman Modelo DM^{3,6}.

O espectrofotômetro UV-Vis Beckman DU foi concebido para ser usado na maioria dos laboratórios de rotina e, depois da Segunda Guerra Mundial, seu uso

se tornou mais difundido, à medida que outros instrumentos começaram aparecer no mercado^{1,6}.

Com a propagação da técnica espectrofotométrica na faixa de radiação ultravioleta, apareceram novos procedimentos para determinação de uma enorme variedade de fármacos sem a necessidade de conversão em produtos coloridos. A diminuição do tempo de análise permitiu maior difusão desses procedimentos em análises de rotinas^{1,6}.

Os métodos espectrofotométricos foram baseados na comparação da intensidade de cor que varia com a concentração do cromóforo, diluição sofrida pela solução ou alteração no comprimento do caminho óptico da solução de amostra ou solução de referência^{1,7}. Esse tipo de análise foi denominado de análise colorimétrica e eram realizadas em instrumentos contendo filtros para seleção da região espectral. Finalmente, a aplicação de instrumentos baseado na absorção de um feixe de radiação monocromática e detector elétrico foi denominada espectrofotometria¹.

Embora a espectrofotometria possa ser classificada atualmente como método clássico de análise de fármacos, sua importância não tem diminuído com o passar dos anos^{1,10}. É verdade que suas limitações vão surgindo à medida que novas análises são requeridas, mas como resultado disso, tem-se o desenvolvimento de métodos matemáticos modernos para tratamento dos dados obtidos e o acoplamento da espectrofotometria com outros métodos, como cromatografia ou eletroforese capilar^{1,11}.

Quanto à aplicação da espectrofotometria, um espectro de absorção, perfil de absorção da radiação eletromagnética numa faixa espectral, permite a identificação de um fármaco e isto é recomendado até nas edições recentes das principais farmacopéias (Farmacopéia Americana e Britânica). Em determinadas situações, a obtenção do espectro de um fármaco em solução fornece informação com um valor similar como uma medida de outra constante física. A técnica também auxilia com informações para elucidação de estruturas químicas dos princípios ativos. Isto associados às técnicas de espectroscopia de massa, infravermelho e RMN permitem a elucidação da estrutura dos fármacos¹².

Ao contrário das técnicas anteriormente citadas, é a aplicação analítica quantitativa que torna a espectrofotometria importante na análise de fármacos. Procedimentos baseados na absorção da radiação por um fármaco ou um derivado,

originado por um tratamento químico, são extensivamente aplicados na análise de fármacos^{1,10}. Quando ocorre a falta de seletividade, essa pode ser obtida pelo acoplamento com um método cromatográfico.

1.2 Sistemas de análise por injeção em fluxo

Atualmente a necessidade de obtenção de dados de análises químicas de forma rápida e precisa é de primordial importância devido à demanda social exigida pela nossa sociedade. Dentro deste escopo, a análise por injeção em fluxo (FIA) é uma técnica analítica que supre as atuais necessidades, destacando-se ainda, o grande aumento do desempenho analítico e a capacidade do uso efetivo da instrumentação analítica com o racional gerenciamento dos reagentes químicos^{10,13,14}.

Neste amplo contexto, a análise por injeção em fluxo contínuo refere-se a um processo de automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução é introduzida em um fluido transportador que a conduz em direção ao detector¹⁵. Quando a conversão da amostra a uma espécie detectável é necessária, a amostra pode receber uma série de reagentes ou tratamentos para a sua conversão.

Segundo Motola (apud VALCARCEL e LUQUE De CASTRO)¹¹, a análise por injeção em fluxo, na suas diferentes versões, constitui uma das mais avançadas formas de manipulação de soluções disponível para químicos analíticos para misturar e transportar para o ponto de detecção, produtos de uma ou mais reações químicas.

A análise em fluxo contínuo mostra-se bastante flexível para realizar um variado número de operações necessárias na análise química clássica. Somando-se às operações que podem ser realizadas em procedimentos em batelada como aquecimento, diluição, mistura e adição de reagentes; módulos de análise em fluxo contínuo podem executar diálises, destilação, extração por solvente e outros tipos de separação^{10,13}. Deve-se destacar também a possibilidade de geração eletroquímica de reagentes nas tubulações dos módulos de análise, como agentes oxidantes ou redutores instáveis como U(III) e Ag(II), como descrito por DEN BOEF¹⁶.

Os sistemas em fluxo diferem dos métodos discretos (batelada) devido ao fato de não haver necessidade de atingir o equilíbrio químico, pois uma característica desses sistemas, além da injeção da amostra e dispersão controlada da zona de amostra, é o intervalo de tempo entre a introdução da amostra e a detecção ser altamente repetível^{13,17}.

Os sistemas em fluxos são constituídos por, a saber: uma unidade propulsora de fluidos, de inserção de amostras, de reação/mistura e de detecção, como indicado na Figura 1.1. Ainda, as unidades apresentadas podem ser controladas por uma unidade de controle, como por exemplo, microcomputador.

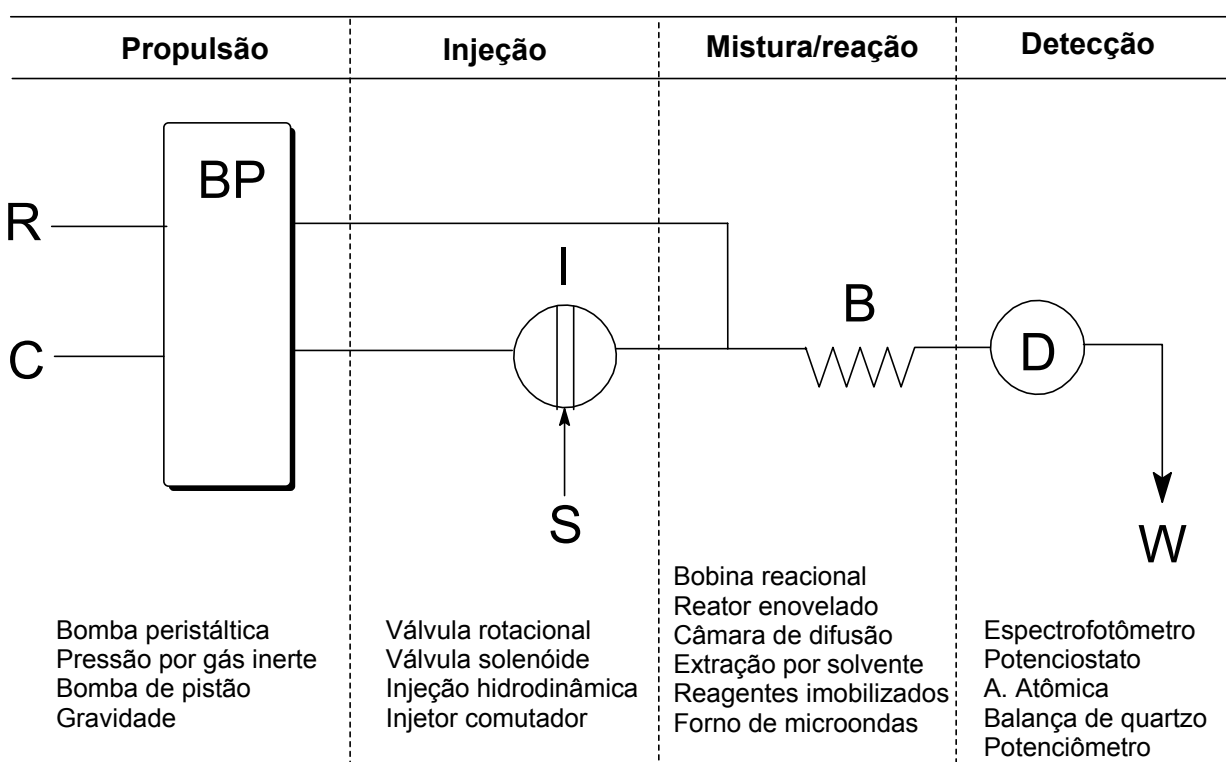


FIGURA 1.1 Esquema das unidades constituintes do sistema em fluxo. R: reagente; C: carregador; I: Injetor; S: solução de referência ou amostra; B: Bobina reacional; D: detector e W: descarte.

A unidade propulsora na maioria dos módulos de análises desenvolvidos e descritos na literatura é a bomba peristáltica. Ela permite operação de vazões de $0,1 \mu\text{L min}^{-1}$ a 10 mL min^{-1} . O emprego de dispositivos alternativos são também descritos, como exemplo a propulsão por ação da pressão de gases inertes¹⁸, bombas de pistão¹⁹, microbombas solenóides²⁰ ou mesmo a ação

gravitacional¹³. MATOS et al.²¹ propuseram a propulsão em sistema em fluxo empregando mini-compressores de ar do tipo bomba de diafragma, originalmente destinados ao borbulhamento de ar em aquários domésticos.

O dispositivo fundamental do sistema em fluxo sem dúvida é o injetor, pois o volume da solução injetada é uma importante variável pois o gradiente de concentração criado por essa amostra é a chave da informação analítica obtida no sistema¹¹. Dentre os requerimentos essenciais necessários para um sistema de análise por injeção em fluxo, o volume de amostra deve ser injetado como um plugue no carregador de maneira reproduzível sem causar distúrbios no fluxo. Inicialmente, foi realizada com o uso de seringas hipodérmicas em um septo acoplado a um sistema hidráulico que conduzia ao detector¹³. Com o desenvolvimento da metodologia, a seringa cedeu lugar às válvulas rotatórias, nas quais uma alça tubular (ou loop) de volume fixo é preenchida com a amostra e, após a rotação da válvula, a alça é intercalada no circuito de fluxo e descarregada por deslocamento em direção à bobina de reação e/ou outros dispositivos que precedem o detector. Entre as inúmeras contribuições dos pesquisadores brasileiros, destaca-se um injetor deslizante acionado por válvulas solenóides^{11,22}, bem como o desenvolvimento de uma versão simples e robusta que permitiram a concepção de diversas configurações do módulo de análise, característica inerente aos sistemas em fluxos²³. Um dispositivo simples e robusto construído com três válvulas solenóides de três vias, com um circuito temporizador foi descrito e aplicado na determinação de Cr(VI) e NH₃ com destacável repetibilidade²⁴.

O percurso analítico é a unidade do sistema em fluxo onde ocorrem as mistura e/ou reações necessárias para detecção. Sua composição não é complexa em sistema em fluxo com configurações de linha única, coalescência ou confluência. Em módulos que requeiram algum tratamento da amostra, podem-se acoplar unidades de aquecimento como banhos com temperatura controlada, sem dúvida o mais usado, bem como fornos de microondas²⁵⁻²⁷. O emprego de reagentes imobilizados em suporte sólidos têm sido bastante empregado, bem como câmaras de diluição, de extração por solventes¹³ entre outros. Reator contendo espuma poliuretana foi acoplado no percurso analítico de um sistema em fluxo proposto para eliminação da interferência ocasionada por metais, Fe(II), Cu(II) e Co(II), na determinação de Al(III)²⁸.

Unidades para fotodegradação em linha dos resíduos gerados em sistemas em fluxo desenvolvidos para determinação de resorcinol²⁹ e pesticida da classe dos carbamatos³⁰ foram descritos, promovendo a mineralização dos produtos das reações empregando a associação entre radiação UV e TiO₂ (anatase).

A unidade responsável pela detecção descrita nos sistemas em fluxo são as mais diversificadas, característica inerente à análise por injeção em fluxo. De acordo com a espécie a ser detectada, praticamente todas as técnicas usuais têm sido empregadas^{10,11}, como espectrofotometria no UV-Vis³¹, absorção e emissão atômica³², potenciometria³³, condutometria, voltametria, quimiluminescência^{34,35}, entre outros em menor expressão, como detectores piezelétricos^{36,37}. Ainda, um espectrofotômetro convencional pode ser empregado com sucesso como detector da radiação produzida em uma reação quimiluminescente^{38,39}.

No caso de sistemas que possuem detecção espectrofotométrica, alguns trabalhos descritos na literatura priorizam o desenvolvimento de celas de fluxo de baixo custo, visando obter melhorias em suas características analíticas. OLIVEIRA *et al.*⁴⁰ desenvolveram uma cela de fluxo de camada delgada que possibilitou o emprego de uma solução de reagente diluída 2,5 vezes na determinação de Cr(IV) com um tempo de limpeza muito menor, quando comparada à cela de fluxo comercial.

1.2.1 Automação em laboratórios químicos

A grande vantagem na utilização de sistemas em fluxo é a possibilidade de alternar o sistema de detecção de maneira simples, podendo usar o mesmo sistema físico para quantificação de diversos analitos. Recentes trabalhos descritos na literatura destacam outra característica de grande importância, a possibilidade de detecção simultânea de princípios farmacêuticos associados, devido a aquisição de dados computacionais, na qual a determinação simultânea dos fármacos é realizada empregando métodos matemáticos^{32,41-43}.

A agência ambiental americana (EPA)⁴⁴ recomenda um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica para determinação de cianeto em águas (método OIA-1677), baseado na injeção da amostra contendo cianeto em um fluxo, que ao receber por confluência solução de HCl, converte o

cianeto a ácido cianídrico (HCN) que permeia através de uma câmara de difusão para um fluido receptor alcalino que converte o HCN a íon cianeto (CN^-). A quantidade de cianeto no fluxo alcalino é detectada amperometricamente empregando um eletrodo de trabalho de prata, um eletrodo de referência de Ag/AgCl e um contra-eletrodo de platina e potencial de trabalho de 0 Volt. A corrente gerada na cela é proporcional à concentração de cianeto na amostra. A agência estabelece esse procedimento como oficial destacando dois itens importantes para a segurança do analista: (i) reduzida formação de HCN, quando comparado com métodos convencionais de determinação; (ii) diminuição da quantidade de reagentes tóxicos por determinação. Ainda, a maior seletividade desse procedimento, a melhor exatidão e precisão quando comparado com métodos convencionais e menor tempo de análise contribuem para a inserção desse procedimento em fluxo como método oficial.

Os Métodos Padrão para Águas e Águas Residuárias⁴⁵ também recomenda o procedimentos analíticos automatizados para determinação de cátions (Al^{3+} e NH_4^+) e ânions (Cl^- , F^- , SO_4^{2-} , NO_3^- e HPO_4^{2-}). Os procedimentos descritos são indicados para serem usados empregando sistema em fluxo comercial da Technicon[®] Autoanalyser[®] ou configuração equivalente.

O emprego de sistemas de análise por injeção em fluxo na análise de produtos farmacêuticos também tem mostrado a eficácia da automação de procedimentos analitos, somando-se à diminuição de custos, isto é, a possibilidade de realizar um grande número de análises em um menor espaço de tempo, com baixo consumo de reagente, quando comparado com procedimentos em bateladas. Algumas configurações de sistemas em fluxo têm sido propostas na quantificação de produtos farmacêuticos em laboratórios de rotina. A Farmacopéia Americana descreve alguns sistemas para determinação de algumas substâncias⁴⁶. Um sistema em fluxo segmentado com detecção espectrofotométrica baseado na reação de antibióticos com estrutura β -lactana, como cefalosporinas e penicilinas, com hidroxilaminas e íons férrico foi descrito. Outro sistema segmentado é indicado para determinação indireta de iodeto empregando a reação com ácido arsenoso e Ce(IV) ⁴⁶.

O número elevado de aplicações dessa metodologia descritas na literatura, emprega detecção espectrofotométrica, como um resultado lógico da alta flexibilidade desta técnica para contornar problemas analíticos³¹. Nesses sistemas,

reações de óxido-redução, de complexação, de derivatização entre outras são geralmente empregadas, sendo o produto formado ou o consumo de reagente monitorado espectrofotometricamente em comprimento de onda apropriado^{10,31}.

1.3 Sistema de análise por injeção em fluxo reverso (r-FIA)

O sistema de análise por injeção em fluxo reverso foi inicialmente proposto por JOHNSON e PETTY⁴⁷. Neste sistema, ocorre à inversão entre a solução de reagente e solução de referência/amostras. Originalmente foi elaborado para determinação de fosfato empregando o método de azul de molibdênio em águas marinhas aspiradas continuamente por um analisador oceanográfico^{13,47}.

Sistemas r-FIA têm como principais vantagens sobre outras configurações o aumento da sensibilidade e a economia de reagentes^{11,13,47}. Isso se deve principalmente ao fato de quando se emprega a amostra como carregador, a concentração da amostra na zona de reagente dispersa aumenta com o aumento da dispersão. O contrário ocorre em sistemas em fluxo contínuo, pois o aumento da dispersão da zona de amostra resulta numa diminuição da concentração do analito em questão^{11,47}. O volume de amostra disponível para análise é um fator crítico para seu emprego^{11,13}.

1.4 Fotodecomposição assistida por radiação ultravioleta

O emprego de processos oxidativos avançados (POA) possui grande aplicação na área de pesquisa ambiental em que são utilizados com sucesso na degradação de substâncias orgânicas presentes em amostras de águas naturais e residuárias⁴⁸.

Uma variedade de sistemas químicos tem sido descrita para tratamento de resíduos empregando a reação de Fenton⁴⁸⁻⁵⁰, fotocatalise heterogênea, que emprega o TiO₂ (anatase)^{29,48,51}, a reação fotofenton^{48,52,53}. Recentemente, estudos indicam que a associação de radiação UV em combinação com H₂O₂ em presença de Fe²⁺, conhecida como fotofenton, acentua significativamente a decomposição de compostos refratários orgânicos⁵³.

A combinação da radiação ultravioleta e H_2O_2 na degradação de fenol mostrou-se mais efetiva quando comparada com a fotólise e oxidação com peróxido de hidrogênio⁵⁴, indicando que esse processo produz uma quantidade maior de radicais hidroxilas que promovem a degradação.

A degradação de herbicidas da classe acetanilida foi avaliada por FRIEDMAN *et al.*⁵⁰ empregando um processo anódico Fenton, onde a geração de radicais é promovida pela geração eletrolítica de Fe^{2+} que reage com solução de H_2O_2 .

A fotólise empregando radiação ultravioleta combinada com peróxido de hidrogênio é um dos mais importantes processos oxidativos avançados para remoção de substâncias orgânicas tóxicas. Este processo envolve a geração de radicais hidroxilas, altamente reativos, que são capazes de mineralizar contaminantes orgânicos, como fenol⁴⁸, resíduos de indústrias de curtimento de couro⁴⁹ e soluções contendo benzeno, tolueno e xilenos⁵⁵.

Radiação com comprimentos menores⁴⁹ que 400 nm são hábeis para fotolisar moléculas de H_2O_2 . O mecanismo aceito para a fotólise é a quebra da molécula em dois radicais hidroxilas (equação 1, Tabela 1.2). Outras reações podem ocorrer, de acordo com as condições, como mostradas na Tabela 1.2.

TABELA 1.2 Reações químicas envolvendo a geração de radicais hidroxila empregando peróxido e radiação ultravioleta⁴⁹

$\text{H}_2\text{O}_2 + h\nu \rightarrow 2 \cdot\text{OH}$	(1)
$\text{H}_2\text{O}_2 + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HO}_2\cdot$	(2)
$\cdot\text{OH} + \text{HO}_2\cdot \rightarrow \text{HO}_2\cdot + \text{OH}^-$	(3)
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HO}_2\cdot \rightarrow \text{HO}\cdot + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	(4)

1.5 Furosemida

1.5.1 Aspectos gerais

Furosemida é solúvel em acetona e em soluções de hidróxidos alcalinos; é ligeiramente solúvel em álcool, levemente solúvel em éter, altamente solúvel em clorofórmio e praticamente insolúvel em água⁵⁶.

A furosemida (**I**) é susceptível à hidrólise ácida, na qual o nitrogênio do grupamento amino protonado, seguido de um ataque nucleofílico sobre o carbono do grupamento furfúril para resultar no produto da hidrólise, a saluamina (**II**). O logaritmo da constante de velocidade em função do pH do meio reacional ($\log k$ vs. pH) revelou que a catálise é efetiva em soluções ácidas ($\text{pH} < 6$). Pode-se aumentar a estabilidade da solução contendo furosemida pela adição de álcool⁵⁷.

A degradação da furosemida (**I**) ocorre seguindo esquema mostrado na Figura 1.2, onde (**II**) é a saluamina e (**III**) indica espécies furfúril^{58,59}.

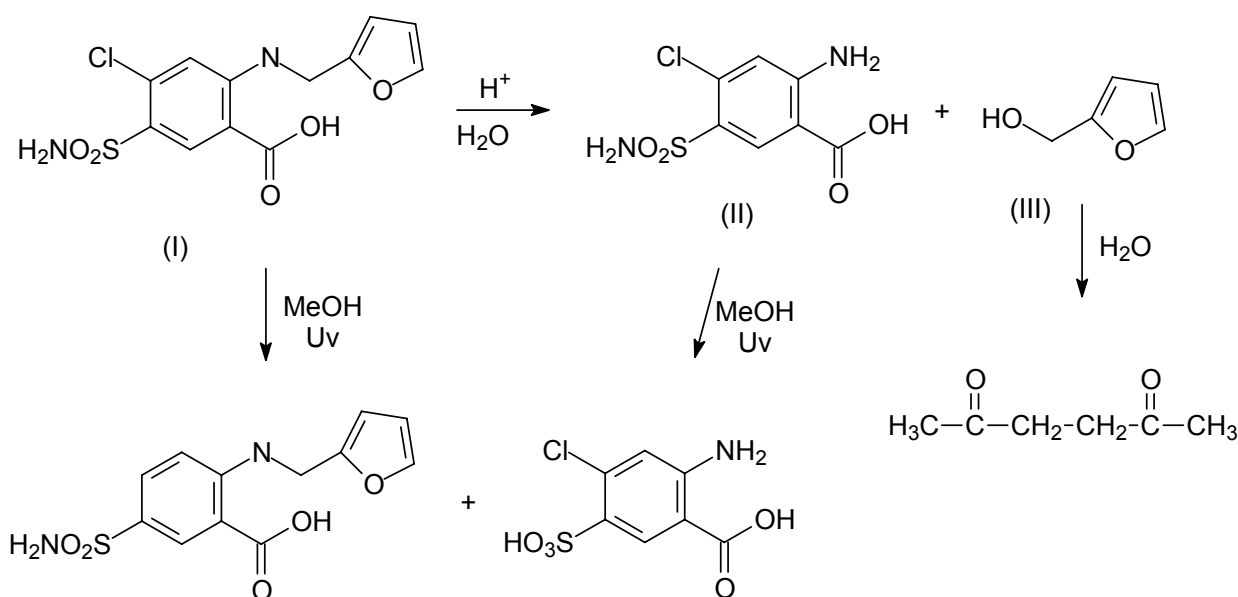


FIGURA 1.2 Reações envolvidas na degradação da furosemida em solução aquosa⁵⁸. (I) Furosemida; (II) Saluamina; (III) espécie furfúril; MeOH: metanol e Uv: radiação ultravioleta.

1.5.2 Propriedades farmacológicas

A furosemida (ácido 4-cloro-N-furfúril-5-sulfamóil-antranílico) é uma substância pertencente à classe dos diuréticos, um grupo de substâncias usadas para ajustar a composição e volume dos fluídos corporais em numerosos casos de doenças como insuficiências cardíacas, renais e hepáticas, cirrose, bem como, no tratamento de hipertensão. Do ponto de vista farmacológico, são drogas que além de aumentarem o volume urinário, aumentam também a excreção urinária de sódio por uma ação direta sobre o rim^{60,61}.

Não existe uma classificação ideal para as substâncias pertencentes à classe dos diuréticos devido à falta de conhecimentos das bases moleculares do transporte de íons no néfron. A avaliação da estrutura química também não fornece elementos básicos para a compreensão do mecanismo, do local de ação e do emprego clínico dessas drogas. Dessa forma, os diuréticos sulfonamídicos podem ser divididos em inibidores da anidrase carbônica, tiazídicos e furosemida, cada um com diferentes efeitos sobre a composição da urina e com diferentes locais de ação⁶¹.

Os diuréticos podem determinar o aumento do fluxo urinário e da excreção do sódio por dois processos, a saber: a) aumento do fluxo de fluido filtrado; b) diminuição da reabsorção tubular de sódio e água.

O mecanismo de ação se baseia na inibição da reabsorção de cloreto de sódio na porção ascendente da alça de Henle (sistema de co-transporte $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{K}^+$). A inibição desse sistema de transporte previne a reabsorção desses íons e uma diurese ocorre⁶¹.

A furosemida quando administrada por via oral é absorvida rapidamente dentro de 5 a 10 minutos. O início da ação desse diurético é rápido quando administrada via venosa, sendo de 1 a 5 minutos.

Quando administrada em doses máximas, chega a determinar a excreção de 30% da carga filtrada de sódio. Simultaneamente à perda de Na^+ (*natriurese*), ocorre também um aumento na excreção de potássio, embora a relação de Na^+/K^+ seja maior devido à perda de Na^+ . Por isso, alguns produtos farmacêuticos comerciais contendo furosemida contêm KCl associado, como o Lasix[®]. Com relação aos íons cálcio e ao magnésio, a furosemida aumenta a excreção destes cátions proporcionalmente a natriurese^{61,62}.

A furosemida é atualmente empregada em algumas situações clínicas: a) na retenção de sódio, b) no edema agudo do pulmão, c) na insuficiência renal crônica, d) na hipertensão arterial, e) na insuficiência renal crônica, f) em intoxicações exógenas, g) no caso de hipercalcemia e h) no *diabetes insipidus*.

1.5.3 Alguns métodos para a determinação de furosemida

A maioria dos procedimentos analíticos para determinação de sulfonamidas é baseada em reações químicas, que têm como alvo o grupo amino primário da molécula. O procedimento amplamente empregado é baseado na formação de um sal de diazônio seguido pela reação com uma substância adequada para formação de um cromóforo azo, sendo esta reação a mais empregada nos procedimentos analíticos com maior seletividade e sensibilidade para a determinação de furosemida em produtos farmacêuticos e amostras clínicas¹.

A Farmacopéia Internacional⁶³ recomenda a volumetria como procedimento para quantificação de furosemida. O procedimento descrito emprega o azul de bromotimol em dimetilformamida como indicador e a solução de amostra é titulada com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

O par iônico furosemida-Aliquat[®] foi imobilizado por DIAS *et al.*⁶⁴ em uma membrana de cloreto de polivinila (PVC) para a determinação potenciométrica de furosemida em formulações farmacêuticas. O eletrodo exibiu uma resposta linear entre $1,6 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

BASAVIAH *et al.*⁶⁵ empregaram a reação de furosemida com uma solução de bromo e indicador alaranjado de metila, para a determinação do analito em formulações farmacêuticas. O procedimento volumétrico desenvolvido com detecção visual do ponto final de viragem apresentou uma linearidade entre uma variação de massa de 2 a 20 mg. Já o procedimento espectrofotométrico apresentou uma curva analítica com linearidade entre 0,25-3,50 µg mL⁻¹.

ABDELHAY⁶⁶ desenvolveu um procedimento espectrofotométrico derivativo para a determinação de furosemida na presença de seu produto de degradação, a saluamina. O procedimento envolveu a medida de absorvância empregando a curva da primeira derivada em 254 e 262 nm (sinal zero para saluamina) e, a absorvância da curva da segunda derivada em 265 e 272 nm (sinal zero para a furosemida) para a determinação da saluamina.

GARCIA *et al.*⁶⁷ empregaram a reação entre a furosemida com Pd²⁺ para desenvolver um procedimento em fluxo com detecção espectrofotométrica para a quantificação de furosemida em formulações farmacêuticas. O complexo foi obtido entre a furosemida e Pd²⁺ a 55°C e foi monitorado espectrofotometricamente em 550

nm. O procedimento apresentou uma curva analítica linear entre $2,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

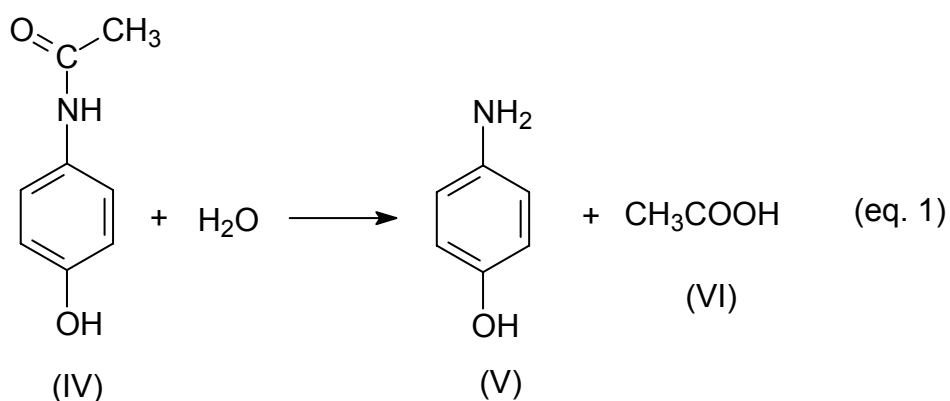
GOTARDO *et al.*⁶⁸ empregaram a reação da furosemida com p-dimetilaminocinamaldeído, em meio ácido, para o desenvolvimento de um procedimento analítico empregando a técnica de refletância difusa. A reação entre essas duas substâncias a 80°C produz um cromóforo sob um papel de filtro que pode ser medido em 585 nm. O procedimento apresentou uma curva analítica com uma faixa linear de concentração entre $7,6 \times 10^{-3}$ a $6,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ do fármaco.

1.6 Paracetamol

1.6.1 Aspectos gerais

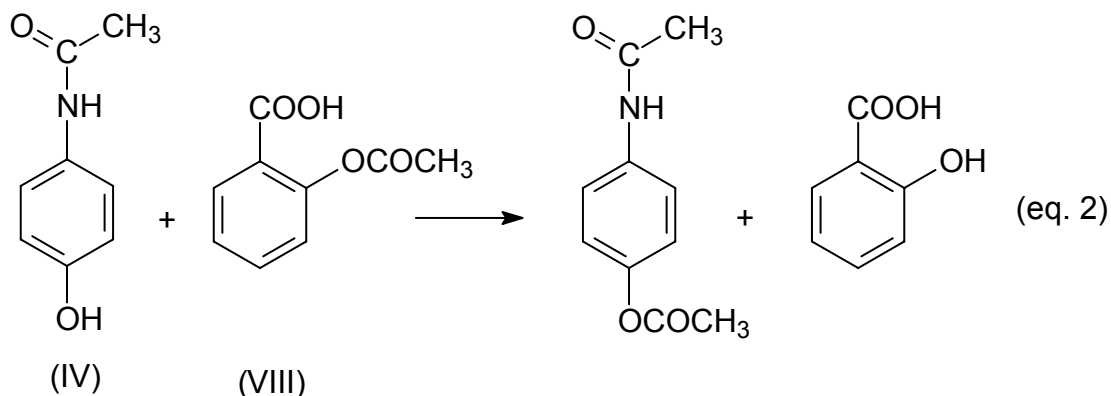
Cristal branco inodoro ou pó cristalino. Sua solubilidade é de 1 g em 70 mL de água a 25°C, 7 mL de álcool, 13 mL de acetona 40 mL de glicerina e 9 mL de propilenoglicol. É insolúvel em benzeno e éter, e solúvel em solução de hidróxido de metal alcalino^{56,69}. Apresenta estabilidade em solução aquosa, na qual o máximo de estabilidade ocorre em pH 6-7⁵⁶.

A principal rota de degradação que contribui para a instabilidade do paracetamol (IV) é a sua hidrólise que produz p-aminofenol (V) e ácido acético (VI). A reação de hidrólise (equação 1) é catalisada por ácidos ou bases⁵⁶.



A reação entre o paracetamol (IV) e a aspirina (VIII) foi descrita nos comprimidos sólidos, tendo como produto ácido salicílico e diacetil-p-aminofenol (equação 2). Estudos posteriores não observaram o mesmo comportamento. A

estabilidade foi diminuída com aumento da concentração na mistura, temperatura, presença de codeína fosfato e estearato de magnésio. Cafeína não contribui para o aumento da instabilidade da mistura de aspirina-paracetamol⁵⁶.



Foi encontrado que o paracetamol forma estruturas moleculares com estequiometria 1:1 com antipirina e cafeína e teofilina, mas não com teobromina, quando associados em forma sólida (comprimidos). Essa complexação aumenta a solubilidade do paracetamol. Foi verificada ainda, a formação de complexos de paracetamol com polietilenoglicol 4000 (PEG4000) e polivinilpirrolidona (PVP). Essa complexação aumenta a solubilidade em água e a velocidade de dissolução do paracetamol, sendo maior para mistura de paracetamol-PEG em proporção 1:2 m/m⁵⁶.

As aminas alifáticas primárias reagem com HNO₂, com formação de sais de diazônio; como, porém os sais de diazônio alifáticos são poucos estáveis e, ao decompor-se, dão origem a misturas complexas⁷⁰. As aminas secundárias, tanto alifáticas como aromáticas, reagem com ácido nitroso com formação de N-nitrosaminas.

A nitroação do anel é uma reação de substituição aromática eletrofílica, em que o íon nitrosilo (⁺NO), ou uma espécie (como H₂O⁺-NO) pode transferir para o anel benzênico o grupamento ⁺NO. O íon nitrosilo é eletrófilo muito fraco, em comparação com os agentes responsáveis pela nitração, sulfonação, halogenação; normalmente a nitroação dá-se apenas em anéis portadores de dialquilamínicos (-NR₂) ou nos grupo hidroxila (OH) fortemente ativados⁷⁰.

1.6.2 Propriedades farmacológicas

Paracetamol (acetaminofenol, N-acetil-p-aminofenol) é um analgésico-antipirético pertencente à classe dos derivados do p-aminofenol, introduzido no século passado como resultado de pesquisas destinadas a substitutos para acetanilida. Embora possuam propriedades analgésicas-antipiréticas, a fenacetina e a acetanilida dão origem a metemoglobina (hemoglobina incapaz de transportar oxigênio), devido à formação de um precursor da anilina. Tanto a acetanilida quanto a fenacetina são metabolizadas a paracetamol, a substância ativa. Outros fármacos dessa classe são a anidoxina, butacetina, etoxazena, fenacetinol, parapropamol e parsalmida^{71,72}.

O paracetamol não tem atividade antiinflamatória, mas mesmo assim é provavelmente o antipirético-analgésico de segunda escolha, sobretudo para pacientes alérgicos ao ácido acetilsalicílico ou que sofrem de úlceras pépticas. Por ser menos tóxico que a fenacetina, o paracetamol acabou substituindo-a em diversas formulações farmacêuticas, sendo habitual administrar doses diárias variando de 650mg a 4g por dia, em doses divididas⁷². Ainda, não apresenta os efeitos colaterais da aspirina (ácido acetilsalicílico) e pode ser adquirido no comércio sem prescrição médica, o que o torna um fármaco de crescente uso doméstico. Esta tem sido uma das principais preocupações da ANVISA⁷³. Medicamentos com ação analgésica e antipirética são utilizados tanto para o controle da dor quanto para baixar a temperatura corpórea em casos de febre. Estas indicações favorecem a automedicação, principalmente durante o verão, período do ano onde ocorrem tanto casos de dengue quanto outra virose infantil.

Em um levantamento realizado no Hospital Ocidental da Austrália envolvendo o número de internações devido à intoxicação por analgésicos, o paracetamol foi a substância mais encontrada, correspondendo a 19,3 %, o ibuprofeno foi responsável por 2% das internações e 1% foi a porcentagem relativa a aspirina⁷⁴.

Contudo, a superdosagem aguda causa lesões hepáticas fatais⁶². Quando administrado em altas doses, aproximadamente 250 mg kg⁻¹, pode exibir toxicidade resultante do principal metabólito N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI)⁷⁵. O mecanismo proposto (Figura 1.3) para ativação metabólica ocorre através da oxidação do paracetamol no grupamento amino a N-hidroxiacetoaminofenol, seguida

pela formação do NAPQI. A NAPQI, uma substância altamente eletrofílica, pode reagir facilmente com glutatona ou grupamento tiol das proteínas.

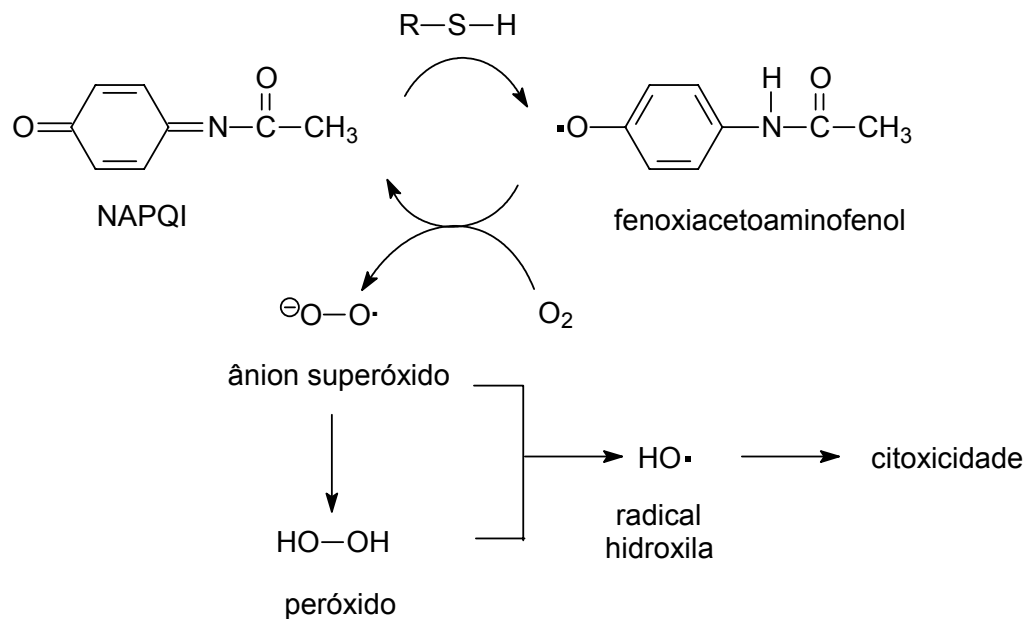


FIGURA 1.3 Mecanismo reacional mostrando a citotoxicidade do paracetamol quando ingerida em grandes quantidades⁷⁵.

O mecanismo da hepatotoxicidade deve-se ao fato do NAPQI ser capaz de oxidar grupamentos tíois, sofrendo assim um ciclo redox com a formação de ânions superóxidos por meio de redução com oxigênio. Esta etapa de redução acaba produzindo peróxidos e por final radical hidroxilas ($\cdot\text{OH}$), que é forte oxidante implicado no *stress* oxidativo celular⁷⁵.

1.6.3 Métodos de determinação de paracetamol

1.6.3.1 Medida espectrofotométrica direta

Na literatura existem alguns procedimentos que descrevem a determinação de paracetamol pela medida intrínseca do analito¹.

Formulações farmacêuticas disponíveis comercialmente podem não apenas conter paracetamol como único princípio ativo. Vários produtos comerciais contêm outros princípios ativos associados ao paracetamol como potencializador de seus efeitos, ou com outras finalidades. Em várias formulações farmacêuticas

encontram-se diferentes princípios ativos sendo a determinação por espectrofotometria de absorção na região do UV é dificultada pela sobreposição das bandas¹.

A resolução entre ácido acetilsalicílico, paracetamol e salicilamida, bem como a determinação de cafeína, L-ácido ascórbico, antioxidante (hidroxianisola butilada), sedativos e hipnóticos (fenobarbital e secobarbital) e ainda, anti-histamínicos (prometazina) pode ser realizada empregando o método da 4^a derivada do espectro⁷⁶.

A curva da 2^a derivada do espectro de absorção foi empregada para a determinação de paracetamol em formulações contendo cafeína e propifenazona associados, observando a amplitude do sinal em 230 nm (sinal zero para propifenazona e cafeína). Para os outros analitos, foi necessária a correção da amplitude do pico⁷⁷.

ERK e ONUR (1997)⁷⁸ efetuaram a determinação de paracetamol e analgina associados em formulações farmacêuticas utilizando a espectrofotometria derivativa na região do UV. A determinação pode ser realizada tomando-se a amplitude do espectro em 249,2 nm e 264,8 nm, para analgina e paracetamol, respectivamente.

As determinações simultâneas de paracetamol associado à cafeína e ácido acetilsalicílico puderam ser efetuadas utilizando medidas espectrofotométricas na região entre 210 a 300 nm. A eliminação da interferência pode ser realizada baseando-se na calibração multivariada empregando métodos dos mínimos quadrados parciais⁷⁹.

ERK *et al.*⁸⁰ estudaram a determinação simultânea de paracetamol e metocarbamol, associados em comprimidos. As medidas foram feitas empregando-se a amplitude obtida em 243 nm (paracetamol) e 230 nm (metocarbamol) da primeira derivada do espectro obtido.

Grande número de procedimentos analíticos empregando sistemas de análise por injeção em fluxo contendo acoplado suportes sólidos na cela de detecção (optossensores) e detecção na região ultravioleta foram descritos. Estes sistemas em fluxos propostos permitiram a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas contendo substâncias associadas, como: (i) cafeína⁸¹ (ii) salicilamida⁸², (iii) ácido ascórbico⁸³, (iv) cafeína e ácido acetilsalicílico⁸⁴ e (v) cafeína

e propifenazona ⁴². As figuras de méritos desses sistema em fluxo contendo optossensores acoplados estão mostradas na Tabela 1.3.

Dois sistemas em fluxos baseados na absorção de radiação intrínseca do paracetamol na faixa espectral do infravermelho foram desenvolvido⁸⁵. Um sistema em fluxo proposto empregou a configuração convencional e outro com parada de fluxo. As análises foram realizadas empregando-se solução de etanol 10% v/v em clorofórmio e medidas em 1515 cm^{-1} , usando como linha base à absorbância em 1900 cm^{-1} . O limite de detecção obtido foi de $33\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ e $8\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, para o sistema FIA em modo normal e com parada de fluxo, respectivamente.

A fluorescência nativa do paracetamol pode ser empregada para a sua determinação em formulações farmacêuticas. As medidas de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 333\text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 382\text{ nm}$) foram feitas diretamente sobre as amostras depois de pulverizadas. A intensidade de fluorescência apresentou-se linear na faixa de concentração 100 a 400 mg g^{-1} . O limite de detecção variou entre 13 a $16,7\text{ mg g}^{-1}$ para amostras com diferentes proporções de excipientes ⁸⁶.

TABELA 1.3 Figuras de méritos de sistemas em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de paracetamol empregando optossensores.

Concomitante	Eluente	RSD/%	Limite de detecção / mol L ⁻¹	Linearidade / mol L ⁻¹	Frequência de amostragem / h ⁻¹	Ref.
Cafeína e propifenazona	metanol/água (10% e 50% v.v ⁻¹)	>2	4,9x10 ⁻⁵	1,6x10 ⁻⁴ a 2,31x10 ⁻³	11	42
cafeína	água/metanol 10% v/v	0,5-2,1 ^a	5x10 ⁻⁶ e 1,3x10 ⁻⁵ (a)	6,6x10 ⁻⁵ a 1,01x10 ⁻³	15 e 20 ^a	81
Salicilamida		0,60		1,6x10 ⁻⁵ a 2,6x10 ⁻⁴	36	82
Ácido ascórbico	Tampão acetato (pH 5-6) e 0,05 mol L ⁻¹ NaCl (pH 12,5)	1,5	1,4x10 ⁻⁷	2,6x10 ⁻⁶ a 1,6x10 ⁻⁴	30	83
Ácido acetilsalicílico e cafeína	HClO ₄ 0,5 % v/v (pH 1)					87
(-)	0,08 mol L ⁻¹ NaCl (pH 11)	1,24	1,44x10 ⁻⁷	3,3x10 ⁻⁶ a 5,3x10 ⁻⁵	40	88

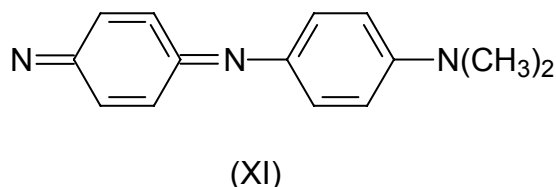
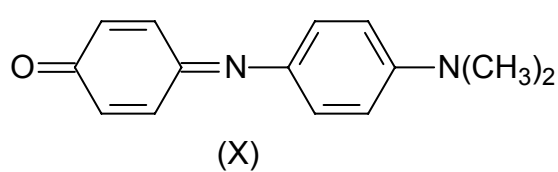
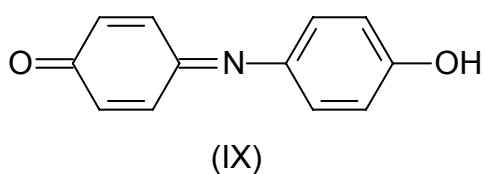
^asolução NaOH pH 12,0.

1.6.3.2 Derivatização pela oxidação

Muitos procedimentos para a análise de princípios ativos em formulações farmacêuticas são baseados na reação de oxidação do fármaco, com o subsequente monitoramento do produto oxidado (que apresenta absorção) ou do excesso de reagente. Vários são os agentes oxidantes empregados para essa finalidade, a saber: hexacianoferrato(III) de potássio, Ce(IV), dicromato, iodato, periodato, iodo (I_2), MnO_2 e PbO_2 . Também são encontrados agentes com médio poder oxidante como 2-iodilbenzoato, cloramina T e íon $Fe(III)^{1,2,10}$.

Uma estratégia para aumentar a sensibilidade em procedimentos analíticos é empregar reagentes para a conversão da espécie de interesse em uma forma que permita a medida de absorção da radiação com maior sensibilidade/seletividade, isto é, obter uma substância como produto que apresente maior absorvidade molar (ϵ)⁸⁹.

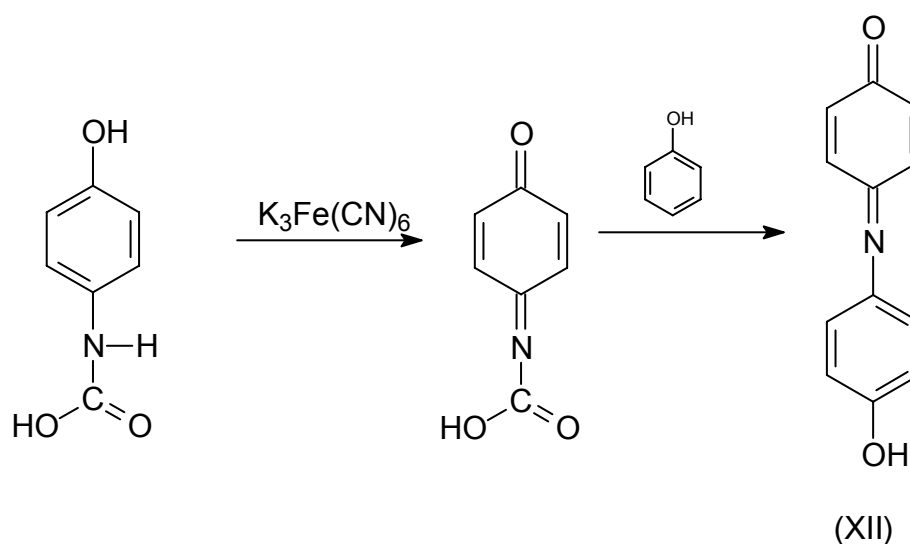
Nesse sentido, a reação de uma mistura de *p*-diamina aromática (*p*-difenilenodiamina, *N,N*-dialquil-*p*-fenilenodiamina) ou um aminofenol (*o*-, *m*-, *p*-aminofenol, metol) com um componente da reação, um fenol (ou arilamina) e um agente oxidante apropriado ($K_3Fe(CN)_6$, $K_2S_2O_8$, cloramina T, KIO_4 , $FeCl_3$, 2-iodilbenzoato, *N*-cloro ou bromosuccinimida)² produz um composto indofenólico (**IX**), indoanilina (**X**) ou indoaminas (**XI**), que apresenta alta absorvidade molar.



A oxidação do paracetamol a *N*-acetil-*p*-bezoquinona imina por hexacianoferrato(III) de potássio foi empregada para a determinação direta de paracetamol em um espectrofluorímetro acoplado a um sistema de análise por injeção em fluxo⁹⁰. O produto da reação de oxidação apresenta fluorescência no

comprimento de onda de 426 nm, após ter sido excitado em 241 nm. A medida da variação da intensidade de fluorescência do produto permitiu a determinação do fármaco em uma faixa de concentração de paracetamol entre 0,5 a 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de paracetamol foi desenvolvido empregando-se como oxidante hexacianoferrato de potássio e subsequente reação do produto (N-acetil-*p*-bezoquinona imina) com fenol em meio amoniacal a 80°C para produzir a N-(*p*-hidroxifenil)-*p*-bezoquinona imina (XII), um cromóforo que absorve em 660 nm. Esse procedimento permitiu a determinação desse analito em formulações contendo substâncias concomitantes como a salicilamida e a cafeína⁹¹.



A oxidação do paracetamol com hipoclorito foi empregada na determinação desse analito utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica⁹². No sistema desenvolvido, em que substituiu-se o reagente tóxico fenol por salicilato de sódio, a solução injetada contendo paracetamol recebeu por coalescência uma solução de NaClO . Após a bobina reacional uma solução de salicilato de sódio em meio alcalino reagiu com a zona de amostra. O produto da reação N-[*p*-hidroxifenil]-*p*-benzoquinona imina foi monitorado espectrofotometricamente em 640 nm.

Um sistema de análise por injeção em fluxo contínuo para a determinação indireta de paracetamol empregando o sistema quimiluminescente luminol- H_2O_2 - $[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, cuja radiação emitida foi proporcional à concentração de paracetamol na solução injetada foi proposto por ALAPONT *et al.*⁹³. O paracetamol

foi oxidado pelo hexacianoferrato(III) e o excesso do reagente foi determinado pelo aumento da magnitude da quimiluminescência da reação entre H_2O_2 , luminol e $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ do qual participa como catalisador. Os dados do estudo de recuperação das três amostras (uma sólida e duas líquidas) analisadas não foram apresentados.

Permanganato foi empregado como agente oxidante em um sistema para a determinação de paracetamol utilizando detecção quimiluminescente⁹⁴. O paracetamol foi consumido pelo oxidante ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$; $1,7 \text{ mL min}^{-1}$) e seu excesso foi monitorado pela reação com luminol ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$; $1,7 \text{ mL min}^{-1}$). Dessa maneira, a queda do sinal quimiluminescente foi proporcional a concentração do paracetamol em solução. A faixa linear obtida foi entre $2,5 \times 10^{-8}$ a $2,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. O desvio padrão relativo para uma solução de paracetamol contendo $1,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ foi de 2,3% ($n=12$). A faixa de recuperação obtida com o procedimento desenvolvido variou entre 98,2 a 104,4% nas amostras analisadas.

A formação de uma substância que apresente fluorescência é uma estratégia empregada para o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação do paracetamol⁹⁵. O método baseia-se na formação de uma substância coumarínica obtida pela reação entre o paracetamol e etil acetoacetato em meio de ácido sulfúrico. A substância formada apresenta acentuada fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 446 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 478 \text{ nm}$). A curva analítica foi linear para uma faixa de concentração entre $0,1$ a $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, com um limite de detecção de 57 ng mL^{-1} .

Um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica foi proposto por VERMA *et al.*⁹⁶ empregando 2-iodilbenzoato como agente oxidante. O produto da reação (N-acetil-1,4-benzoquinona imina) foi monitorado em 445 nm . O estudo da recuperação variou entre 96,3 a 105,2% nas amostras analisadas. O desvio padrão relativo variou entre 0,5 a 2% e uma frequência de amostragem de 360 amostras por hora foi obtida.

MARTÍNEZ-CALATAYUD e BENITO³¹ desenvolveram um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofluométrica para determinação do paracetamol. Neste sistema, o paracetamol reage com hexacianoferrato(III) imobilizado em resina aniônica e o produto da reação fluorescente foi detectado.

TABELA 1.4 Figuras de méritos de sistemas em fluxo para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas.

Detecção	reagente	Linearidade / mol L ⁻¹	Limite de detecção / mol L ⁻¹	RSD / %	Frequência de amostragem / h ⁻¹	Ref.
Quimiluminescente	KMnO ₄ /luminol	2,5x10 ⁻⁸ a 2,5x10 ⁻⁷	1,0x10 ⁻⁸	2,3	17	11
Espectrofotométrica	[Fe(CN) ₆] ³⁻ /fenol	1,6x10 ⁻⁶ a 2x10 ⁻⁴	ND	0,4	26	91
Espectrofotométrica	[Fe(CN) ₆] ³⁻ /ácido salicílico	3,3x10 ⁻⁶ a 6,6x10 ⁻⁴	1,6x10 ⁻⁶	< 1	80	92
Quimiluminescente	luminol-H ₂ O ₂ -[Fe(CN) ₆] ³⁻	1,6x10 ⁻⁵ a 8,3x10 ⁻⁵	1,4x10 ⁻⁵	2,2	87	93
Espectrofotométrica	2-iodilbenzoato	5,3x10 ⁻⁶ a 6,6x10 ⁻⁴	2,0x10 ⁻⁶	0,5-2,0	360	95

ND: não determinado.

1.6.3.3 Reação de hidrólise

A reação de hidrólise do paracetamol tem como produto o p-aminofenol⁵⁶. Esta substância tem a capacidade de sofrer reações de acoplamento das mais diversas. A etapa de hidrólise do paracetamol tornou-se uma estratégia interessante para o desenvolvimento de procedimentos analíticos^{1,10}.

Os principais métodos descritos para a determinação espectrofotométrica de paracetamol que empregam a derivatização do produto da reação de hidrólise, formando uma substância indofenol como produto para ser monitorado são indicados na Tabela 1.5.

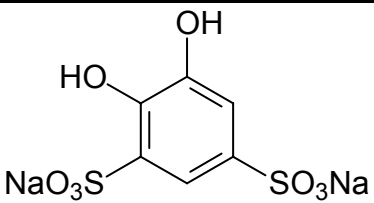
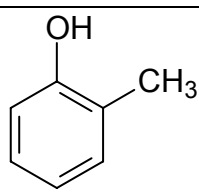
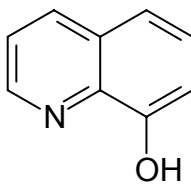
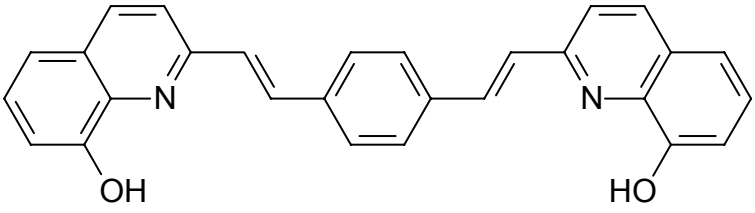
A hidrólise básica do paracetamol empregando o Tiron (ácido 4,5-dihidroxo-1,3-benzeno disulfônico) como reagente para produção de um cromóforo para determinação da concentração de paracetamol em formulações farmacêuticas foi proposto para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas.

CRIADO *et al.*²⁶ desenvolveram um sistema de análise por injeção em fluxo contínuo para a determinação de paracetamol contendo acoplado ao sistema um forno de microondas, acionado a uma potência de 250 W após 30 s da injeção da solução de amostra ou referência, como fonte de energia para promover a hidrólise alcalina do analito. Após o forno foi necessário acoplar um banho de gelo para resfriamento do fluxo emergente do forno. O produto da reação, p-aminofenol, reage em seguida com um fluxo de o-cresol em meio de NaOH 3,5 mol L⁻¹. O produto da reação foi monitorado em 620 nm.

A mesma estratégia de hidrólise foi empregada no desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo empregando radiação microondas para hidrólise alcalina em linha⁹⁷. O produto da reação, 4-aminofenol, reagiu em seguida com 8-hidroxiquinolina na presença de periodato de potássio para a obtenção da substância indofenol, que foi monitorada em 608 nm.

FILIK *et al.*⁹⁸ propuseram um sistema de análise por injeção seqüencial em que o produto da hidrólise alcalina de paracetamol reage com 2,2'-(1,4-fenilenedivinileno) bis-8-hidroxiquinolina (PBHQ) formando uma substância que absorve em 650 nm.

TABELA 1.5 Reagentes utilizados na determinação de paracetamol após a reação de hidrólise do fármaco

Tiron	
o-cresol	
8-hidroxiquinolina	
PBHQ	

PBHQ: 2,2'-(1,4-fenilenedivinilene) bis-8-hidroxiquinolina.

TABELA 1.6 Figuras de méritos de sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de paracetamol empregando reação de hidrólise

Reagentes	$\epsilon/L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	nm	Limite de detecção	Curva analítica	Ref.
o-cresol	$6,05 \times 10^4$	620	$1,3 \times 10^{-6}$	4×10^{-6} a $1,2 \times 10^{-4}$	26
Tiron	$1,1 \times 10^4$	600	$1,2 \times 10^{-6}$	1×10^{-5} a 1×10^{-4}	99
8-hidroxiquinolina	$2,0 \times 10^4$	608	$1,3 \times 10^{-6}$	1,1 a $3,2 \times 10^{-5}$	97
PBHQ	$3,4 \times 10^4$	650	6×10^{-7}	$2,9 \times 10^{-6}$ a $3,6 \times 10^{-5}$	98
S^{2-}/Fe^{3+}	$3,2 \times 10^3$	540	$1,3 \times 10^{-6}$	0 a $3,0 \times 10^{-4}$	100
NQS	$1,118 \times 10^4$	570	$2,8 \times 10^{-6}$	$6,6 \times 10^{-6}$ a $1,3 \times 10^{-4}$	101

PBHQ: 2,2'-(1,4-fenilenedivinilene) bis-8-hidroxiquinolina.

A reação de nitrosação do paracetamol, que produz uma substância estável que absorve em 430 nm em meio alcalino, foi empregada para o desenvolvimento de sistemas em fluxo com detecção espectrofotométrica¹⁰²⁻¹⁰⁴.

1.6.3.4 Métodos eletroanalíticos

Um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção biamperométrica para a determinação indireta de paracetamol foi descrito por GALVEZ *et al.*¹⁰⁵. Neste sistema, foi empregado o par redox $Fe(III)/Fe(II)$ e VO_3^-/VO_2^+ para a quantificação do fármaco. A curva analítica foi linear para a faixa de concentração de paracetamol de 0,1 a $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ empregando $Fe(III)/Fe(II)$ e até $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ empregando VO_3^-/VO_2^+ como reagente. Os desvios padrão relativos foram menores que 1,6% (n=10) para ambos os sistemas e a frequência de amostragem obtida foi de 149 e 79 h^{-1} empregando $Fe(III)/Fe(II)$ e VO_3^-/VO_2^+ como reagentes, respectivamente.

Modelos matemáticos contribuíram para a determinação simultânea de paracetamol e fenobarbital em formulações farmacêuticas empregando voltametria de pulso diferencial e eletrodo de carbono vítreo. O emprego de dois métodos matemáticos, mínimos quadrados parciais (PLS) e componente de regressão principal (PCR), foi necessário devido à sobreposição dos voltamogramas dos dois

analitos. A curva analítica foi linear para uma variação na concentração de paracetamol entre 0,9 a 11,7 mg L⁻¹ ¹⁰⁶.

VIEIRA *et al.*¹⁰⁷ desenvolveram um procedimento baseado na formação do produto da oxidação do paracetamol, N-acetil-*p*-benzoquinona imina, empregando enzima peroxidase extraída de pepino (*Cucurbita pepo*) imobilizada em um eletrodo de pasta de carbono. A determinação foi realizada reduzindo a N-acetil-*p*-benzoquinona imina a paracetamol a -0,10 V. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos entre +0,5 a -0,5 V. A intensidade de corrente de redução foi proporcional à concentração de paracetamol, obtendo-se uma curva analítica linear entre 1,2x10⁻⁴ a 2,5x10⁻³ mol L⁻¹, com um limite de detecção de 6,9x10⁻⁵ mol L⁻¹.

1.7 Acetilcisteína

1.7.1 Aspectos gerais

A acetilcisteína tem uma atuação importante, pois participa da produção da glutatona, um importante antioxidante hidrossolúvel e cofator essencial para enzimas antioxidantes⁶². Ainda, apresenta propriedades mucolíticas e hepatoprotetoras⁶². A acetilcisteína é empregada em casos agudos de bronquite ¹⁰⁸, bem como na proteção das doenças pulmonares¹⁰⁹.

1.7.2 Propriedades Mucolíticas

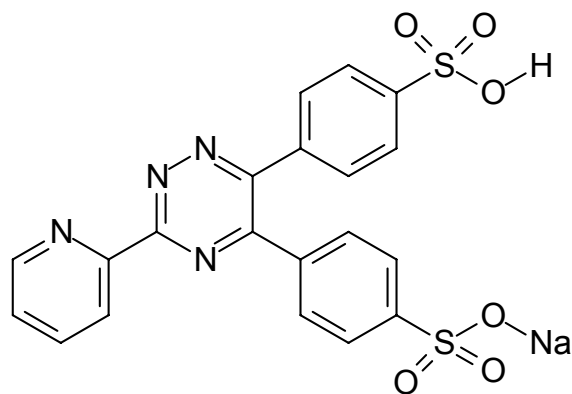
Expectorante é denominação genérica que se aplica a recursos físicos e a drogas que facilitam a produção e/ou eliminação das secreções bronquiais. Grande número de drogas têm sido usado como expectorante, atuando por mecanismo nem sempre elucidados⁶². Entre os fluidificantes empregados atualmente, destacam-se: o vapor d'água; CO₂ que atua de várias maneiras; ácido benzóico e benzoatos; acetatos; iodetos (I⁻), comumente representados pelos iodetos de sódio e potássio; surfactantes; além dos mucolíticos.

Das substâncias mucolíticas experimentadas, a acetilcisteína foi a que apresentou resultados mais vantajosos, sendo utilizada de diversas maneiras, tanto inalação, bem como via oral.

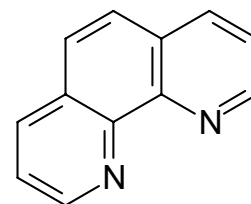
A acetilcisteína é empregada para fluidificar o muco e facilitar a expectoração. Recentemente, têm-se usado a acetilcisteína associada a surfactantes e algumas enzimas proteolíticas em aerossol. A acetilcisteína liquefaz o muco, mas não tem efeito sobre a fibrina, os coágulos de sangue e tecidos vivos. Sua ação é diretamente nas mucoproteínas, abrindo a ligação dissulfeto, levando a uma diminuição da viscosidade do muco. Sua atividade é máxima em valores de pH 7 e 9. Seu efeito máximo se produz ao fim de 10 a 15 minutos, depois da administração⁶².

1.8 Determinação de acetilcisteína

Substâncias oxidantes com potencial de oxidação mediano, como o Fe(III) pode ser empregado para a determinação de acetilcisteína¹¹⁰. A quantidade de Fe(II) produzida na reação é equivalente à concentração de acetilcisteína. Várias são as substâncias que permitem a quantificação de Fe(II) por meio da formação de complexos que absorvem radiação, permitindo o desenvolvimento de procedimentos espectrofotométricos para a determinação indireta de acetilcisteína. Entre eles, destacam-se um reagente muito sensível para a determinação de Fe(II), 3-(2-piridil)-5,6-bis(ácido 4-fenilsulfônico)-1,2,4-triazina de sódio (**XIII**), empregado para a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas em procedimento espectrofotométrico em batelada¹¹¹. Outro reagente freqüentemente empregado é a 1,10-fenantrolina (**XIV**)^{2,110,112}. A quantificação de acetilcisteína foi obtida monitorando-se o Fe(II) produzido pela formação do complexo colorido em um procedimento em batelada¹¹³.



(XIII)



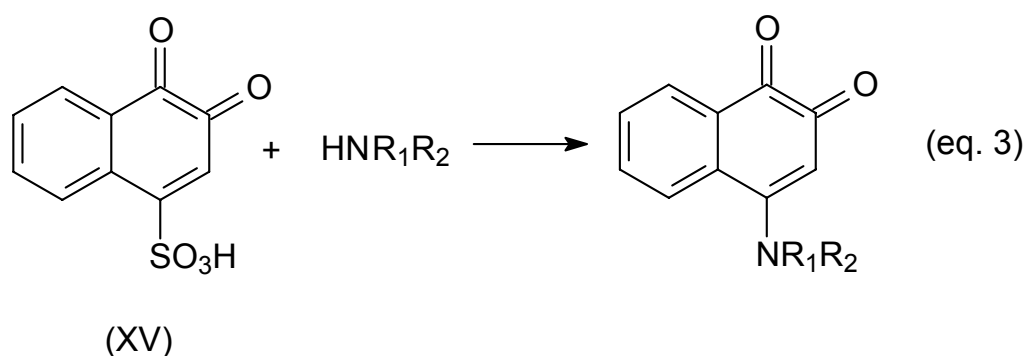
(XIV)

Diversos princípios ativos têm sido determinados pela radiação quimiluminescente produzida durante sua oxidação por um oxidante forte¹⁰. O permanganato em meio ácido oxida a acetilcisteína a acetilcisteína dissulfeto com liberação de uma fraca radiação quimiluminescente. O fluoróforo quinina foi empregada por LI *et al.*¹¹⁴ para acentuar a radiação emitida em um sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína em fármacos. O mesmo comportamento quimiluminescente foi observado para outros tióis, a saber: cisteína, glutathiona e captopril.

A reação entre acetilcisteína e *o*-quinona produzida pela reação entre polifenol oxidase fúngica e o substrato *o*-difenoil, foi empregado para a determinação indireta de acetilcisteína utilizando um método cinético. O procedimento baseia-se na medida da fase lag na formação do produto da reação enzimática, *o*-quinona¹¹⁵.

Outra reação de óxido-redução empregada para a determinação indireta de acetilcisteína em formulações farmacêutica é promovida pelo iodo (I_3^-). Um sistema em fluxo de linha única empregando um eletrodo de prata recoberto com iodeto de mercúrio foi utilizado para a determinação da quantidade de iodeto (I^-) produzida na oxidação de acetilcisteína¹¹⁶.

O ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (**XV**) é freqüentemente empregado para a determinação de princípios ativos em fármacos, substâncias que contêm dois átomos de hidrogênio reativos sob um átomo de nitrogênio, ou carbono, como aminas primárias e secundárias, aminoácidos (equação 3). Seu emprego tem sido amplo na determinação de fármacos^{2,10,101}.



Um procedimento para a determinação de acetilcisteína baseado na sua reação com NQS foi empregado para a determinação indireta de acetilcisteína em formulações farmacêuticas. Depois da reação da acetilcisteína com NQS, esse foi reduzido a ácido 1,2-dihidroxinaftaleno-4-sulfônico que apresenta fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}}$ em 318 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ em 480 nm)¹¹⁷. O procedimento fluorimétrico proposto foi também aplicado para quantificação de captopril, D-penicilamina em formulações farmacêuticas.

A reação de oxidação da acetilcisteína¹¹⁰ com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ leva a formação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. A quantidade formada é proporcional à concentração do analito que pode ser monitorada pela reação com Fe(III) formando o azul da Prússia, que absorve em 700 nm². Essas reações foram empregadas por LENARCZUK *et al.*¹¹⁸ no desenvolvimento de um optossensor que permitiu a determinação indireta de mercapto-compostos, como a acetilcisteína.

CARMO *et al.*¹¹⁹ desenvolveram um eletrodo com pasta de carbono contendo nitroprussiato de ferro(II) imobilizado. A determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas foi realizada a corrente gerada pelo par redox $[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_5\text{NO}]/[\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_5\text{NO}]$, empregando a técnica de voltametria cíclica.

As aminas primárias reagem rapidamente com *o*-ftalaldeído na presença de um tiol para resultar em 1-alkiltio-2-alkuil-substituídas isoindols, que apresentam fluorescência¹²⁰. A determinação espectrofotométrica do produto da reação entre acetilcisteína, *o*-ftalaldeído e isoleucina a pH 9,5 possibilitou a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas¹²¹. Esta mesma reação química foi utilizada para o desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas com detecção espectrofotométrica¹²².

A capacidade da acetilcisteína formar complexos com Pd²⁺ em meio ácido que absorve em 380 nm foi explorada para o desenvolvimento de dois sistemas em fluxo, um em linha única e outro com injeção do reagente, para quantificação de acetilcisteína¹²³.

TABELA 1.7 Figuras de mérito de procedimentos analíticos para a determinação de acetilcisteína

Reagentes	Deteção	Curva analítica / mol L ⁻¹	Limite de deteção	Referência
Fe(III)-ferroína	Espectrofotométrica	4,5 a 80x10 ⁻⁶	2,3x10 ⁻⁶	113
OPA e isoleucina	Espectrofotométrica	3,06x10 ⁻⁶ a 3,0x10 ⁻⁴	9,1x10 ⁻⁷	121
Fe(III)-ferrozina	Espectrofotométrica	1,22x10 ⁻⁷ a 3,67x10 ⁻⁵	ND	111
[Fe(II)(CN) ₅ NO]	Voltametria cíclica	9,6 × 10 ⁻⁴ a 1,4 × 10 ⁻²	1,9 × 10 ⁻⁴	119
NQS	Fluorimétrica	3,06x10 ⁻⁶ a 2,7x10 ⁻⁵	ND	117

NQS= ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico;
OPA: o-ftalaldeído.

TABELA 1.8 Figura de mérito de sistema em fluxo para a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas

Reagentes	Deteção	Curva analítica / mol L ⁻¹	Frequência amostragem	Referência
Fe(III)	Espectrofotométrica	3,5x10 ⁻⁶ a 4,3x10 ⁻⁴	60	112
KMnO ₄	Quimiluminescente	3,06x10 ⁻⁷ a 1,22x10 ⁻⁵	120	114
I ₃ ⁻	Potenciométrica	4,0x10 ⁻⁶ e 1,0x10 ⁻³	40	116
Pd ²⁺	Espectrofotométrico ^a	5,0x10 ⁻⁵ a 5,0x10 ⁻²	45	123

^aempregando a configuração de picos duplos.

2 Objetivos

Os objetivos desse trabalho de tese compreendem o desenvolvimento de sistemas de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de furosemida, paracetamol e acetilcisteína em formulações farmacêuticas. Nestes sistemas em fluxo, a substituição dos reagentes de alta toxicidade, a redução do volume e/ou tratamento em fluxo dos resíduos gerados nos sistemas em fluxo serão implementados.

3 Parte Experimental

3.1 Instrumentação

3.1.1 Balança analítica

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

3.1.2 pHmetro

As determinações de pH das soluções foram feitas em um pHmetro Orion, modelo EA 940.

3.1.3 Eletrodo de vidro combinado

As determinações de pH foram realizadas usando-se um eletrodo de vidro combinado Analion, modelo V 620, com um eletrodo de referência de Ag/AgCl, contendo uma solução de KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.4 Espectrofotômetros

Nos sistemas FIA desenvolvidos neste trabalho as determinações espectrofotométricas foram realizadas com um espectrofotômetro de feixe simples Femto, modelo 435 com cela de fluxo de vidro Hellma[®] (caminho óptico de 1,00 cm e volume de 180 μL).

As demais medidas espectrofotométricas foram feitas em um espectrofotômetro com arranjo linear de diodos Hewlett Packard, modelo 8452A, empregando-se uma cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico.

3.1.5 Bomba peristáltica

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

3.1.6 Tubos e conexões

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

3.1.7 Injetor comutador

As amostras e soluções de referência foram introduzidas no sistema de fluxo utilizando-se um duplo injetor comutador manual 2-3-2 construído em acrílico²³.

3.1.8 Registrador

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

3.1.9 Câmara de irradiação ultravioleta

Uma minilâmpada fluorescente ultravioleta com 28 W de potência e reator eletrônico acoplado foi adaptada em uma caixa de polietileno preta (60 x 25 x 25 cm). Um tubo de extensão de PTFE de 310 cm foi enovelado ao redor da lâmpada e recoberto com papel alumínio para maior aproveitamento da radiação emitida.

3.2. Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de furosemida empregando hipoclorito e o-tolidina como reagentes

3.2.1 Reagentes e soluções

A solução estoque de furosemida $4,1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se uma massa de 135,2 mg de furosemida (Henrifarma, Brasil) em um balão volumétrico de 100 mL com solução de NaOH $1,25 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e o volume foi completado com a mesma solução. As soluções de referência foram preparadas por diluições apropriadas da solução estoque em balões de 25 mL, completando-se o volume com a solução de NaOH $1,25 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

A solução estoque de o-tolidina $3,50 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 100 mg desse reagente (Sigma) em um balão volumétrico de 100 mL com água desionizada. A solução de trabalho de o-tolidina $9,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foi obtida pela diluição adequada em um balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com solução de HCl $1,9 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹.

A solução estoque de hipoclorito de sódio foi preparada diluindo-se 2 mL da solução concentrada (Vetec, São Paulo) em um balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com água desionizada. A solução de trabalho foi obtida diluindo-se 2,0 mL da solução estoque em um balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com solução NaOH $1,25 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

As amostras foram adquiridas no comércio local:

- Lasix[®] (Aventis Pharma LTDA, Suzano, SP) contendo 20 comprimidos de 40 mg de furosemida por comprimido;
- Furosem[®] (Medley SA Indústria Farmacêutica, Campinas, São Paulo) contendo 20 comprimidos com 40 mg de furosemida por comprimido;
- Furosemida Composto (Medley SA Indústria Farmacêutica, Campinas) contendo 20 comprimidos com 40 mg de furosemida por comprimido associado com 50 mg de cloreto de potássio;
- Hidrion[®] (Laboratório Gross S.A, Rio de Janeiro, RJ) apresentado com 30 comprimidos com 40 mg de furosemida por comprimido e 100 mg de cloreto de potássio;

- Diurisa[®] (Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo) apresentado com embalagem de 20 comprimidos contendo 40 mg de furosemida associado a 10 mg de amilorida.

3.2.2 Preparo das amostras e determinação de furosemida

Foram pesados e triturados cerca de 10 comprimidos de cada amostra em almofariz. Massas exatamente pesadas do pó contendo furosemida foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL contendo aproximadamente 60 mL de solução de NaOH $1,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Após agitação, o volume foi completado com a mesma solução de hidróxido, seguida de filtração. As soluções foram adequadamente diluídas com solução de NaOH $1,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e a curva analítica foi então obtida. As amostras foram analisadas pelo método em fluxo proposto.

3.2.3 Método comparativo

O método comparativo empregado na determinação de furosemida foi o da Farmacopéia Britânica¹²⁴. As soluções de amostra contendo furosemida foram dissolvidas em solução de NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ e a determinação foi realizada medindo-se a absorvância em 274 nm. A absorvância obtida foi comparada com o valor de absorvância obtido de uma solução de referência de furosemida $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, preparadas nas mesmas condições que as soluções de amostras.

3.2.4 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de furosemida empregando hipoclorito e o-tolidina como reagente

A Figura 3.1 apresenta a diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de furosemida em formulações farmacêuticas. Neste sistema, quando o injetor é

comutado para a posição de análise, um volume de 375 μL da solução de amostra ou de referência contendo furosemida foi inserido em um fluxo transportador de NaOH $1,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, sendo então deslocada até a confluência X, onde recebe um fluxo de NaClO $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Após a oxidação da furosemida pela solução de NaClO , o excesso de hipoclorito presente na zona de amostra dispersa é transportado para a confluência Y, onde recebe um fluxo de solução de *o*-tolidina $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sendo monitorado espectrofotometricamente em 430 nm (D). A variação da absorvância promovida pelo consumo de hipoclorito devido à reação com a furosemida na zona de amostra foi proporcional à concentração de furosemida presente na solução de amostra/referência injetada. A destruição de *o*-tolidina e seus produtos gerados no sistema em fluxo armazenados no frasco E, foram destruídos “on line” após receber o fluxo de solução de peróxido de hidrogênio, a uma vazão de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ e a radiação ultravioleta (380 nm) que incide sobre reator helicoidal de PTFE (310 cm x 0,8 mm d.i.) na câmara de radiação.

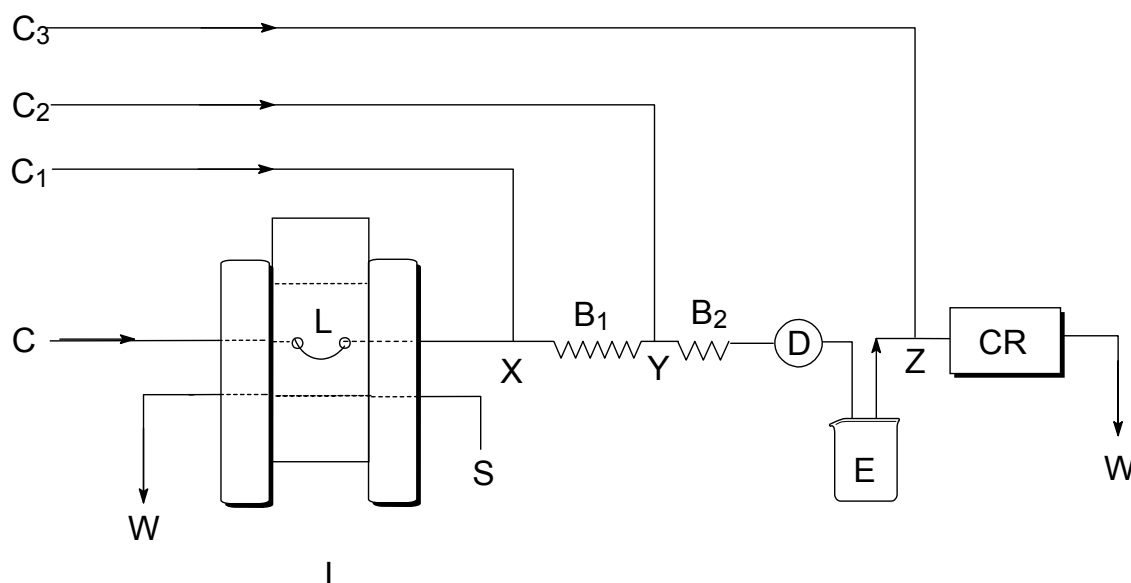


FIGURA 3.1 Sistema de análise por injeção em fluxo usado para a determinação de furosemida em formulações farmacêuticas. C: solução transportadora (NaOH $1,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $2,0 \text{ mL min}^{-1}$); C_1 : solução de hipoclorito de sódio $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $1,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,4 \text{ mL min}^{-1}$), C_2 : solução de *o*-tolidina $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $1,9 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,7 \text{ mL min}^{-1}$); C_3 : solução de peróxido de hidrogênio $0,22 \text{ mol L}^{-1}$ ($0,9 \text{ mL min}^{-1}$); L: alça de amostragem ($375 \mu\text{L}$); B_1 ; B_2 e B_3 : bobinas reacionais (40, 60 e 310 cm, respectivamente); D: espectrofotômetro (430 nm); E: resíduo aspirado a $1,2 \text{ mL min}^{-1}$; Cr: câmara de radiação contendo a lâmpada que emite radiação ultravioleta (380 nm); S: solução de referência ou amostra e W: descarte. As setas indicam o sentido do fluxo das soluções. A bomba peristáltica não está indicada na Figura.

3.2.5 Sistema em fluxo empregado para avaliação da degradação do resíduo gerado

A Figura 3.2 apresenta a configuração do sistema em fluxo empregado para avaliação da degradação do resíduo gerado pelo sistema em fluxo proposto para a determinação de furosemida. Neste sistema em fluxo, a solução transportadora e os reagentes (hipoclorito de sódio e *o*-tolidina) são propulsionados pela bomba peristáltica a vazão descrita na legenda da Figura 3.1. Para avaliar a degradação do resíduo gerado e descartado no frasco W, empregou-se um canal da bomba peristáltica (C_4) que propulsiona a solução do frasco E para a bobina reacional B_3 com comprimento de 310 cm, enovelada sobre a lâmpada UV ($\lambda=380$ nm). Na confluência Z, a solução do resíduo recebe uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que promoverá a geração de radicais hidroxilas.

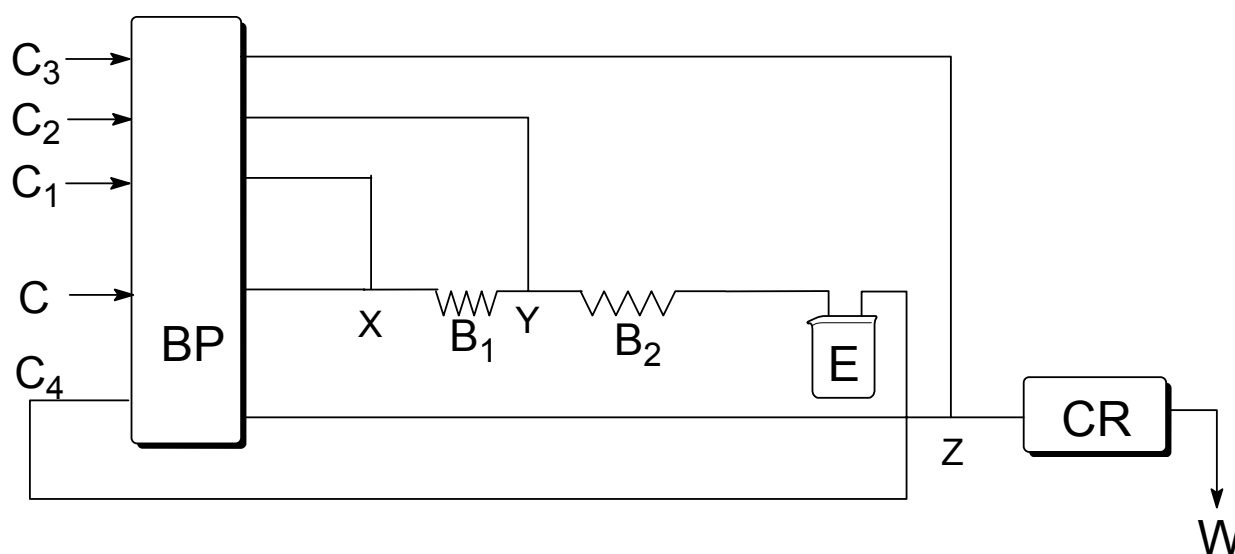


FIGURA 3.2 Configuração do sistema em fluxo para estudo da fotodegradação do resíduo gerado na determinação de furosemida. C: solução de NaOH $1,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; C_1 : solução de hipoclorito de sódio $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; C_2 : solução de *o*-tolidina $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; C_3 : solução de H_2O_2 $0,22 \text{ mol L}^{-1}$ ($0,9 \text{ mL min}^{-1}$); B_1 : bobina reacional de 40 cm; B_2 : bobina reacional de 60 cm; CR: câmara de radiação contendo a bobina reacional de 310 cm e a lâmpada ($\lambda = 380 \text{ nm}$); BP: bomba peristáltica; X, Y e Z: confluências; E: frasco contendo resíduo; e W; descarte.

3.3 Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de paracetamol empregando hipoclorito e o-tolidina como reagente

3.3.1 Reagentes e soluções

A solução estoque de paracetamol $6,6 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 100,0 mg desse fármaco (Sigma) em um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água desionizada.

A solução estoque de HCl $4,8 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ (Vetec, São Paulo) foi obtida diluindo-se uma alíquota de 4 mL do ácido concentrado em um balão volumétrico de 1.000 mL, sendo padronizada com solução precisamente padronizada com solução de NaOH.

A solução estoque de o-tolidina foi preparada conforme item 3.2.1. A solução de trabalho de concentração $9,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foi obtida diluindo-se um volume adequado em um balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com uma solução de HCl $1,9 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹.

A solução tampão borato $0,05$ mol L⁻¹ (Mallinckrodt, Itália) foi preparada dissolvendo-se 4,520 g de borato de sódio em cerca de 180 mL de água desionizada. A acidez foi ajustada a pH 9,0 com solução concentrada de NaOH $1,0$ mol L⁻¹. A solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água desionizada.

A solução estoque de hipoclorito de sódio foi obtida diluindo-se um volume da solução concentrada de hipoclorito de sódio (VETEC, São Paulo) em um balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água desionizada. A solução de trabalho foi obtida diluindo-se uma alíquota dessa solução em um balão de 250 mL com uma solução tampão borato $0,05$ mol L⁻¹ (pH 9,0).

As amostras utilizadas para a determinação foram adquiridas no comércio local:

- Cibalena[®] (Novartis Indústria Farmacêutica, S. B. dos Campos, SP), embalagem com 20 comprimidos contendo 150 mg de paracetamol, 200 mg de ácido acetilsalicílico e 50 mg de cafeína por comprimido;

- Tylenol 500[®], Tylenol 750[®] e Tylenol DC[®] (Janssen-Cilag Farmacêutica, São José dos Campos, SP);
- Tyramol 750[®] (Laboratórios Farmacêuticos Caresse, São Paulo, SP), blister contendo 4 comprimidos com 750 mg de paracetamol por comprimido;
- Paracetamol 500[®] (EMS Sigma Pharma, Hortolândia, São Paulo), blister contendo 10 comprimidos com 750 mg de paracetamol por comprimido;
- Resfry[®] (Laboratório Neo Química Com. Ind. Ltda, Anápolis, GO), apresentado com 20 comprimidos contendo 200 mg de paracetamol, 2 mg de maleato de dexaclorfeniramina e 15 mg de cafeína;
- Paracetamol[®] (Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo) blister contendo 10 comprimidos com 500 mg de paracetamol por comprimido.

3.3.2 Preparo das amostras e determinação de paracetamol

Amostras contendo paracetamol foram adquiridas no comércio e analisadas pelo sistema em fluxo proposto.

Cerca de dez comprimidos foram triturados e quantidades exatamente pesadas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL dissolvidos em água desionizada por 30 minutos sendo o volume foi completado, seguido de filtração. Diluições posteriores foram realizadas para a obtenção de soluções com concentração de paracetamol dentro da faixa linear da curva analítica.

Para a solução oral, alíquota de 2 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água desionizada. Diluição posterior foi realizada para a obtenção de uma concentração aproximada de paracetamol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.3 Método comparativo

As amostras foram analisadas pelo método espectrofotométrico de determinação direta de paracetamol baseado na absorção do paracetamol em 243 nm descrita na Farmacopéia Americana⁴⁶. Massas acuradamente pesadas das amostras foram diluídas em NaOH 0,01 mol L⁻¹ e sua absorbância foi obtida e comparada com uma curva analítica na qual os padrões foram preparados com a mesma solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹.

3.3.4 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de paracetamol empregando hipoclorito e o-tolidina como reagente

O diagrama do sistema em fluxo para a determinação de paracetamol está apresentado na Figura 3.3. Neste sistema de análise por injeção em fluxo, as amostras ou soluções padrões foram injetadas com auxílio de um injetor comutador em uma solução transportadora (água desionizada; 2,2 mL min⁻¹) que recebe no ponto de confluência X solução de hipoclorito de sódio em solução tampão borato 0,05 mol L⁻¹ (pH 9,0). Após o paracetamol sofrer oxidação, o excesso de hipoclorito na zona de amostra reage com um fluxo de o-tolidina. A quantidade de hipoclorito foi continuamente monitorada pela reação com o fluxo de o-tolidina monitorado espectrofotometricamente em 430 nm, gerando a linha base. A diminuição da absorbância (ΔA) causada pelo consumo de ClO⁻ foi proporcional a concentração de paracetamol na solução injetada. A degradação do excesso de o-tolidina armazenada em E foi destruído “on line” pela adição em fluxo de solução de peróxido de hidrogênio a uma vazão de 1,2 mL min⁻¹ e radiação ultravioleta (28 W) que incide sobre reator helicoidal de PTFE de 310 cm (B₃).

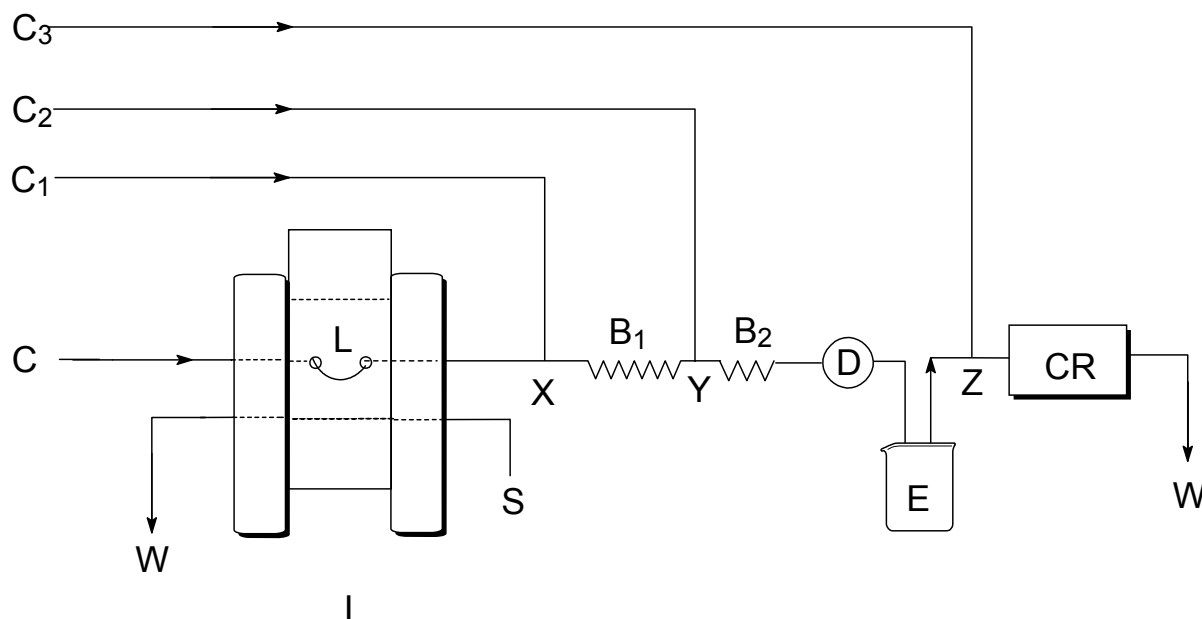


FIGURA 3.3 Sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando hipoclorito e *o*-tolidina como reagente. C: água desionizada ($2,2 \text{ mL min}^{-1}$); C₁: solução de hipoclorito de sódio $9,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão borato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($0,9 \text{ mL min}^{-1}$); C₂: solução de *o*-tolidina $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,6 \text{ mL min}^{-1}$); C₃: solução de peróxido de hidrogênio $0,22 \text{ mol L}^{-1}$ ($0,9 \text{ mL min}^{-1}$); I: injetor-comutador; L: ($400 \mu\text{L}$); B₁ e B₂: bobinas reacionais (75 e 310 cm, respectivamente); D: espectrofotômetro (430 nm); E: resíduo aspirado a $1,2 \text{ mL min}^{-1}$; CR: câmara de radiação contendo lâmpada que emite radiação ultravioleta (380 nm) e W: descarte. As setas indicam o sentido do fluxo das soluções. A bomba peristáltica não está indicada na Figura.

3.4. Sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica para a determinação direta de paracetamol empregando nitrito de sódio como reagente

3.4.1 Reagentes e soluções

A solução de HCl $2,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diluindo-se uma alíquota de 2,0 mL da solução concentrada (Vetec, São Paulo) em um béquer contendo cerca de 50 mL de água desionizada. Esse volume foi transferido para um balão volumétrico de 1.000 mL e o volume foi completado com água desionizada, sendo adequadamente padronizada.

A solução estoque de paracetamol $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo 160,0 mg do fármaco (Synth) em um balão volumétrico de 100 mL com solução de HCl $2,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. As soluções de referência foram obtidas pela diluição adequada dessa solução estoque em balões volumétricos de 50 mL e o volume foi completado com solução de HCl $2,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

A solução de NaNO₂ $8,2 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ (Carlo Erba, Itália) foi preparada dissolvendo-se 279,0 mg do sal em um balão volumétrico de 50 mL e completando-se o volume com água desionizada. Esta solução foi preparada e padronizada diariamente.

Amostras de formulações farmacêuticas apresentadas na forma de comprimidos e líquidos foram adquiridas no comércio local:

- Paracetamol[®] (Medley S.A Indústria Farmacêutica, Hortolândia, São Paulo), frasco com 15 mL de solução contendo 200 mg por mililitros de paracetamol.
- Cibalena[®] (Novartis Indústria Farmacêutica, S. B. dos Campos, SP) apresentado com blister de 4 comprimidos contendo 200 mg de ácido acetilsalicílico, 150 mg de paracetamol e 50 mg de cafeína por comprimido;
- Saridon[®] (Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Jaguaré, São Paulo), 4 comprimidos contendo associado 250 mg paracetamol, 50 mg de cafeína e 150 mg de propifenazona;
- Tylenol 500[®] Tylenol DC[®]; Tylenol 750[®]; Tylenol Gotas[®] (Janssen-Cilag Farmacêutica, São José dos Campos, SP);
- Resfry[®] (Laboratório Neo Química Com. Ind. Ltda, Anápolis, GO) apresentado com 20 comprimidos contendo 200 mg de paracetamol, 2 mg de maleato de dexaclorfeniramina e 15 mg de cafeína;
- Paracetamol G 750[®] (Eurofarma) apresentado com 8 comprimidos contendo 750 mg de paracetamol por comprimido;
- Tyramol 750[®] (Caresse) apresentado com 4 comprimidos contendo 750 mg de paracetamol por comprimido;
- Vick Pyrena[®] (Procter & Gamble, Louveira, SP) apresentado com 6 comprimidos.

3.4.2 Preparo das amostras e determinação de paracetamol

Para as formulações comercializadas na forma sólida, cerca de dez comprimidos foram exatamente pesados e triturados com auxílio de um almofariz e pistilo. Uma massa exatamente pesada de paracetamol foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e dissolvido com solução de HCl $2,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Em seguida, o volume foi completado com solução de HCl $2,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e a solução foi em seguida filtrada. Uma alíquota foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com solução de HCl $2,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Essa solução assim obtida apresentava uma concentração de $5,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, dentro da faixa da curva analítica, sendo então empregada para a determinação de paracetamol com o sistema FIA proposto.

Nas formulações líquidas, uma alíquota contendo 40 mg de paracetamol foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com solução de HCl $2,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Uma diluição adicional foi realizada objetivando-se obter concentração dentro do intervalo da curva analítica. Esta solução foi aspirada para a determinação de paracetamol.

3.4.3 Método comparativo

O procedimento comparativo empregado para a determinação de paracetamol nas formulações farmacêuticas analisadas pelo procedimento em fluxo proposto foi aquele descrito no item 3.3.3, um procedimento em batelada baseado na absorção do paracetamol em 243 nm.

3.4.4 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica para a determinação direta de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando nitrito de sódio como reagente

A Figura 3.4 apresenta o diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo reverso com detecção espectrofotométrica que emprega nitrito

como reagente para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas. Neste sistema, a solução de referência ou amostra é propulsionada pela bomba peristáltica a uma vazão de $2,2 \text{ mL min}^{-1}$ onde é inserida uma alíquota de reagente NaNO_2 ($50 \text{ } \mu\text{L}$; $8,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). O produto da reação formado na bobina reacional (150 cm) foi monitorado espectrofotometricamente em 400 nm .

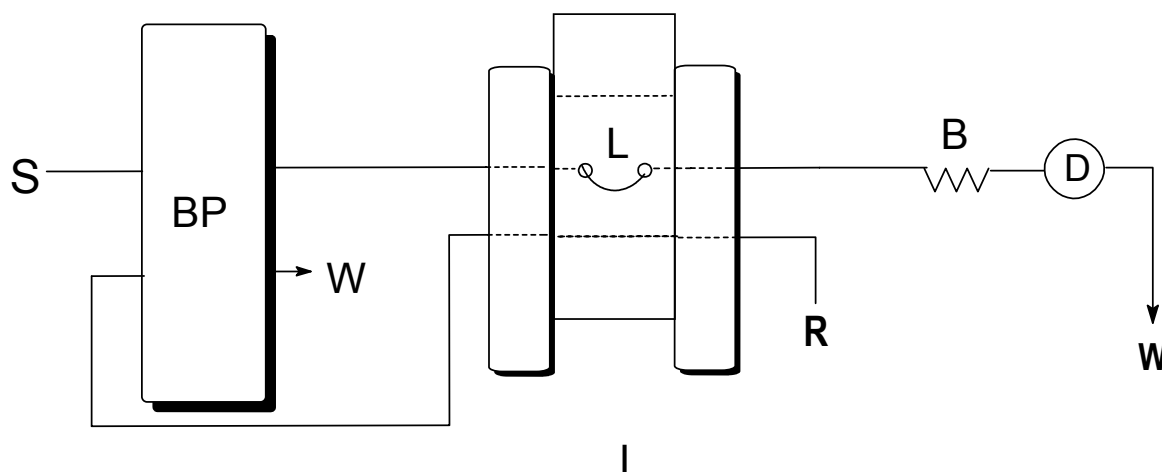


FIGURA 3.4 Sistema de análise por injeção em fluxo reverso para a determinação espectrofotométrica de paracetamol empregando nitrito de sódio como reagente. S: Solução de amostra ou solução de referência de paracetamol em $\text{HCl } 2,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ($2,2 \text{ mL min}^{-1}$); BP: bomba peristáltica; L: alça de amostragem ($50 \text{ } \mu\text{L}$); R: solução de nitrito de sódio $8,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; B: bobina reacional (150 cm); D: espectrofotômetro ($\lambda = 400 \text{ nm}$); W:descarte.

3.5 Sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação indireta de acetilcisteína empregando Ce(IV) e ferroína como reagente¹²⁵

3.5.1 Reagentes e soluções

A solução estoque de acetilcisteína $8,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se $666,0 \text{ mg}$ do composto (Sigma) em um balão volumétrico de 50 mL com água desionizada. Soluções de referência de acetilcisteína contendo de $6,5 \times 10^{-4}$

a $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foram obtidas por diluição apropriada da solução estoque com água desionizada.

Para a determinação de acetilcisteína em fluxo, preparou-se uma solução estoque de sulfato de Cério (IV) $1,1 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ dissolvendo-se 364,0 mg desse reagente (Sigma) em um balão volumétrico de 100 mL com solução de ácido sulfúrico $1,1 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹. A solução de trabalho foi obtida diluindo-se 6 mL da solução estoque em um balão volumétrico de 100 mL, com 4,0 mL de solução de ácido sulfúrico $0,9$ mol L⁻¹ e água desionizada.

A solução de ferroína $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Vetec, São Paulo) foi preparada diluindo-se 1,0 mL do reagente em um balão volumétrico de 100 mL com água desionizada.

As amostras sólidas contendo acetilcisteína, disponíveis no comércio na forma granulada, empregadas foram:

- Acetilcisteína (EMS Sigma Pharma, Hortolândia, São Paulo), envelopes contendo cerca de 200 mg do princípio ativo.
- Fluicis[®] (Laboratórios Klinger do Brasil Ltda, São Bernardo do Campo, SP) envelopes contendo cerca de 200 mg de acetilcisteína;
- Fluimucil[®] (Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda, São Paulo, São Paulo), envelope com conteúdo na forma granulada contendo 200 mg de acetilcisteína;

3.5.2 Preparo das amostras e determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas

Os conteúdos de cinco envelopes foram pesados e pulverizados com o auxílio de um almofariz e pistilo. Uma massa acuradamente pesada ou alíquotas de solução foram diluídas em balões volumétricos de 100 mL com água desionizada. Uma diluição adicional foi necessária para se obter concentrações das soluções das amostras dentro da faixa linear da curva analítica do procedimento proposto e foram injetadas diretamente com a ajuda do injetor-comutador, sendo as concentrações determinadas com auxílio de uma curva analítica obtida no mesmo dia de trabalho.

3.5.3 Método comparativo

Como procedimento comparativo empregado para validar o procedimento em fluxo proposto, utilizou-se o método volumétrico descrito na Farmacopéia Brasileira¹²⁶, onde a solução de amostra foi titulada potenciométricamente com uma solução padrão de nitrato de mercúrio(II) $1,0 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹, empregando-se eletrodos de fio de ouro e de calomelano saturado, como eletrodos indicador e de referência, respectivamente.

3.5.4 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação espectrofotométrica de acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando o Ce(IV) e ferroína como reagentes

O diagrama esquemático do sistema em fluxo desenvolvido é mostrado na Figura 3.5. Quando o injetor está na posição de amostragem, um fluxo de solução de Ce(IV) flui e recebe por confluência uma solução de ferroína. Dessa maneira, a solução de ferroína é consumida pela solução de Ce(IV) descolorindo parcialmente, sendo que a concentração em excesso de ferroína gera uma linha base, monitorada continuamente em 500 nm. Quando uma solução de acetilcisteína é injetada é oxidada pelos íons Ce(IV). Assim, com a diminuição da concentração de Ce(IV) na zona de amostra dispersa, há um aumento na concentração de ferroína após o ponto de confluência Y, gerando um sinal transiente proporcional a concentração de acetilcisteína na solução.

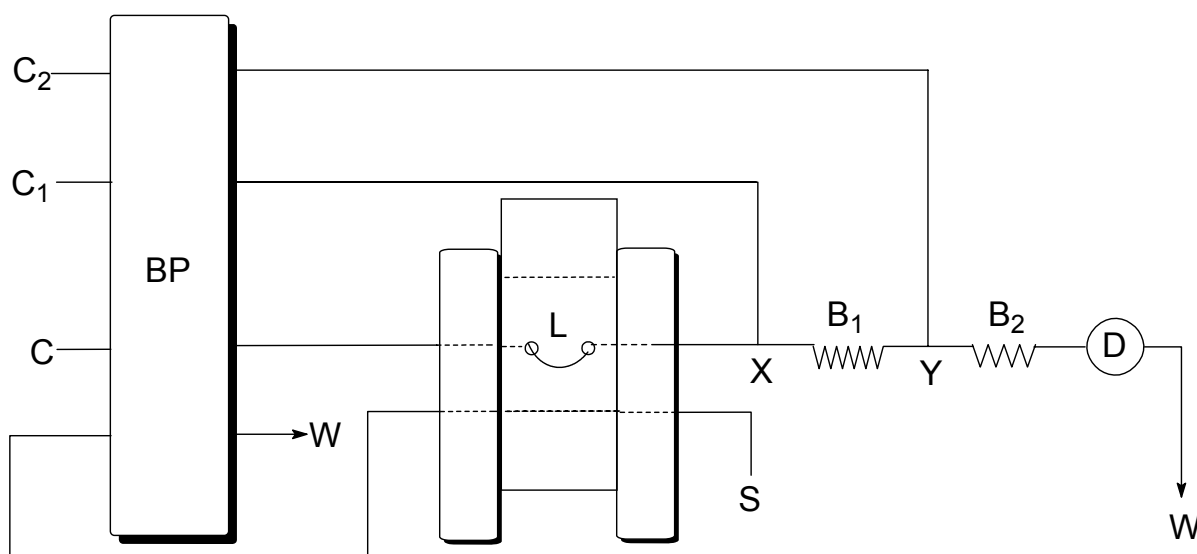


FIGURA 3.5 Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica empregado para a determinação de acetilcisteína em produtos farmacêuticos. C: solução transportadora (H_2O , $1,5 \text{ mL min}^{-1}$); C_1 : solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ $6,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $4,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,9 \text{ mL min}^{-1}$); C_2 : solução de ferroína $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,7 \text{ mL min}^{-1}$); L: alça de amostragem $350 \mu\text{L}$; B_1 : bobina reacional (65 cm); B_2 : bobina reacional (65 cm); D: espectrofotômetro (500 nm); BP: bomba peristáltica; S: solução de referência ou amostra; I: injetor-comutador 2-3-2 e W: descarte.

3.6. Sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação espectrofotométrica indireta de acetilcisteína utilizando a geração química de bromo¹²⁷

3.6.1 Reagentes e soluções

A solução estoque de acetilcisteína $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 0,600 g do fármaco (Sigma) em água desionizada e as soluções de referência foram obtidas pela diluição da solução estoque em balões volumétricos de 50 mL com água desionizada.

A solução estoque de HCl $0,24 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diluindo-se 5 mL de HCl concentrado (VETEC, São Paulo) em 100 mL de água desionizada em um béquer e depois transferido para um balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com água desionizada, sendo a solução posteriormente padronizada.

A solução de $\text{KBr } 2,2 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 5,330 g do sal em um balão volumétrico de 250 mL com água desionizada.

A solução de $\text{NaBrO}_3 \ 1,25 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se uma massa de 366,3 mg do sal em um balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água desionizada.

A solução de ácido ascórbico 5,0 % m/v foi preparada dissolvendo-se 5,0 g desse ácido (Aldrich) em um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água desionizada.

A determinação de acetilcisteína foi realizada empregando o sistema em fluxo proposto em formulações farmacêuticas granuladas. As amostras comerciais empregadas para a determinação de acetilcisteína foram:

- Acetilcisteína[®] (EMS Sigma Pharma, Hortolândia, São Paulo); envelopes contendo cerca de 200 mg de acetilcisteína;
- Fluimucil[®] (ZAMBON Laboratórios Farmacêuticos LTDA, São Paulo), envelopes contendo cerca de 200 mg de acetilcisteína;
- Fluimucil[®] solução nasal (ZAMBON Laboratórios Farmacêuticos LTDA, São Paulo), solução nasal (20 mL) contendo cerca de 11,5 mg de acetilcisteína por mililitros de solução.

3.6.2 Preparação das amostras farmacêuticas

Dez envelopes foram precisamente pesados e o pó obtido foi triturado com ajuda de um almofariz. Cerca de 100 a 300 mg do pó obtido foram pesados e dissolvido em balões volumétricos de 100 mL e o volume foi completado com água desionizada para obter uma concentração final entre $1,2 \times 10^{-4}$ a $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de acetilcisteína em balão volumétrico de 100 mL.

O teor de acetilcisteína nessas amostras foi determinado usando uma curva analítica obtida empregando solução de referência de acetilcisteína, bem como pelo método de adição múltipla de padrão¹²⁸ e o resultado assim obtido comparado com um procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira¹²⁶.

3.6.3 Método comparativo

O procedimento comparativo empregado para a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas foi o mesmo apresentado no item 3.5.3.

3.6.4 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de acetilcisteína empregando bromo (Br_2) gerado quimicamente como reagente

O sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína está mostrado na Figura 3.6. A solução de referência ou de amostra (S; 250 μL) foi injetada no fluxo transportador (água desionizada; 1,5 mL min^{-1}) com auxílio de um injetor comutador e transportado até a confluência Y onde recebe fluxo de bromo produzido pela reação entre brometo $2,2 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ (C_1 ; 1,5 mL min^{-1}), solução de ácido clorídrico $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ (C_2 ; 1,5 mL min^{-1}) e solução de bromato $1,25 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (C_3 ; 1,5 mL min^{-1}).

O bromo foi gerado em concentração suficiente para detecção com um espectrofotômetro em 400 nm. A acetilcisteína consome bromo, Br_2 , no sistema em fluxo promovendo uma diminuição da linha base proporcional a concentração de acetilcisteína em solução. Em seguida, o bromo foi completamente destruído com um fluxo na confluência Z de solução de ácido ascórbico 5,0 % m/v (C_4) e depois descartado no frasco de resíduos (W).

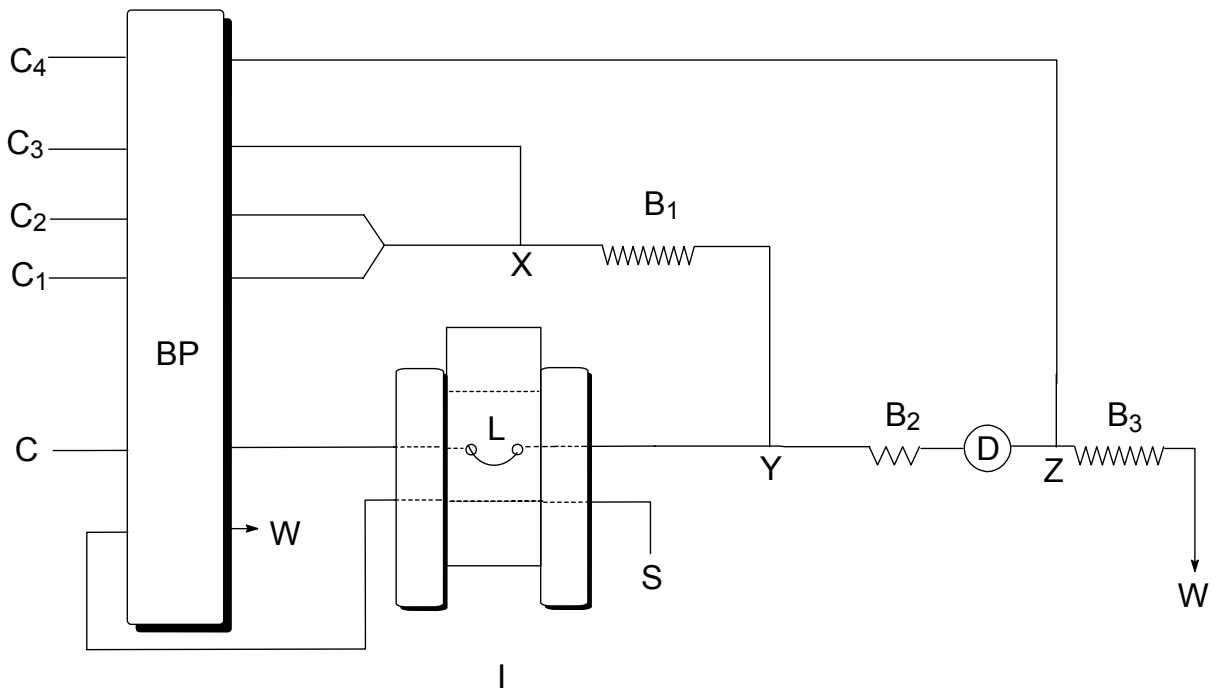


FIGURA 3.6. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína. BP: bomba peristáltica; C: água desionizada; C₁: solução de brometo de potássio $2,2 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$; C₂: solução de HCl $2,4 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$; C₃: solução de bromato de sódio $1,25 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; C₄: solução de ácido ascórbico 5,0% m/v; I: injetor comutador; L: volume de amostragem (250 μL); S: solução de referência ou de amostra; B₁, B₂ e B₃: bobinas reacionais de 140, 60 e 60 cm, respectivamente; D: espectrofotômetro e W: resíduo.

4 Resultados e Discussões

4.1 Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de furosemida em produtos farmacêuticos

O reagente *o*-tolidina (3,3'-dimetilbenzidina) foi introduzido¹²⁹ como reagente para a determinação qualitativa de cloro total em 1913 e o primeiro procedimento para a determinação colorimétrica quantitativa do mesmo foi proposto em 1942. Vários procedimentos utilizando este reagente têm sido propostos desde então, sendo este o método para a determinação de cloro mais difundido no mundo.

A determinação de cloro envolve a rápida oxidação da *o*-tolidina formando uma imino-quinona. A coloração do produto depende do pH do meio, sendo amarela na faixa de pH de 0,8 a 3,0, verde azulado em pH entre 3 a 6 e acima deste valor, adquire uma coloração marrom. O método é realizado em pH em torno de 1,6 em que o comprimento de onda de máxima absorção é de 400 nm e a absorvidade molar do produto é igual a $2,8 \times 10^4 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

O espectro de absorção molecular da *o*-tolidina e de seu produto de oxidação pelo hipoclorito está mostrada na Figura 4.1. A substância oxidada apresenta uma absorção máxima em torno de 430 nm.

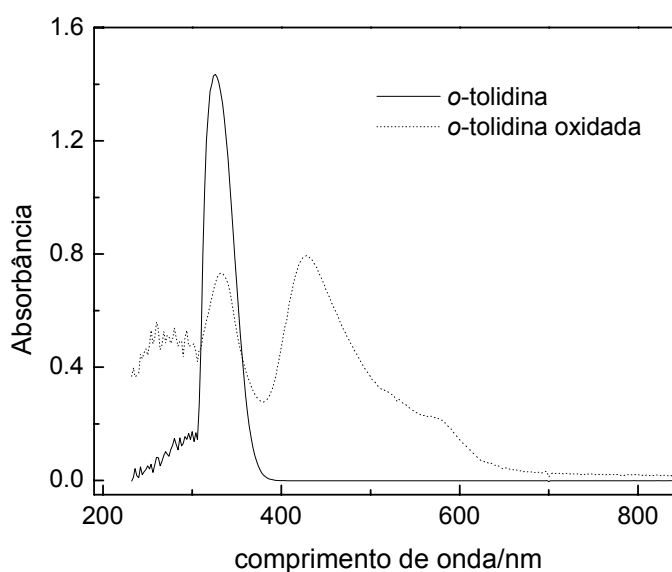


FIGURA 4.1 Espectro de absorção da *o*-tolidina e do cromóforo (*o*-tolidina oxidada).

O procedimento aqui proposto emprega a reação da furosemida com hipoclorito¹³⁰ (equação 4, Figura 4.2) e o excesso de hipoclorito é monitorado pela reação com *o*-tolidina (equação 5, Figura 4.2)¹³¹⁻¹³³.

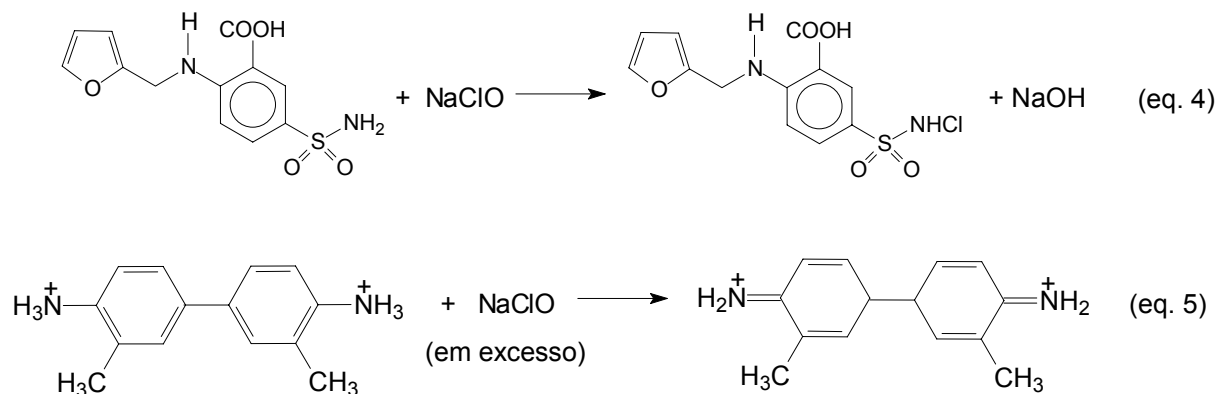


FIGURA 4.2 Reação química envolvida na determinação de hipoclorito empregando *o*-tolidina como reagente.

4.1.1 Estudos dos parâmetros químicos do sistema FIA

Os parâmetros químicos foram otimizados univariavelmente, buscando a melhor relação entre sensibilidade e repetibilidade, bem como maior frequência de amostragem. A configuração do sistema de análise por injeção em fluxo empregado na otimização é mostrado na Figura 3.1, com volume da alça de amostragem de 100 μL , comprimento da bobina reacional B_1 e B_2 de 60 e 40 cm, respectivamente. As vazões empregadas foram, a saber: carregador, 2,2 mL min^{-1} ; solução de hipoclorito e solução de *o*-tolidina, 1,6 mL min^{-1} .

Primeiramente, foi avaliado o efeito da concentração da solução de hipoclorito de sódio nas concentrações variando de $2,8 \times 10^{-5}$ a $2,2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , sobre o sinal analítico de uma solução de referência de furosemida de concentração $1,2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} . O sinal analítico aumentou significativamente com o aumento da concentração de hipoclorito até a concentração de $1,2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , permanecendo constante para as concentrações superiores. Dessa maneira, selecionou-se a concentração de $1,2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} para os demais experimentos.

O efeito da concentração de HCl na solução de o-tolidina sobre o sinal analítico foi avaliado entre $8,0 \times 10^{-2}$ a $2,4 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹. Verificou-se um aumento significativo do sinal analítico entre as concentrações variando de $8,0 \times 10^{-2}$ a $1,9 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹, com um aumento menor até a concentração de $2,4 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹. Assim, selecionou-se a concentração de $1,9 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ para os demais experimentos considerando-se um compromisso entre a magnitude do sinal analítico e economia do reagente.

Foi estudado o efeito da concentração de o-tolidina, $3,0 \times 10^{-5}$, $9,0 \times 10^{-5}$, $1,2 \times 10^{-4}$ e $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, em solução de HCl $1,9 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹, sobre o sinal analítico de uma solução de referência de furosemida $1,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O sinal analítico aumentou significativamente até a concentração de $9,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e em menor proporção as concentrações superiores. Ademais, como foram observadas as menores exatidões do sinal analítico neste intervalo superior de concentração do reagente, selecionou-se a concentração de $9,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ do reagente para os demais experimentos.

Avaliou-se o efeito da concentração de NaOH na solução transportadora sobre o sinal analítico nas concentrações de 1×10^{-3} , $1,5 \times 10^{-2}$ e $2,5 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹. Quando a solução de NaOH $2,5 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ foi propulsionada, não se obteve o sinal da linha base, pois o pH na reação entre o hipoclorito e a o-tolidina é um fator crítico. A concentração 1×10^{-3} mol L⁻¹ causou problema na solubilidade da furosemida. Dessa maneira, considerando-se a magnitude do sinal analítico selecionou-se a concentração de $1,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ para os demais experimentos.

4.1.2 Otimização dos parâmetros físicos do sistema de análise por injeção em fluxo

Os parâmetros físicos do sistema de análise por injeção em fluxo foram otimizados utilizando o método univariado, buscando o melhor compromisso entre sensibilidade, reprodutibilidade e frequência de amostragem.

Inicialmente, foi avaliado o comprimento da bobina reacional B₁ de 20, 40, 60, 90 e 125 cm sobre o sinal analítico de uma solução de furosemida $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Houve um aumento significativo do sinal analítico com o aumento do comprimento até 40 cm, mantendo-se constante para os comprimentos maiores.

Selecionou-se o comprimento de 40 cm, para os demais experimentos, devido ao menor desvio-padrão relativo entre as medidas realizadas.

Examinou-se também o efeito do comprimento da bobina reacional B_2 de 25, 40, 60, 90 e 125 cm sobre o sinal analítico de uma solução de furosemida $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Como mostra a Figura 4.3, verificou-se uma diminuição acentuada do sinal analítico com o aumento do comprimento da bobina reacional. Considerando-se o melhor compromisso entre o sinal analítico e precisão entre os sinais, selecionou-se o comprimento de 60 cm para os demais experimentos.

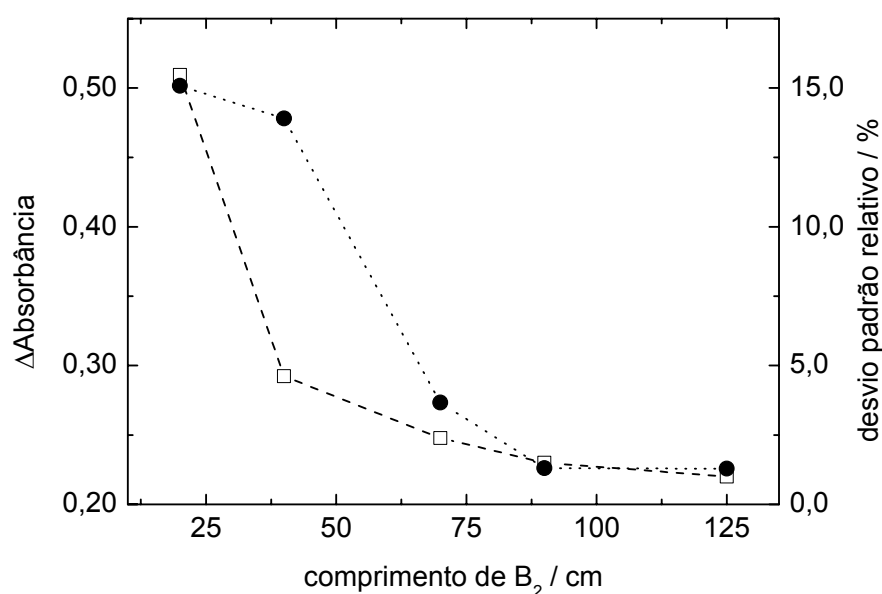


FIGURA 4.3 Efeito do comprimento da bobina reacional na determinação de solução de referência de furosemida $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=3$). Absorbância (---□---) e precisão (...●...).

O efeito do volume da alça de amostragem com 100, 150, 250, 375 e 450 μL sobre o sinal analítico foi investigado para uma solução de referência de furosemida de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se um aumento do sinal analítico até o volume de 375 μL , mantendo-se constante em volumes maiores. Observou-se também uma maior precisão dos sinais analíticos obtidos para os volumes de alça de amostragem entre 375 e 450 μL . Sendo assim, selecionou-se o volume de 375 μL pois este volume proporcionou sensibilidade adequada e melhor precisão.

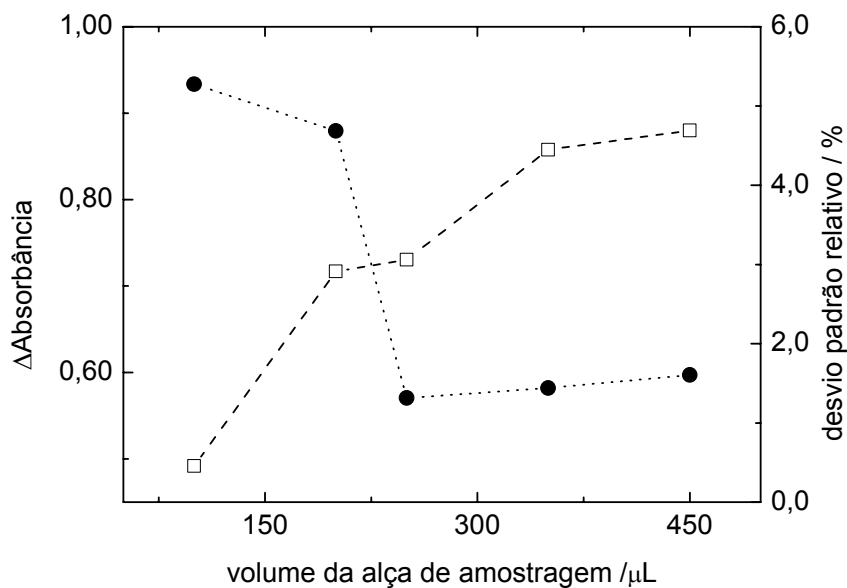


FIGURA 4.4 Efeito do volume da alça de amostragem na determinação de solução de referência de furosemida $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=3$). Absorbância (---□---) e precisão (---●---).

Avaliou-se o efeito da vazão da solução de *o*-tolidina de 1,0, 1,4, 1,7 e $3,5 \text{ mL min}^{-1}$, sobre o sinal analítico de uma solução de furosemida $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com os parâmetros do sistema de análise por injeção em fluxo semelhantes aos descritos na legenda da Figura 3.1. Verificou-se um aumento do sinal analítico até a vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$, permanecendo constante para as vazões superiores. Selecionou-se assim, a vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$ para os experimentos posteriores.

O efeito da vazão da solução de hipoclorito no sinal analítico de uma solução de furosemida $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi avaliado nas vazões de 0,7, 1,4 e $3,5 \text{ mL min}^{-1}$, com os parâmetros do sistema de análise por injeção em fluxo semelhantes aos descritos na legenda da Figura 3.1. Verificou-se uma diminuição acentuada do sinal analítico com o aumento da vazão seguida da perda da precisão entre as medidas, conforme mostrado na Figura 4.5. Sendo assim, selecionou-se a vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ para o sistema de análise por injeção em fluxo.

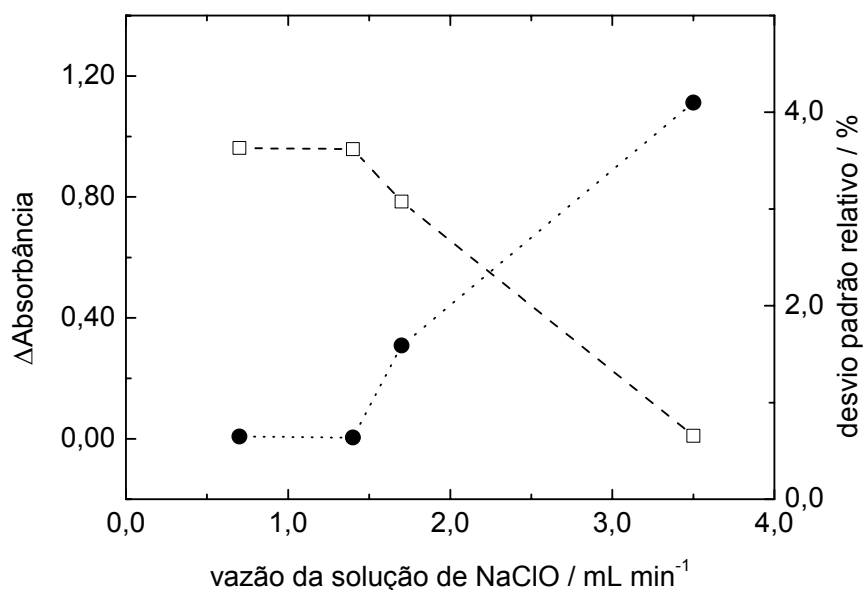


FIGURA 4.5 Efeito da vazão da solução de hipoclorito de sódio na determinação de solução de referência de furosemida $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (n=3). Absorbância (---□---) e precisão (...●...).

O efeito da vazão da solução transportadora (NaOH $1,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) sobre o sinal analítico foi avaliado nas seguintes vazões: 1,0, 1,7 e 2,5 mL min⁻¹. Verificou-se um maior sinal analítico na vazão de 2,2 mL min⁻¹. A precisão entre os sinais obtidos nessa vazão foi maior que aquelas obtidas nas outras vazões. Sendo assim, selecionou-se essa vazão para o sistema em fluxo final.

4.1.3 Fotodegradação da *o*-tolidina empregando radiação UV e H₂O₂

Nesta etapa do trabalho, foi avaliada a degradação fotoassistida do reagente *o*-tolidina oxidado pela solução de hipoclorito de sódio, empregando a geração de radicais (\bullet OH) com solução de peróxido de hidrogênio e radiação UV ($\lambda=380$ nm). A configuração do sistema em fluxo empregado para esse estudo está mostrado na FIGURA 3.2. Esses estudos foram realizados monitorando-se a absorbância do resíduo gerado com um espectrofotômetro em 430 nm.

Inicialmente, verificou-se o efeito da radiação eletromagnética UV sobre a degradação do resíduo variando-se a vazão da solução E, a saber: 0,3; 0,9

e $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ (C_4). Em todos os casos, não se verificou alteração do espectro de absorção do cromóforo formado. Sendo assim, verificou-se a degradação do resíduo com auxílio de solução de H_2O_2 . O pH da solução foi mantido o mesmo do resíduo gerado, ou seja, 3,0.

O estudo do efeito da concentração da solução de peróxido de hidrogênio sobre a degradação fotoassistida da o-tolidina e seus produtos, foi avaliada nas seguintes concentrações de peróxido de hidrogênio: 0,05, 0,10, 0,22 e $0,40 \text{ mol L}^{-1}$, empregando o sistema em fluxo descrito na Figura 3.2. Verificou-se que a degradação ocorreu quase na totalidade com a solução de H_2O_2 $0,22 \text{ mol L}^{-1}$, conforme mostrada na Tabela 4.1. Sendo assim, selecionou-se esta concentração para a configuração final do sistema em fluxo. Os espectros obtidos nesse estudos estão mostrados na Figura 4.6.

TABELA 4.1 Estudo do efeito da concentração de H_2O_2 na degradação fotoassistida do resíduo gerado do sistema em fluxo (pH 3,0)

$\text{H}_2\text{O}_2 / \text{mol L}^{-1}$	$(\text{abs}-\text{abs}_0)/\text{abs} (430 \text{ nm})$
0,05	0,50
0,10	0,70
0,22	0,96
0,41	0,98

Abs: absorbância do resíduo sem a radiação ultravioleta;

Abs₀: absorbância do resíduo gerado com o uso radiação ultravioleta ($\lambda=380 \text{ nm}$).

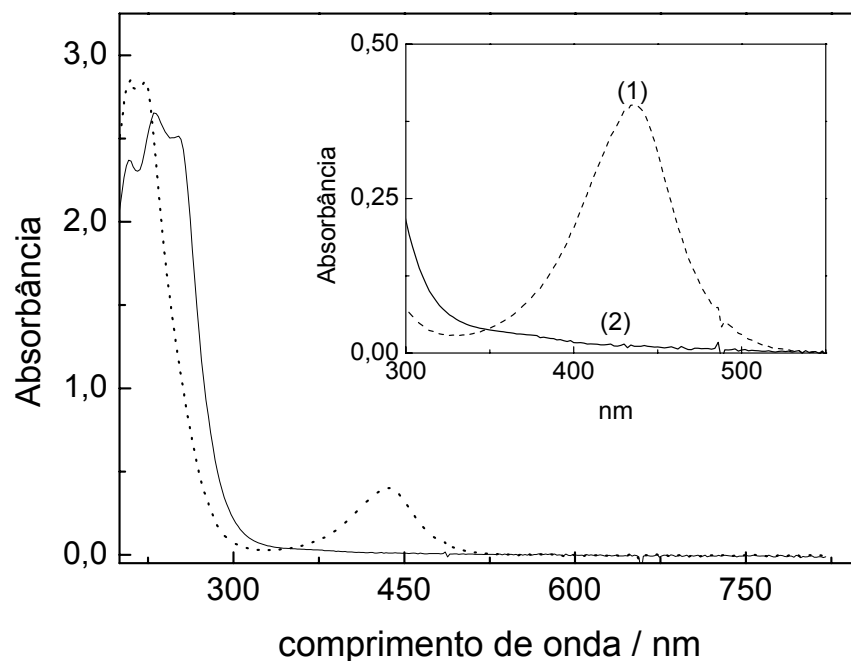


FIGURA 4.6 Espectros de absorção da solução de *o*-tolidina oxidada empregando solução de H_2O_2 antes da degradação fotoassistida (1) e depois da radiação ultravioleta (2) empregando uma solução de peróxido de hidrogênio $0,22 \text{ mol L}^{-1}$.

A Tabela 4.2 sintetiza os principais estudos realizados na otimização do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de furosemida.

TABELA 4.2 Estudo da otimização dos parâmetros do sistema em fluxo para a determinação de furosemida

Parâmetro	Faixa estudada	Valor selecionado
Hipoclorito / 10^{-4} mol L ⁻¹	0,28 a 2,2	1,2
HCl / mol L ⁻¹	0,08 a 0,24	0,19
o-tolidina / 10^{-4} mol L ⁻¹	0,3 a 3,0	0,7
NaOH / 10^{-2} mol L ⁻¹	0,1 a 2,5	1,5
Volume da alça de amostragem / μ L	100 a 450	375
Reator B ₁ / cm	40 a 125	40
Reator B ₂ / cm	40 a 125	60
Vazão do hipoclorito / mL min ⁻¹	0,7 a 3,5	0,7
Vazão da o-tolidina / mL min ⁻¹	1,0 a 3,5	1,4
Vazão do NaOH / mL min ⁻¹	1,0 a 2,5	2,2

4.1.4 Parâmetros analíticos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de furosemida

A curva analítica foi obtida por injeções sucessivas em triplicata de soluções de referência de furosemida na faixa de concentração de 5×10^{-6} a 8×10^{-5} mol L⁻¹, preparadas diariamente em solução de hidróxido de sódio $1,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e com os parâmetros do sistema de análise por injeção em fluxo apresentados na Figura 3.1. O limite de detecção obtido foi de $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica).

Os desvios padrão relativos foram menores que 2,0% (n=10) para soluções de referência de furosemida $1,0 \times 10^{-5}$ e 5×10^{-5} mol L⁻¹ apresentados na Figura 4.7.

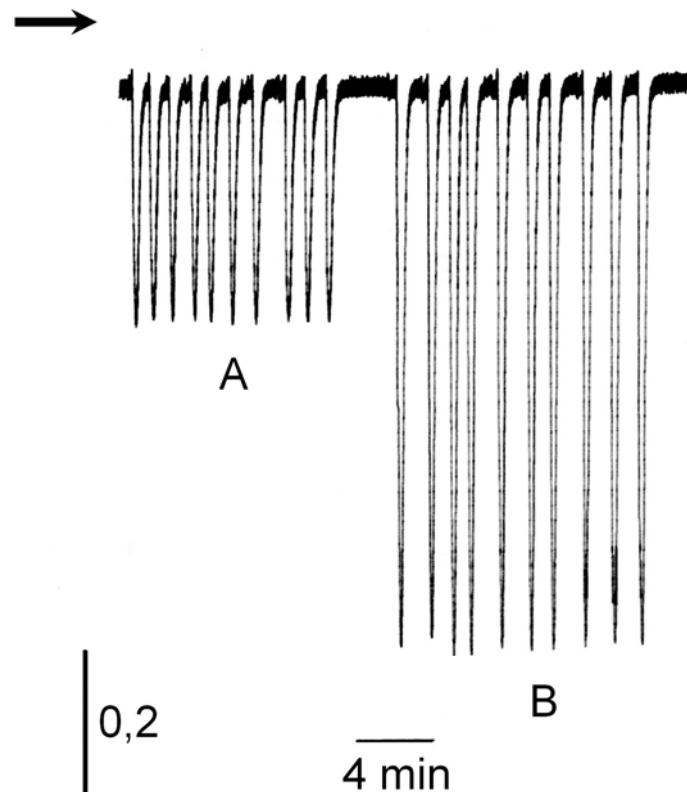


FIGURA 4.7 Diagrama obtido no estudo da repetibilidade na determinação de solução de referência de furosemida (A) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

4.1.5 Estudo de interferência

O efeito de interferentes em potencial na determinação de furosemida em amostras farmacêuticas foi avaliado para os excipientes comumente existentes em formulações farmacêuticas. Nesse estudo, foram comparados os sinais analíticos obtidos empregando-se soluções de referência de furosemida $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e os sinais analíticos obtidos empregando-se soluções de furosemida com os respectivos excipientes nas concentrações indicadas na Tabela 4.3. A concentração de excipiente tolerada foi aquela que proporcionou um desvio padrão relativo não superior a $\pm 5\%$. A Tabela 4.3 apresenta os resultados obtidos neste estudo.

TABELA 4.3 Estudo da seletividade na determinação de furosemida empregando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto

excipiente	Concentração tolerada / mol L ⁻¹
Sacarose	$6,9 \times 10^{-4}$
Polivinilpirrolidona *	0,13
Sacarina	$4,8 \times 10^{-5}$
Ácido cítrico	$1,0 \times 10^{-5}$
Carboximetilcelulose *	$4,0 \times 10^{-4}$

(*)% m/v. concentração de furosemida: $2,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

4.1.6 Teste de adição e recuperação

No teste de recuperação do analito, três concentrações diferentes de solução de referência de furosemida são adicionadas a soluções de amostras contendo uma concentração de furosemida $1,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e os resultados obtidos, descontados daqueles originalmente sem a adição da solução de referência, foram comparados. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.4.

TABELA 4.4 Estudo da recuperação de furosemida em formulações farmacêuticas comerciais

Amostras	Furosemida / 10^{-5} mol L ⁻¹		Recuperação/%
	Adicionado	Encontrado	
Furosem [®]	2,0	2,00	100
	3,0	2,96	98,8
	5,0	4,90	98,0
Lasix [®]	2,0	2,02	101
	3,0	2,97	99,1
	5,0	4,95	99,0
Diurisa [®]	2,0	2,00	100
	3,0	2,95	98,4
	5,0	4,89	97,8
Hidrion [®]	2,0	1,97	98,9
	3,0	2,94	98,0
	5,0	4,90	98
Furosemida composto [®]	2,0	2,04	102
	3,0	2,97	99,2
	5,0	4,93	98,7

n=3.

4.1.7 Aplicação

O método proposto foi aplicado na determinação de furosemida em 5 formulações comerciais disponíveis indicadas na Tabela 4.4. A Tabela 4.5 apresenta os teores rotulados, encontrados empregando-se o método da Farmacopéia Britânica e os teores encontrados empregando-se o método proposto nesta tese. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos utilizando um procedimento analítico comparativo descrito na Farmacopéia Britânica¹²⁴. Aplicando-se o teste-*t* pareado para os resultados obtidos utilizando-se os dois métodos, verificou-se que não há diferença significativa entre os resultados encontrados a um nível de 95% de confiança, indicando a exatidão do procedimento em fluxo desenvolvido. Os sinais transientes obtidos das soluções de referência e soluções de amostras injetados no sistema em fluxo proposto estão mostrados na Figura 4.8.

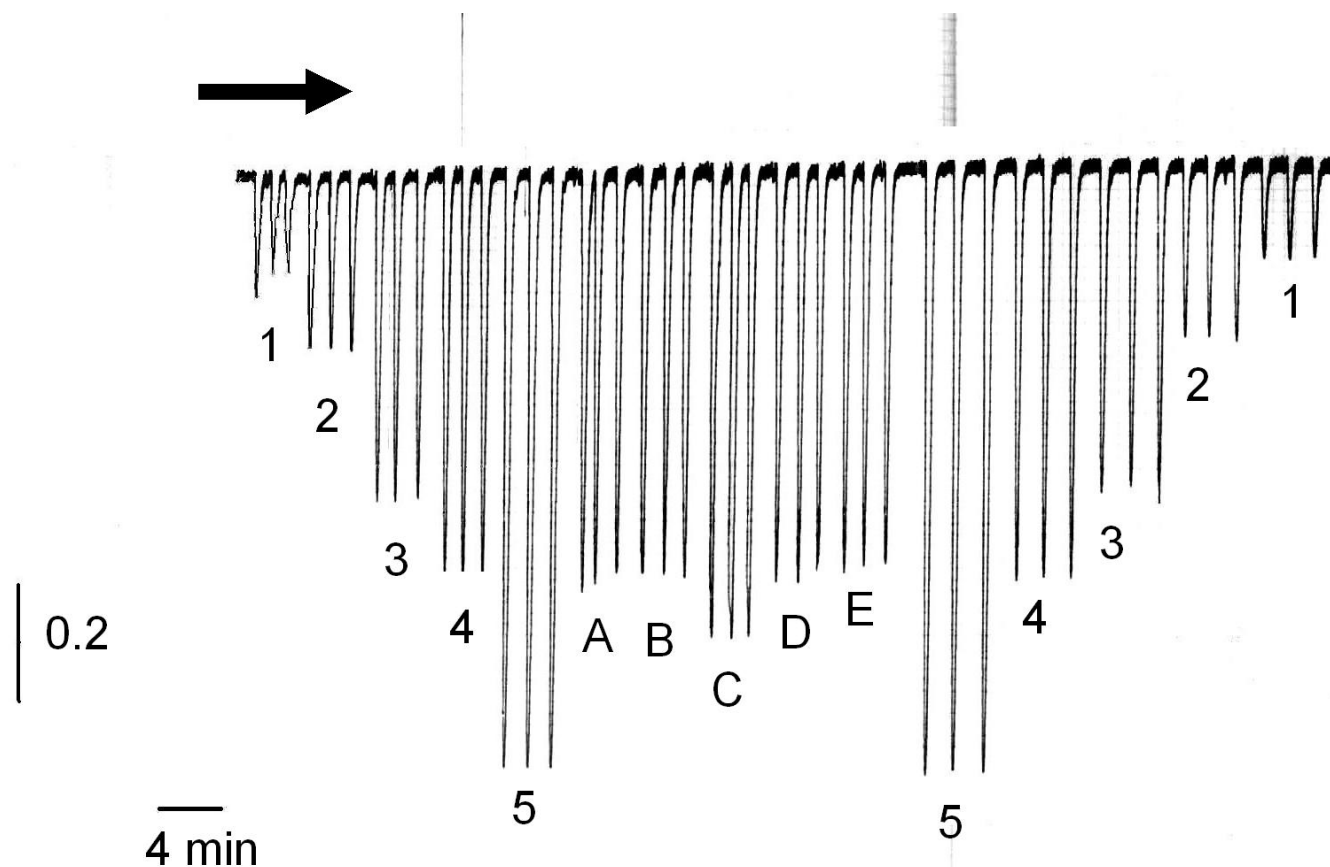


FIGURA 4.8 Sinais transientes obtidos na determinação de furosemida em formulações farmacêuticas empregando o sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para soluções de referência nas concentrações (1) $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; (2) $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; (3) $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; (4) $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e (6) $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, seguidas dos sinais transientes em triplicatas para as soluções de amostras (A-E) e novamente os sinais das soluções de referência em concentrações decrescentes.

TABELA 4.5 Determinação de furosemida em amostras farmacêuticas pelo método proposto e pelo método oficial¹²⁴

Amostras	Furosemida/ mg g ⁻¹			Erro relativo / %	
	Rotulado	Método Oficial	Método Proposto	E ₁	E ₂
A Furosem [®]	244	222 ± 5	230 ± 3	3,5	-5,8
B Lasix [®]	246	236 ± 5	240 ± 2	1,6	-2,5
C Diurisa [®]	160	180 ± 6	180 ± 2	0,0	12,5
D Hidrion [®]	132	127 ± 4	132 ± 3	4,1	0
E Furosemida Composto [®]	200	190 ± 4	191 ± 1	1,0	-4,5

n=3; E₁: erro relativo entre o Método Proposto vs. Método Oficial; E₂: erro relativo entre o Método Proposto vs. rotulado.

4.2 Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de paracetamol em produtos farmacêuticos

Paracetamol pode ser oxidado pelo hipoclorito produzindo uma série de substâncias, entre elas a 2,2'-dihidroxi-5,5'diacetildiaminobifenila, substância que apresenta fluorescência com excitação máxima em 335 nm e uma emissão em 427 nm, como indicado na FIGURA 4.9. VILCHEZ et al.¹³⁴ empregaram o hipoclorito de sódio como agente oxidante para o desenvolvimento de um procedimento para a determinação de paracetamol em plasma e produtos farmacêuticos com detecção fluorescente.

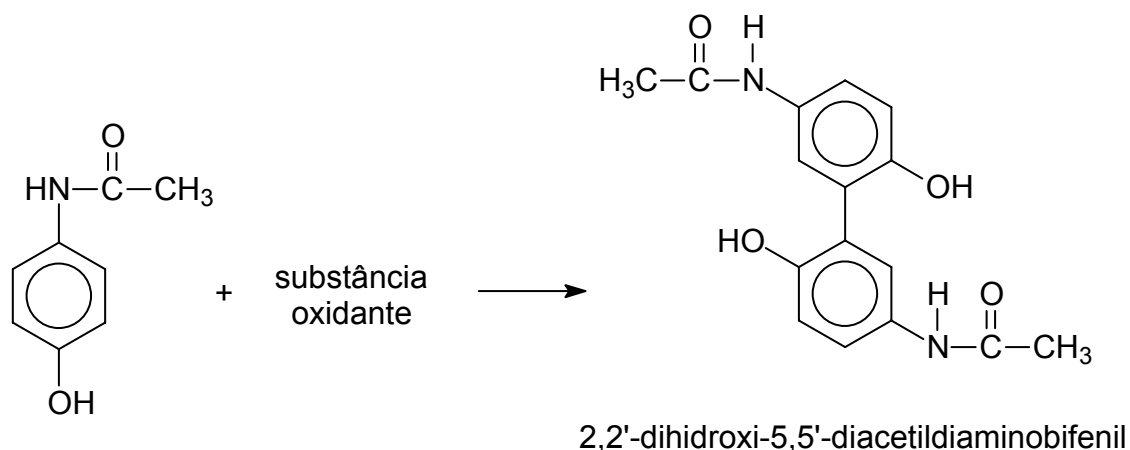


FIGURA 4.9 Esquema da reação de oxidação do paracetamol¹³⁴.

Os produtos da reação entre o paracetamol e hipoclorito de sódio foram identificados por BEDNER e MACCREHAN¹³⁵. Neste estudo foram identificadas as substâncias apresentadas na Figura 4.10.

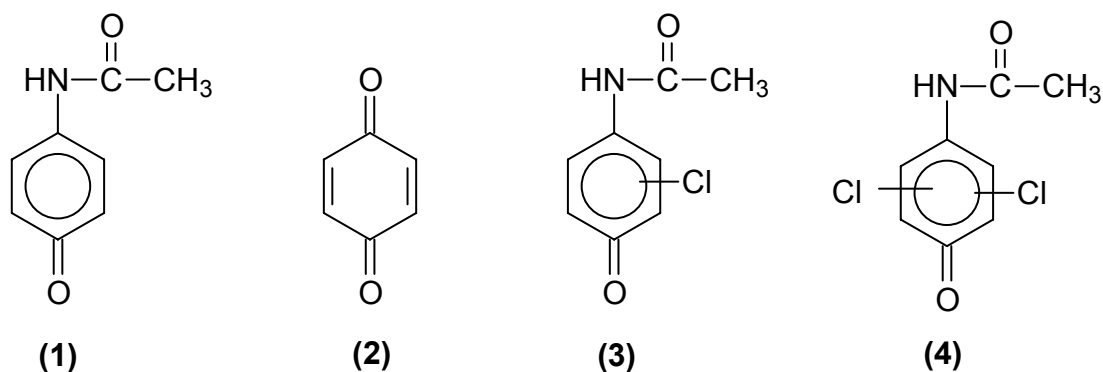


FIGURA 4.10 Produtos da reação de paracetamol com hipoclorito. (1) N-acetil-*p*-benzoquinona imina (2)1,4-benzoquinona (3)cloro-4-acetoaminofenol (4) dicloro-4-acetoaminofenol¹³⁵.

Devido essa capacidade de reação do paracetamol e hipoclorito de sódio, desenvolveu-se um sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação indireta de paracetamol em formulações farmacêuticas em que se empregou a reação do paracetamol com um excesso de hipoclorito, sendo a concentração de hipoclorito de sódio que não reage com o paracetamol monitorado espectrofotometricamente após reação com *o*-tolidina.

4.2.1 Estudo dos parâmetros químicos do sistema FIA para a determinação de paracetamol

Os parâmetros químicos e de fluxo foram estudados empregando o método univariado, buscando sempre a melhor razão entre sinal analítico, precisão e frequência de amostragem.

A configuração do sistema em fluxo empregado para a otimização dos parâmetros químicos está mostrada na Figura 3.3, com um volume de alça de amostragem de 100 μL , comprimento das bobinas reacionais B_1 e B_2 de 150 e 60 cm, respectivamente.

Inicialmente foi verificado o efeito da concentração de hipoclorito sobre o sinal analítico de uma solução de referência de paracetamol $7,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As concentrações foram estudadas variaram de $2,4 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, o resultado é mostrado na Figura 4.11, empregando uma solução de o-tolidina $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $2,2 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Verifica-se um aumento do sinal analítico até a concentração de hipoclorito de sódio $9,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sendo menor para a concentração superior. A precisão entre as medidas aumentou com o aumento na concentração de hipoclorito. Considerando-se o sinal analítico e a precisão entre as medidas, selecionou-se a concentração de $9,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para os demais experimentos.

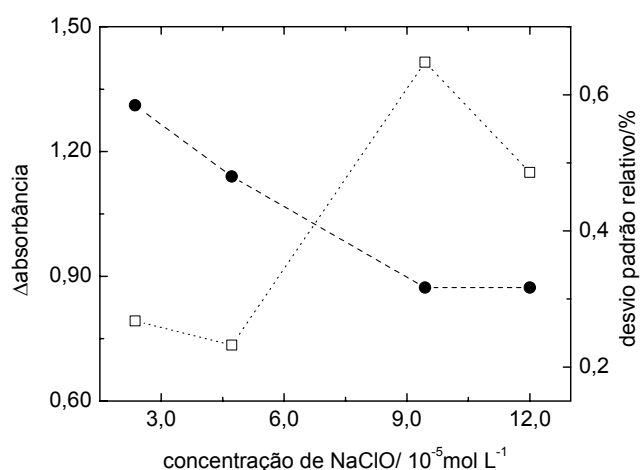


FIGURA 4.11 Efeito da concentração de hipoclorito de sódio na determinação de paracetamol ($n=3$). Absorbância (---□---) e precisão (---●---).

O efeito da concentração de HCl da solução de o-tolidina sobre o sinal analítico de uma solução de referência de paracetamol $5,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi avaliado nas concentrações $4,4 \times 10^{-2}$, $1,2 \times 10^{-1}$, $1,7 \times 10^{-1}$ e $2,2 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Pôde-se verificar que o aumento da concentração da solução de HCl proporciona um aumento no sinal analítico, uma vez que a concentração hidrogeniônica é de fundamental importância na reação entre o hipoclorito e o-tolidina. Os resultados obtidos tornaram-se mais exatos com o aumento da concentração de HCl. Sendo assim, selecionou-se a concentração de $1,9 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ desse ácido para os demais experimentos.

Foi verificado também, o efeito da concentração da solução de o-tolidina nas concentrações de $1,6 \times 10^{-5}$, $7,8 \times 10^{-5}$, $9,8 \times 10^{-5}$ e $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de HCl $1,9 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o sinal analítico (ΔA) para uma solução de paracetamol $5,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, empregando-se uma solução de hipoclorito de sódio $9,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Como mostrado na Figura 4.12, verifica-se um aumento no sinal analítico e também um aumento da precisão das medidas até a concentração de o-tolidina de $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Sendo assim, selecionou-se a concentração de $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para os demais experimentos.

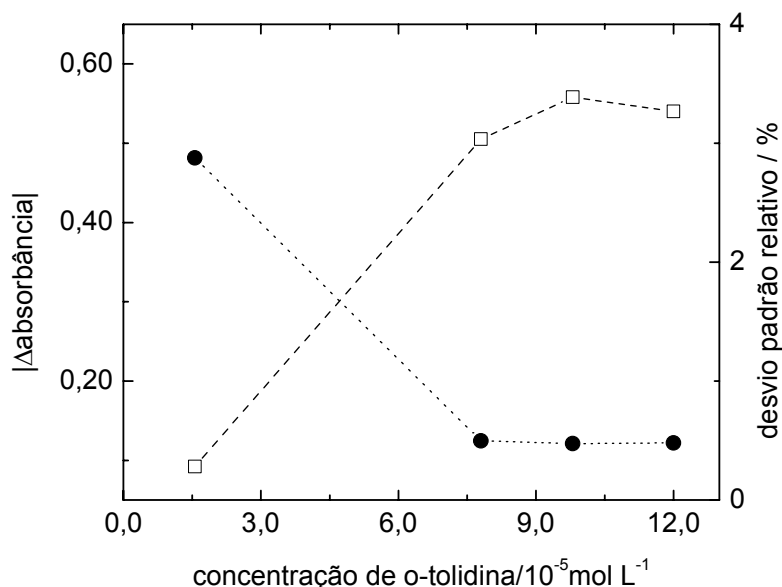


FIGURA 4.12 Efeito da concentração de o-tolidina na determinação de uma solução de referência de paracetamol $5,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=3$). Absorbância (---□---) e precisão (···●···).

A Figura 4.13 apresenta o efeito da concentração hidrogeniônica no intervalo de pH entre 7 e 11,4 sobre o sinal analítico. A resposta analítica mostrada na Figura 4.13 deve depender da distribuição das espécies HClO e ClO⁻ no meio reacional. Sabe-se que até um valor de pH 7,54 há a predominância do ácido hipocloroso (HClO). Já em valores de pH superiores a 7,54, predomina-se a espécie ionizada hipoclorito (ClO⁻). Para as soluções com pH acima de 9,0, houve uma diminuição do sinal analítico, sendo que além da presença desse ânion a concentração hidrogeniônica menor influencia na reação entre o ClO⁻ e o-tolidina. Dessa maneira, selecionou-se o pH 9,0 para o desenvolvimento dos trabalhos.

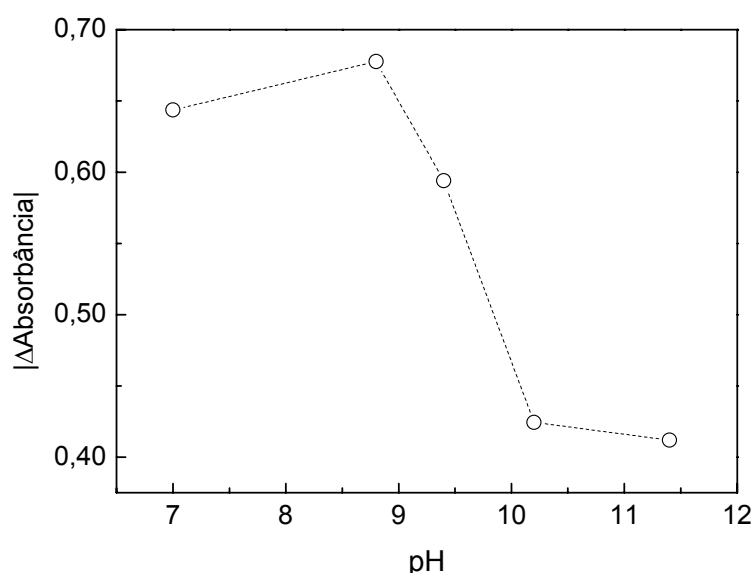


FIGURA 4.13 Efeito do pH da solução de hipoclorito de sódio $9,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na determinação de paracetamol.

4.2.2 Estudos dos parâmetros físicos do sistema FIA

A otimização dos parâmetros físicos do sistema de análise por injeção em fluxo foi realizada empregando o método univariado, considerando-se a relação entre sinal analítico, precisão e frequência de amostragem.

O efeito do volume da alça de amostragem sobre o sinal analítico (ΔA) de uma solução de paracetamol $8,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi estudado no intervalo de 100 a

500 μL . Com o aumento do volume da alça de amostragem, verificou-se um aumento da magnitude do sinal analítico até o volume de 400 μL , permanecendo constante para o volume superior. Como pode ser verificado na Figura 4.14, a precisão das medidas é maior para os volumes maiores avaliados. Portanto, um volume de 400 μL foi selecionado para as etapas posteriores do trabalho.

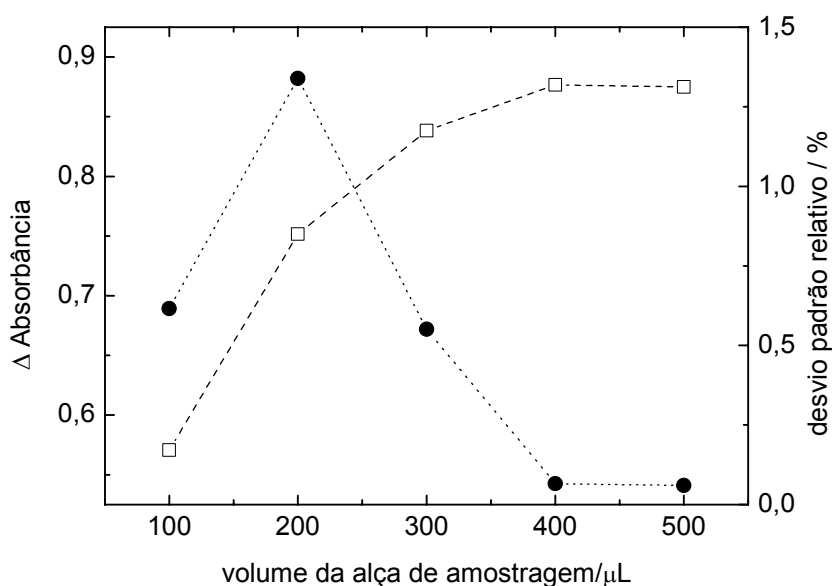


FIGURA 4.14 Efeito do volume da alça de amostragem na determinação uma solução de referência de paracetamol $8,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=3$). Absorbância (---□---) e precisão (...●...).

O efeito do comprimento da bobina reacional B_1 na determinação de paracetamol foi estudado nos comprimentos de 30 a 150 cm. Os sinais analíticos (ΔA) aumentaram com o aumento do comprimento da bobina até 75 cm. Nos comprimentos maiores, observou-se uma diminuição dos sinais analíticos, seguido de perda da precisão. Considerando-se a magnitude do sinal analítico e precisão, selecionou-se o comprimento de 75 cm para os demais experimentos.

O comprimento da bobina B_2 foi variado entre 40 a 150 cm. Os sinais analíticos foram maiores no comprimento de 75 cm. A precisão das medidas foi menor para comprimentos superiores a 75 cm. Sendo assim, selecionou-se o comprimento de 75 cm como ótimo.

No processo de otimização do sistema em fluxo variou-se a vazão do reagente hipoclorito em 0,9, 1,6 e 2,2 mL min^{-1} , como mostrado na Figura 4.15. O aumento da vazão até 2,2 mL min^{-1} , ocasionou um decréscimo do sinal analítico da

ordem de 50%, sendo que a precisão manteve-se constante no intervalo de vazão de 0,9 a 1,6 mL min⁻¹ e diminuiu significativamente para a vazão da solução de ClO⁻ 2,2 mL min⁻¹. Com isso, considerando-se a sensibilidade, precisão e frequência de amostragem, selecionou-se a vazão de 0,9 mL min⁻¹ para os experimentos seguintes.

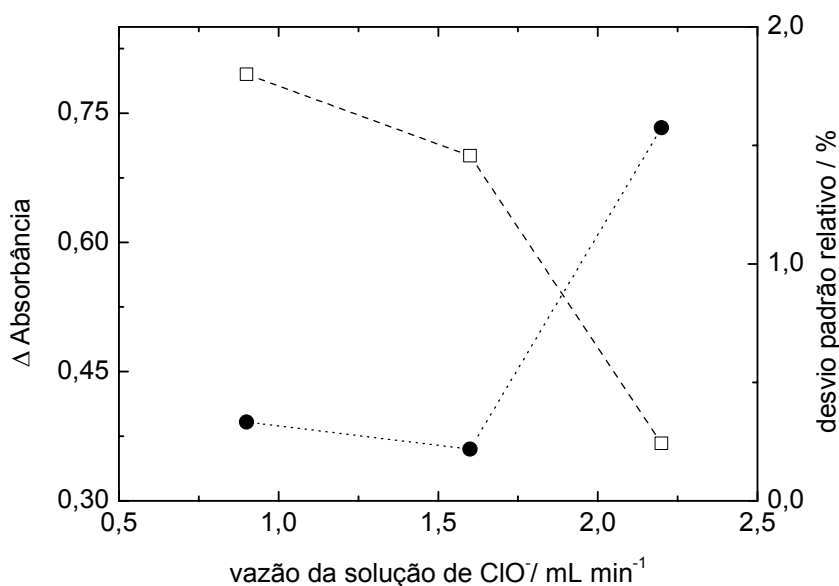


FIGURA 4.15 Efeito da vazão da solução de hipoclorito de sódio sobre o sinal analítico para a solução de referência de paracetamol $5,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).

O efeito da vazão da solução de o-tolidina nas vazões de 0,9, 1,6 e 2,2 mL min⁻¹ sobre o sinal analítico foi também estudado na determinação de solução de referência de paracetamol $5,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os resultados obtidos mostram que os maiores sinais foram aqueles obtidos com uma vazão de o-tolidina de 1,6 mL min⁻¹. A precisão dos sinais analíticos obtidos empregando-se essa vazão foi adequada sendo então selecionada para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas.

A vazão da solução transportadora foi avaliada entre 1,6 a 3,2 mL min⁻¹, sobre o sinal analítico de uma solução de referência de paracetamol. Verificou-se uma queda do sinal analítico para vazões menores que 2,2 mL min⁻¹. O mesmo foi observado para a vazão de 3,2 mL min⁻¹, somando-se ainda a perda da precisão

entre as medidas de absorvância nesta vazão. Sendo assim, selecionou-se a vazão de 2,2 mL min⁻¹ como ótima para a configuração final do sistema em fluxo.

4.2.3 Fotodegradação da o-tolidina empregando radiação ultravioleta e H₂O₂

No desenvolvimento desse sistema também foi avaliado a degradação fotoassistida do reagente oxidado descartado, empregando solução de peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta. A configuração do sistema em fluxo está mostrada na Figura 3.2. Esses estudos foram realizados monitorando-se a absorvância do resíduo gerado no frasco em 430 nm.

Como foi verificado no item 4.1.3, a radiação UV tem influência na degradação da o-tolidina. Dessa maneira, avaliou-se o efeito da concentração de H₂O₂ sobre a degradação da o-tolidina na concentrações 0,10; 0,22 e 0,44 mol L⁻¹, empregando-se a configuração do sistema em fluxo descrito na Figura 3.2. Verificou-se que a degradação ocorreu na totalidade com a solução de peróxido de hidrogênio 0,22 mol L⁻¹, propulsionado a mesma vazão indicada na legenda da Figura 3.2. Sendo assim, selecionou-se esta concentração para a configuração final do sistema em fluxo para determinação de paracetamol.

A TABELA 4.6 apresenta um resumo dos estudos de otimização do procedimento em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas.

TABELA 4.6 Parâmetros estudados na otimização do sistema em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de paracetamol

Parâmetro	Faixa estudada*	selecionado
Hipoclorito / 10^{-4} mol L ⁻¹	0,24 a 1,2	0,94
HCl / mol L ⁻¹	0,04 a 0,22	0,19
o-tolidina / 10^{-4} mol L ⁻¹	0,16 a 1,2	0,98
pH (solução tampão borato 0,05 mol L ⁻¹)	7,0 a 11,4	9,0
Volume da alça / μ L	200 a 500	400
Reator B ₁ / cm	30 a 150	75
Reator B ₂ / cm	40 a 150	75
Vazão do hipoclorito / mL min ⁻¹	0,9 a 2,2	0,9
Vazão da o-tolidina / mL min ⁻¹	0,9 a 2,2	1,6
Vazão do carregador / mL min ⁻¹	1,6 a 3,2	2,2

*método univariado.

4.2.4 Parâmetros analíticos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de paracetamol

O sistema de análise por injeção em fluxo mostrou uma curva analítica linear entre a faixa de concentração de $8,5 \times 10^{-6}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ descrita pela equação $\Delta A = 0,010 + 1\,517,41 \times [\text{PAR}]$, $r = 0,9998$, na qual ΔA representa a diminuição da absorvância promovida pela injeção de paracetamol e C a concentração de paracetamol em mol L⁻¹.

Um desvio-padrão relativo (RSD) para uma solução de referência de paracetamol contendo $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de 1,2% (n=10) e limite de detecção de $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (3 x desvio padrão relativo do branco/inclinação da curva analítica) foram obtidos. Uma frequência de amostragem de 60 amostras por hora.

4.2.5 Estudo de interferentes

A seletividade do sistema de análise por injeção em fluxo proposto foi avaliada comparando-se o sinal analítico de uma solução de referência de

paracetamol $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ contendo substâncias que se apresentam como excipientes nas formulações farmacêuticas e com o sinal analítico obtido de uma solução de paracetamol de mesma concentração, mas sem a adição do interferente estudado. A concentração tolerada do excipiente foi aquela que promoveu uma variação do sinal analítico (ΔA) não superior a $\pm 5\%$. As substâncias avaliadas bem como a concentração tolerada são mostradas na Tabela 4.7.

TABELA 4.7 Estudo da seletividade na determinação de paracetamol empregando o sistema de análise por injeção em fluxo com hipoclorito e o-tolidina como reagentes

Excipientes	Concentração tolerada / mol L ⁻¹
Ácido cítrico	$6,9 \times 10^{-6}$
Cafeína	$1,2 \times 10^{-6}$
Polivinilpirrolidona*	0,13
Sacarina	$4,8 \times 10^{-5}$
Tartrazina	$1,8 \times 10^{-6}$
Sacarose	$2,2 \times 10^{-6}$
EDTA-Na	$1,0 \times 10^{-5}$
Carboximetilcelulose(*)	$4,0 \times 10^{-4}$

(*)% m/v. Concentração de paracetamol: $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

4.2.6 Estudo da recuperação em amostras comerciais

A avaliação da recuperação de paracetamol nas amostras comerciais foi realizada empregando-se oito formulações farmacêuticas disponíveis comercialmente. O estudo foi realizado adicionando-se alíquotas de solução de referência de paracetamol obtendo-se assim três concentrações finais de ($9,5 \times 10^{-5}$, $1,12 \times 10^{-4}$ e $1,81 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) a uma solução da amostra contendo paracetamol na concentração de $1,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A porcentagem de recuperação do analito nas

amostras foi obtida subtraindo-se o sinal analítico da solução de amostra mais excipiente daquele contendo apenas o analito. Os valores de recuperação estão apresentados na Tabela 4.8.

TABELA 4.8 Estudo da recuperação de paracetamol empregando o sistema de análise por injeção em fluxo

Amostras	Adicionado / 10^{-4} mol L ⁻¹	Encontrado / 10^{-4} mol L ⁻¹	Recuperação / %
Cibalena [®]	0,95	0,95	100
	1,12	1,13	101
	1,81	1,83	101
Tylenol 500 [®]	0,95	0,95	101
	1,12	1,1	98,9
	1,81	1,7	97,1
Tyramol 750 [®]	0,95	0,97	102
	1,12	1,15	103
	1,81	1,78	98,6
Tylenol 750 [®]	0,95	0,98	104
	1,12	1,15	103
	1,81	1,80	99,5
Paracetamol 500 [®]	0,95	0,95	100
	1,12	1,15	103
	1,81	1,86	103
Tylenol DC [®]	0,95	0,96	101
	1,12	1,11	99,3
	1,81	1,79	98,9
Resfry [®]	0,95	0,95	100
	1,12	1,11	99,0
	1,81	1,78	98,6
Paracetamol [®]	0,95	0,94	98,9
	1,12	1,11	99,3
	1,81	1,80	99,8

n=3.

4.2.7 Aplicação

A determinação de paracetamol foi realizada empregando o sistema em fluxo proposto em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram comparados com um método oficial descrito na Farmacopéia Americana (USP)⁴⁶. Os sinais transientes obtidos na determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando o sistema em fluxo proposto estão apresentados na Figura 4.16. Os resultados obtidos estão em concordância com aqueles obtidos pelo método oficial a um nível de confiança de 95% e são indicados na Tabela 4.9.

TABELA 4.9 Determinação de paracetamol empregando o sistema de análise por injeção em fluxo proposto e o método comparativo da Farmacopéia Americana (USP)⁴⁶

Amostras	Paracetamol / mg g ⁻¹			Erro relativo / %	
	Rotulado	Método Oficial	Método Proposto	E ₁	E ₂
A Cibalena [®]	300	300 ± 5	302 ± 3	0,7	0,7
B Tylenol 500 [®]	804	850 ± 4	840 ± 4	1,2	4,5
C Tyramol 750 [®]	850	860 ± 6	820 ± 3	-4,9	-3,5
D Tylenol 750 [®]	900	850 ± 7	861 ± 5	1,3	-4,3
E Paracetamol 500 [®]	833	820 ± 4	868 ± 3	5,5	4,2
F Tylenol DC [®]	728	760 ± 6	771 ± 2	1,	5,9
G Resfry [®]	405	410 ± 5	391 ± 1	-4,9	-3,5
H Paracetamol [®] (*)	200	190 ± 6	203 ± 2	6,4	1,5

E₁: erro relativo entre o Método Proposto vs. Método Oficial; E₂: erro relativo entre o Método Proposto vs. Rotulado. (*)mg mL⁻¹; n=3.

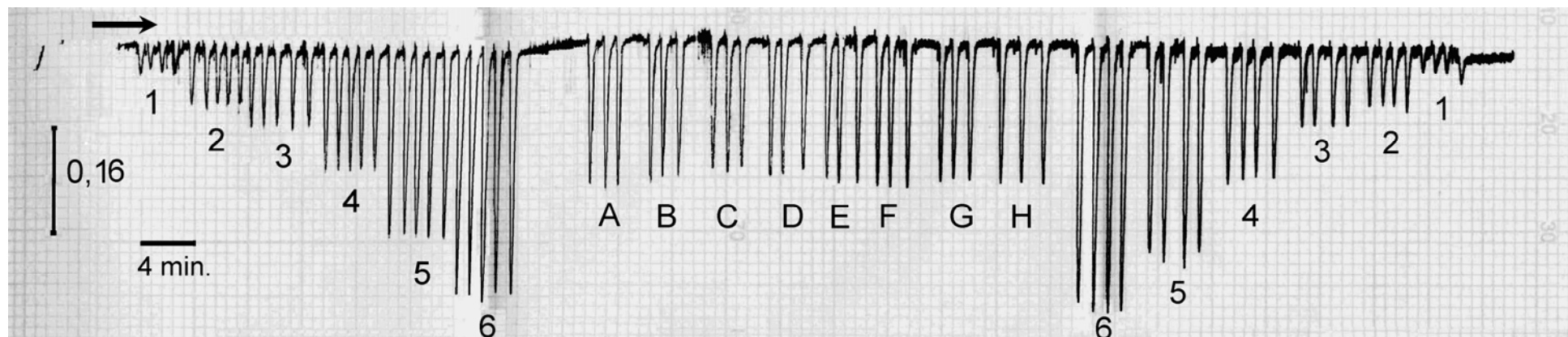


FIGURA 4.16 Sinais transientes obtidos na determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas para soluções de referência nas concentrações (1) $8,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (2) $2,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (3) $4,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (4) $9,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (5) $1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (6) $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, seguida dos sinais transientes das soluções das amostras (A-H) e das soluções de referência novamente em ordem decrescente de concentração.

4.3 Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo reverso para a determinação de paracetamol empregando nitrito de sódio como reagente

O paracetamol (4-aminofenol) pode reagir com o ácido nitroso para formar um cromóforo que absorve no comprimento de onda de 410 nm. O sistema desenvolvido empregou a geração química “em linha” de ácido nitroso (equação 1, Figura 4.17) pela injeção de uma alíquota de solução de nitrito de sódio em uma solução transportadora ácida (HCl). Em seguida, ocorre a reação de nitração do paracetamol presente, formando o cromóforo 2-nitro-4-acetoamidofenol (equação 2, Figura 4.17).

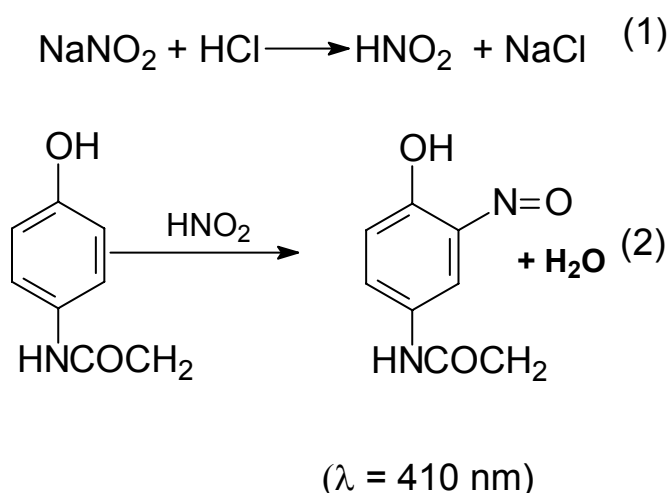


FIGURA 4.17 Esquema reacional para a determinação de paracetamol empregando nitrito de sódio como reagente.

O emprego de ácido nitroso (HNO_2) gerado *in situ* em sistemas de análise por injeção em fluxo pode causar problemas, devido à formação de bolhas que ocasionam distúrbios no fluxo e sinais espúrios¹⁰³. Nos métodos em batelada, a interferência causada pela evolução de bolhas pode ser suprimido pelo consumo do excesso de HNO_2 com sulfamato de amônio¹⁰². Os sistemas em fluxos permitem

contornar esse problema com o uso de confluência, inserção de uma pequena alíquota do reagente, ou mesmo com a diminuição da concentração do reagente.

Diante disso, a configuração do sistema em fluxo proposto para a determinação de paracetamol empregando nitrito de sódio em meio ácido como reagente foi aquela que emprega a injeção do reagente em um fluxo transportador contendo o analito. Uma vez inserida uma alíquota da solução contendo o reagente, a dispersão promoveria a formação do ácido nitroso, seguido do conseqüente consumo do reagente. A concentração do ácido nitroso na zona dispersa do reagente foi mantida a uma concentração que impediu a formação de bolhas (N₂).

4.3.1 Estudos dos parâmetros químicos do sistema em fluxo

Os parâmetros químicos foram estudados empregando o método univariado, buscando sempre o melhor compromisso entre sinal analítico, precisão e frequência de amostragem. A configuração do sistema em fluxo empregado foi o mostrado na Figura 3.5, com volume de alça do reagente de 75 µL, comprimento da bobina reacional de 100 cm e vazão de aspiração da amostra de 2,9 mL min⁻¹.

O efeito da concentração de HCl no sinal analítico para uma solução de paracetamol 5,4x10⁻⁴ mol L⁻¹ foi avaliado entre 8,8x10⁻³ a 3,5x10⁻² mol L⁻¹. Como mostrado na Figura 4.18, pode-se verificar um aumento acentuado do sinal analítico até a concentração de HCl 2,2x10⁻² mol L⁻¹, havendo um menor aumento para a concentração superior. A precisão das medidas obtidas diminuiu com o aumento da concentração de HCl. Dessa maneira selecionou-se a concentração de 2,2x10⁻² mol L⁻¹ para os demais experimentos.

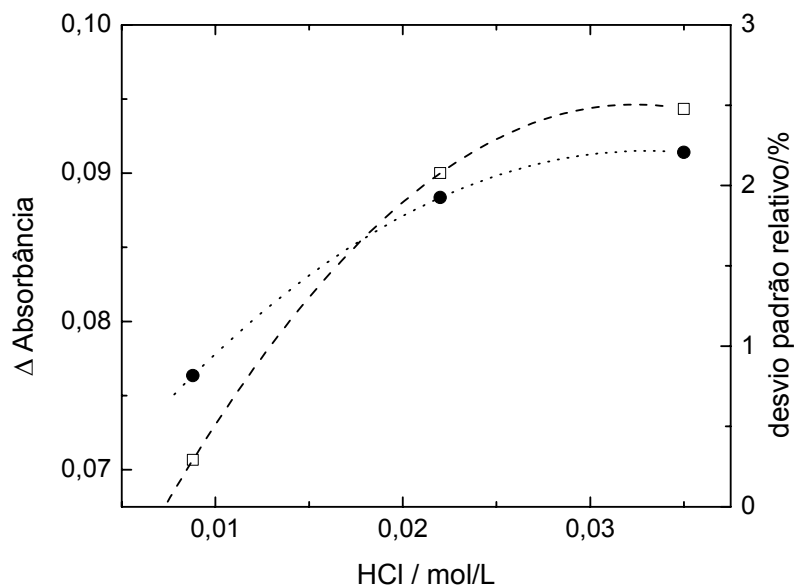


FIGURA 4.18 Estudo da concentração de ácido clorídrico sobre o sinal analítico de uma concentração de paracetamol $5,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=3$). Absorbância (---□---) e precisão (...●...).

O efeito da concentração de nitrito de sódio sobre o sinal analítico de uma solução de referência de paracetamol $5,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi avaliado entre $3,2 \times 10^{-2}$ a $1,2 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se um aumento no sinal analítico com o aumento da concentração de nitrito, bem como um aumento expressivo da precisão entre as médias. Considerando-se a magnitude do sinal analítico, consumo do reagente e precisão obtidos, selecionou-se a concentração $8,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para os demais experimentos.

4.3.2 Estudo dos parâmetros físicos do sistema em fluxo

Na otimização dos parâmetros físicos do sistema em fluxo foram avaliados a sensibilidade, precisão entre as medidas e frequência de amostragem.

O efeito do volume da alça de reagente sobre o sinal analítico de uma solução de referência de paracetamol $5,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi avaliado entre $50 \mu\text{L}$ a $200 \mu\text{L}$. Pode-se verificar uma queda acentuada do sinal analítico com o aumento do volume da alça de reagente. Isso se deve a uma maior dificuldade de mistura da

zona de reagente dispersa com a solução contendo o analito. Ademais, o aumento do volume da alça de reagente ocasionou uma menor precisão das medidas. Foi verificada a formação de picos duplos para os volumes de 120 e 200 μL . Esse efeito tem como origem a menor dispersão da solução transportadora, contendo paracetamol, até o centro da zona de reagente dispersa¹³. Com isso, selecionou-se o volume de 50 μL para os demais experimentos.

O efeito do comprimento da bobina reacional, aquela que permite a dispersão da zona do reagente, sobre o sinal analítico foi avaliado entre 60 a 250 cm. Pode-se verificar o aumento do sinal analítico com o aumento do comprimento da bobina reacional, como mostrado na Figura 4.19, devido ao maior tempo disponível para a reação química entre o ácido nitroso e paracetamol ocorrer. A precisão entre as medidas efetuadas da solução de referência de paracetamol aumentou, conforme aumentou o comprimento da bobina reacional. Dessa maneira, selecionou-se o comprimento de 210 cm para os demais experimentos.

O efeito da vazão da solução de referência/amostra de paracetamol sobre o sinal analítico de uma solução de paracetamol aspirada foi avaliado entre 1,9 a 4,5 mL min^{-1} . Verificou-se uma queda acentuada do sinal analítico até a vazão de 4,5 mL min^{-1} , com o conseqüente aumento da precisão entre as medidas efetuadas. O aumento da vazão da solução de referência diminuiu o tempo de produção de ácido nitroso com a conseqüente diminuição do tempo de reação com o paracetamol. Levando-se em consideração a sensibilidade, precisão e frequência de amostragem, selecionou-se a vazão de 2,2 mL min^{-1} para os demais experimentos.

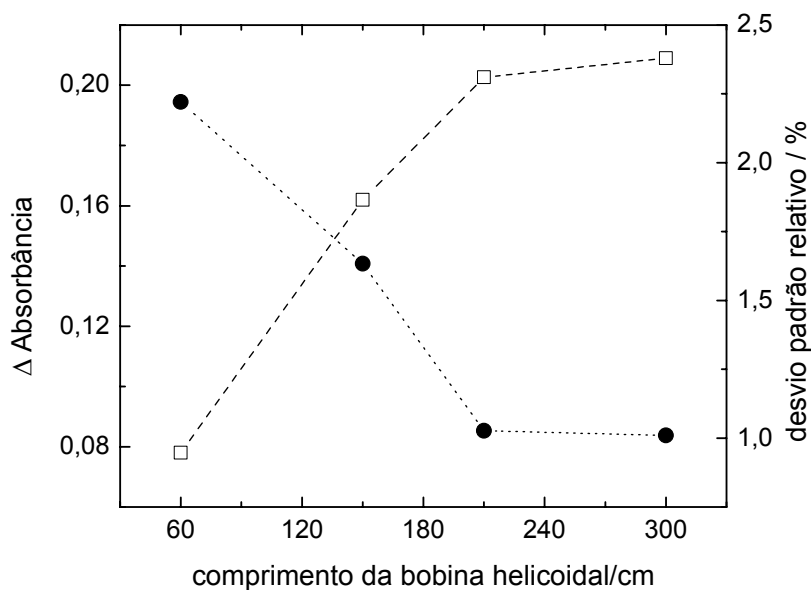


FIGURA 4.19 Efeito do comprimento da bobina reacional na determinação de paracetamol (n=3). Absorbância (--□--) e precisão (...●...).

A Tabela 4.10 sumariza os parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo com injeção de reagente para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas.

TABELA 4.10 Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo com injeção de reagente para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas

Parâmetros	Faixa estudada*	Selecionado
HCl / 10 ⁻² mol L ⁻¹	0,8 a 3,5	2,2
NaNO ₂ / 10 ⁻² mol L ⁻¹	3,2 a 12	8,2
Volume de reagente / μL	40 a 200	50
Bobina reacional / cm	60 a 250	210
Vazão do sistema / mL min ⁻¹	1,9 a 4,5	2,2

* método univariado.

4.3.3 Parâmetros analíticos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de paracetamol empregando nitrito de sódio como reagente

O sistema de análise por injeção em fluxo proposto empregando nitrito de sódio como reagente apresentou uma curva analítica variando de $4,0 \times 10^{-5}$ a $1,1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, sendo a equação que descreve a melhor regressão foi uma equação polinomial de ordem 2: $Abs = 0,031 - 714,01x[PAR] - 203.425,50x[PAR]^2$, $r^2 = 0,9998$; na qual Abs é a absorvância e [PAR] é a concentração de paracetamol em mol L⁻¹.

Um limite de detecção de 2×10^{-5} mol L⁻¹ (3x desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica) e desvios padrão relativos menores que 2% foram obtidos para duas soluções de referência de paracetamol nas concentrações de 8×10^{-4} mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Os sinais analíticos do estudo da repetibilidade estão mostrados na Figura 4.20. A frequência de amostragem obtida foi de 45 determinações por hora.

4.3.4 Estudo da seletividade

O efeito das substâncias excipientes presentes nas formulações farmacêuticas sobre o sinal analítico foi avaliado. Nesse estudo, adicionaram-se soluções dos excipientes nas concentrações mostradas na Tabela 4.11 a uma solução de referência de paracetamol na concentração de $5,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e o resultado obtido foi comparado com o resultado obtido de uma solução de referência de mesma concentração, sem a adição do excipiente. A concentração do excipiente tolerada foi aquela que causou um erro não superior a $\pm 5\%$. As substâncias avaliadas nesse estudo, bem como as concentrações máximas tolerada estão apresentadas na Tabela 4.11.

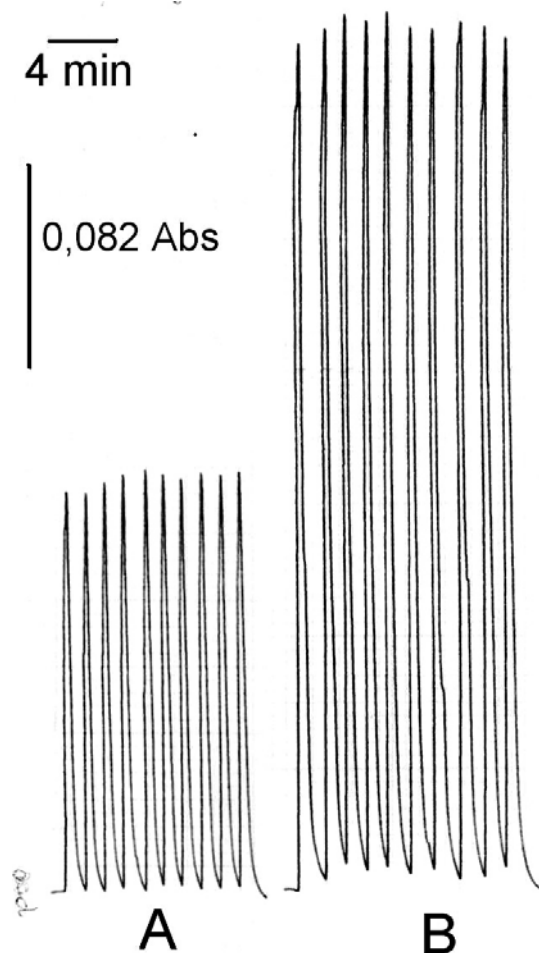


FIGURA 4.20 Sinais transientes obtidos no estudo da repetibilidade do procedimento em fluxo para concentrações de paracetamol: (A) $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. as condições do sistema são as mesmas apresentadas na Figura 3.4.

Pode verificar-se que dos excipientes avaliados, estearato de sódio, ácido ascórbico e a cafeína apresentam alguma interferência, como mostrado na Tabela 4.11. Os demais excipientes não mostraram interferência na mesma concentração que o analito.

TABELA 4.11 Avaliação das substâncias interferentes na determinação de paracetamol

Excipientes	Concentração tolerada / mol L ⁻¹
Salicilato de sódio	1,6x10 ⁻³
Estearato de sódio	7,6x10 ⁻⁵
Ácido ascórbico	4,4x10 ⁻⁵
Polivinilpirrolidona ^b	8,0x10 ⁻⁴
Amido ^b	3,2x10 ⁻⁴
Bissulfito de sódio	1,2x10 ⁻⁴
Citrato de sódio	5,4x10 ⁻⁴
Benzoato de sódio	6,0x10 ⁻⁴
Glicose	4,4x10 ⁻⁴
Cafeína	7,0x10 ⁻⁵
hidrogenofosfato de sódio	6,1x10 ⁻⁴
Sacarina	4,0x10 ⁻⁴

^a Concentração de paracetamol: 5,3x10⁻⁴ mol L⁻¹;

^b % (m/v).

4.3.5 Estudo da recuperação das amostras comerciais

A recuperação foi avaliada adicionando-se às soluções das amostras comerciais contendo uma concentração final de paracetamol 1,2x10⁻⁴ mol L⁻¹, alíquotas de solução de referência de paracetamol de modo a obter as seguintes concentrações finais de paracetamol: 2,1 x10⁻⁴; 4,2 x10⁻⁴ e 8,5 x10⁻⁴ mol L⁻¹. Os resultados obtidos dessas soluções foram comparados com aquela solução de amostra, sem a adição da solução de referência. Os resultados de recuperação variaram de 97,6 a 103 %, como mostrados na Tabela 4.12.

TABELA 4.12 Estudo da recuperação de paracetamol em formulações farmacêuticas

Amostras	Paracetamol / 10^{-4} mol L ⁻¹		E _r %
	adicionado	encontrado	
Paracetamol	2,14	2,20	103
	4,23	4,20	99,3
	8,48	8,34	98,7
Cibalena	2,14	2,14	100
	4,23	4,23	100
	8,48	8,73	103
Saridon	2,14	2,18	102
	4,23	4,27	101
	8,48	8,48	100
Tylenol gotas(*)	2,14	2,08	97,6
	4,23	4,14	98,0
	8,48	8,43	99,5
Resfry	2,14	2,12	99,3
	4,23	4,14	98,1
	8,48	8,36	98,6
Tylenol 500	2,14	2,14	100
	4,23	4,20	99,5
	8,48	8,32	98,2
Paracetamol G 750	2,14	2,14	100
	4,23	4,16	98,5
	8,48	8,33	98,3
Tylenol 750	2,14	2,09	98,0
	4,23	4,16	98,5
	8,48	8,43	99,5

Concentração de paracetamol: = $1,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

4.3.6 Robustez

A robustez do procedimento em fluxo desenvolvido foi determinada obtendo-se as curvas analíticas em diferentes dias, com soluções de reagentes e

referências recentemente preparadas, na faixa de concentração de paracetamol entre $5,2 \times 10^{-5}$ a $5,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, faixa de concentração esta em que a regressão da curva pode ser descrita por uma equação linear¹⁰³. As equações que descrevem as curvas estão mostradas na Tabela 4.13. Como pode ser verificado, o desvio padrão relativo menor que 6% entre os coeficientes angulares das equações que descrevem as curvas analíticas indicam que o sistema em fluxo é robusto, isto é, não sensível a pequenas variações das concentrações de trabalho.

TABELA 4.13 Equações das curvas analíticas obtidas em diferentes dias

dia	equação	coeficiente de regressão
1	Abs = 0,011 + 188,6 x C	0,9995
2	Abs = 0,014 + 178,7 x C	0,9997
5	Abs = 0,015 + 165,1 x C	0,9998
6	Abs = 0,010 + 188,7 x C	0,9998
8	Abs = 0,020 + 191,1 x C	0,9998

n=5.

4.3.7 Aplicação

O procedimento de análise por injeção em fluxo contínuo reverso proposto para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando nitrito de sódio como reagente foi utilizado para a determinação desse princípio ativo nas formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos utilizando um procedimento comparativo descrito pela Farmacopéia Americana⁴⁶. Verificou-se que não há diferença entre os resultados utilizando-se os dois métodos a um nível de confiança de 95%, quando aplicado teste-*t* pareado. Os sinais transientes obtidos das soluções de referência e soluções de amostras no sistema em fluxo estão mostrados na Figura 4.21. A Tabela 4.14 apresenta os teores rotulados, teores obtidos empregando-se o procedimento da Farmacopéia Americana⁴⁶ e os teores encontrados empregando-se o método proposto nesta tese.

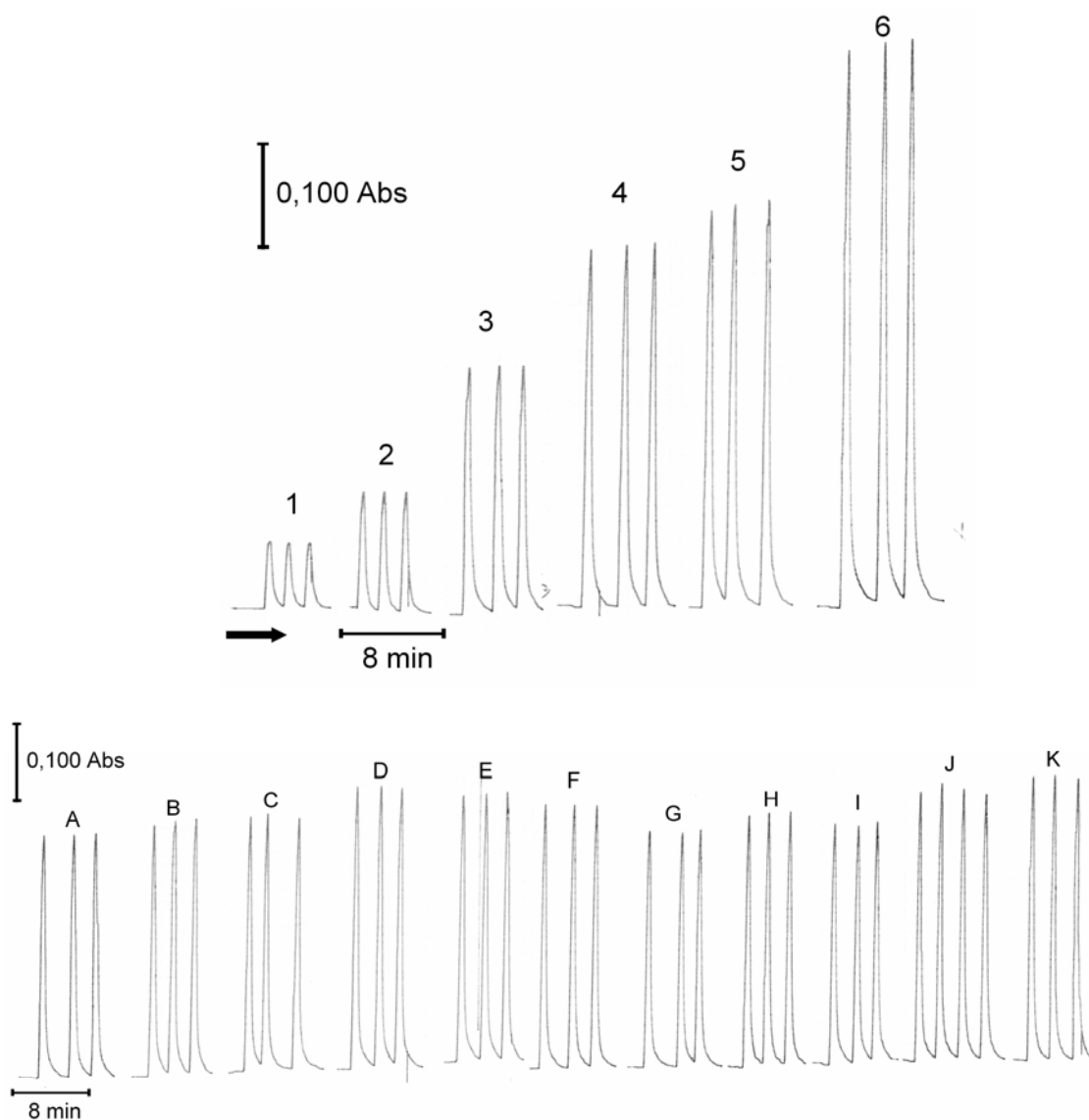


FIGURA 4.21 Sinais transientes obtidos na determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando o sistema de análise por injeção em fluxo reverso para as soluções de referência nas concentrações (1) $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; (2) $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; (3) $3,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; (4) $5,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; (5) $6,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e (6) $1,1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, seguidas dos sinais transientes para as soluções de amostras (A-K).

TABELA 4.14 Determinação de paracetamol usando o sistema de análise por injeção em fluxo reverso

Amostras	Paracetamol / mg/g			Erro relativo / %	
	Rotulado	Oficial	Proposto	Proposto vs.Oficial	Proposto vs. Rotulado
Paracetamol [®]	833	810 ± 4	802 ± 6	-1,01	-3,74
Cibalena [®]	300	297 ± 8	287 ± 6	-3,46	-4,42
Saridon [®]	380	360 ± 5	359 ± 5	-0,41	-5,65
Tylenol gotas(*) [®]	200	214 ± 5	211 ± 4	-1,40	5,50
Resfry [®]	405	400 ± 4	389 ± 5	-2,80	-4,00
Tylenol 500 [®]	804	849 ± 10	814 ± 7	-4,07	1,30
Paracetamol G 750 [®]	858	900 ± 9	850 ± 3	-5,54	-0,91
Tylenol 750 [®]	900	850 ± 8	831 ± 4	-2,27	-7,70
Tyramol 750 [®]	850	851 ± 10	848 ± 5	-0,32	-0,21
Tylenol DC [®]	728	750 ± 4	750 ± 2	0,00	3,02
Vick Pyrena [®]	100	105 ± 6	108 ± 4	3,01	8,16

(*) g mL⁻¹.

Comparando-se o consumo dos reagentes do sistema em fluxo proposto com outros procedimentos analíticos descritos na literatura, verifica-se sua viabilidade devido a minimização do consumo de nitrito de sódio e HCl por determinação, conforme mostrado na Tabela 4.15. Apenas os procedimentos empregando análise seqüencial utilizaram uma quantidade menor de HCl por determinação.

Na Tabela 4.16 são apresentadas algumas figuras de mérito dos procedimentos empregados na determinação de paracetamol empregando nitrito de sódio como reagente.

TABELA 4.15 Consumo de reagentes na determinação de paracetamol em diferentes procedimentos analíticos em fluxo

mg / determinação	FIA ¹⁰²	SIA(I) ¹⁰²	SIA(II) ¹⁰²	FIA ¹⁰³	Proposto
NaNO ₂	9,65	0,52	0,76	0,55	0,29
HCl	5,10	0,82	0,74	144	1,92
NaOH	7,80	0,59	1,99	240	NE

NE: não empregado no sistema

O sistema em fluxo desenvolvido empregando a injeção de reagente (FIA reverso) apresentou parâmetros analíticos que permitem seu emprego na determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas. Apesar da faixa de concentração da curva analítica do método proposto ser menor que a faixa das curvas analíticas dos demais procedimentos em fluxo, sua simplicidade e robustez viabiliza sua implementação em laboratórios de análise de rotina.

TABELA 4.16 Parâmetros analíticos dos sistema em fluxo proposto e descritos na literatura

Parâmetros	FIA ¹⁰²	SIA(I) ¹⁰²	SIA(II) ¹⁰²	FIA ¹⁰³	Proposto
Linearidade/ 10 ⁻³ mol L ⁻¹	2,64 a 6,61 ou 6,61 a 16,5	2,64 a 6,61 ou 6,61 a 16,5	1,32 a 6,61 ou 6,61 a 16,5	1,20 a 1,98	0,04 a 1,1
Desvio padrão relativo / %	2	3	4	< 1,3	< 2,0
freqüência de amostragem / h ⁻¹	60	60	15	120	45
Limite de detecção/ 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	2,97	4,63	4,3	ND	0,28

ND = não descrito

4.4 Sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de acetilcisteína empregando sistema Ce(IV)/ferroína

O procedimento proposto emprega a reação entre a acetilcisteína e o reagente Ce(IV). A acetilcisteína é oxidada, resultando em uma substância com grupamentos dissulfetos e Ce(III) (equação 1, Figura 4.22) que não apresenta absorção de radiação eletromagnética na faixa UV/Vis. Apesar da solução de íons Ce(IV) apresentar absorção de radiação em torno de 400 nm, uma alta concentração de reagente seria necessário para obter-se adequada sensibilidade no seu monitoramento. Para um aumento da sensibilidade do procedimento proposto, a ferroína foi empregada para a determinação da concentração de Ce(IV) em excesso

no sistema de análise por injeção em fluxo (equação 2, Figura 4.22). Dessa maneira, a diminuição da concentração de Ce(IV) pode ser monitorada espectrofotometricamente em 500 nm.

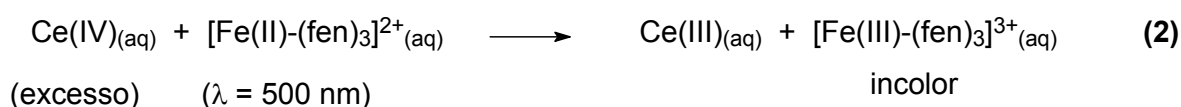
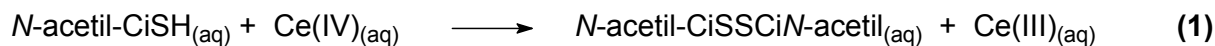


FIGURA 4.22 Esquema das reações químicas envolvidas no sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína empregando Ce(IV) e ferroína como reagentes.

4.4.1 Avaliação dos parâmetros químicos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas

Inicialmente foram otimizados os parâmetros químicos referentes ao sistema empregado. A configuração do sistema em fluxo empregado na otimização dos parâmetros químicos foi apresentado na Figura 3.5. Nesse sistema empregou-se uma alça de amostragem de 150 μL , bobinas reacionais de 100 cm, vazão da solução transportadora 2,6 mL min^{-1} , vazão da solução de Ce(IV) de 1,5 mL min^{-1} e vazão da solução de ferroína de 1,1 mL min^{-1} .

Primeiramente, estudou-se o efeito da concentração de H_2SO_4 na solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)$ entre $2,4 \times 10^{-2}$ a $1,5 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o sinal analítico de uma solução de referência de acetilcisteína $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se uma diminuição acentuada no sinal analítico com o aumento da concentração de H_2SO_4 acima de $4,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Dessa maneira, selecionou-se a solução H_2SO_4 $4,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para os demais experimentos.

A avaliação da concentração da solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, em solução de H_2SO_4 $4,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o sinal analítico de uma solução de referência de acetilcisteína $4,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi realizado para as concentrações de solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ de $6,5 \times 10^{-4}$, $1,3 \times 10^{-3}$, $3,3 \times 10^{-3}$ e $6,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser observado os dados obtidos e apresentados na Figura 4.23, houve um aumento

significativo do sinal analítico até a solução de concentração $3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se praticamente constante em concentrações superiores de Ce(IV). Ademais, com o aumento da concentração da solução de Ce(IV) houve uma diminuição acentuada do desvio padrão relativo, obtido para uma série de 3 replicatas. Selecionou-se assim, a solução de concentração $3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para os demais experimentos.

O efeito da concentração da solução de ferroína sobre o sinal analítico para uma solução de referência de acetilcisteína $4,5 \times 10^{-4}$ foi avaliado nas concentrações variando de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. De acordo com os resultados obtidos, apesar do aumento do sinal analítico com o aumento da concentração da solução de ferroína, a precisão entre os sinais analíticos obtidos em concentrações superiores foi menor que aquelas obtidas em concentrações menores. Ademais, o tempo de limpeza, isto é, de retorno à linha base foi maior para as concentrações superiores. Dessa maneira, selecionou-se a concentração de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ como ótima para os demais experimentos.

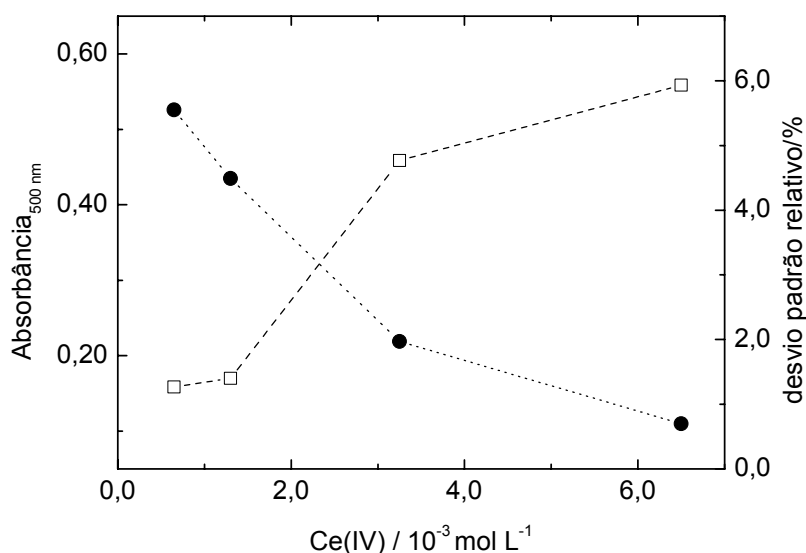


FIGURA 4.23 Efeito da concentração da solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, sobre o sinal analítico para H_2SO_4 $2,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e solução de referência de acetilcisteína $4,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=3$). Absorbância (---□---) e precisão (...●...).

4.4.2 Estudo dos parâmetros físicos do sistema em fluxo

Os parâmetros físicos do sistema de análise por injeção em fluxo foram avaliados utilizando o método univariado, empregando os parâmetros químicos selecionados como ótimo, sempre buscando uma melhor sensibilidade e frequência de amostragem, além da estabilidade da linha base.

Inicialmente avaliou-se o volume da alça de amostragem entre 100 a 500 μL no sinal analítico para uma solução de acetilcisteína $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se um aumento do sinal analítico com o aumento do volume de amostragem até o volume de 375 μL , permanecendo constante para volumes superiores. Dessa maneira, selecionou-se o volume de 375 μL para os demais experimentos.

O comprimento da bobina reacional B_1 , responsável pela reação de Ce(IV) e acetilcisteína foi estudado entre 65 a 150 cm com uma solução de referência de acetilcisteína $9,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser verificado na Figura 4.24, houve um aumento do sinal analítico com o aumento do comprimento da bobina reacional até o comprimento de 100 cm, tendo uma ligeira diminuição da magnitude do sinal analítico para comprimentos superiores. Selecionou-se o comprimento de 100 cm, considerando-se o melhor compromisso entre sensibilidade e frequência de amostragem, além do razoável desvio padrão relativo obtido.

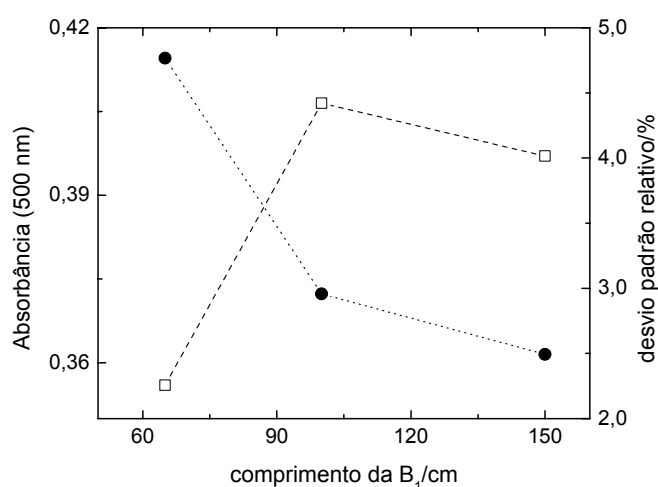


FIGURA 4.24 Efeito do comprimento da bobina reacional B_1 sobre o sinal analítico de uma solução de referência de acetilcisteína $9,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=3$). Absorvância (--□--) e precisão (...●...).

O efeito do comprimento da bobina reacional B₂, na qual ocorre a reação entre o Ce(IV) e ferroína sobre o sinal analítico, foi avaliado entre os comprimentos de 65 a 150 cm no sinal analítico para uma solução de acetilcisteína $9,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Não verificaram-se variações consideráveis do sinal analítico e da precisão no intervalo de comprimento das bobinas reacionais empregadas nesse estudo. Dessa maneira, o comprimento de 65 cm foi selecionado para os demais experimentos.

A vazão da solução de Ce(IV) $3,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, em solução de HCl $4,3 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, sobre o sinal analítico para uma solução de referência de acetilcisteína $5,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foi avaliada nas vazões de 0,9; 1,7 e 2,2 mL min⁻¹. A vazão que apresentou maior sinal analítico foi a de 0,9 mL min⁻¹, como pode ser verificado na Figura 4.25. O aumento da vazão da solução de Ce(IV) provocou a diminuição do sinal analítico, bem como a diminuição da precisão das medidas, devido à diminuição do tempo de residência da zona de amostra dispersa contendo acetilcisteína no percurso analítico. Dessa maneira, selecionou-se a vazão de 0,9 mL min⁻¹ para os demais experimentos.

Avaliou-se também a vazão da solução de ferroína $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ sobre o sinal analítico nas vazões de 0,7; 1,1 e 2,2 mL min⁻¹ empregando-se a mesma solução de referência de acetilcisteína supramencionada. Verificou-se um aumento significativo do sinal analítico até a vazão de 2,2 mL min⁻¹. O aumento da vazão do reagente gera uma instabilidade da linha base e uma diminuição da precisão das medidas obtidas. Assim, considerando-se a relação entre sinal analítico e precisão dos sinais analíticos, selecionou-se a vazão de 0,7 mL min⁻¹ para os demais experimentos.

O efeito da vazão da solução transportadora (H₂O) sobre o sinal analítico foi estudado entre 1,1 a 3,0 mL min⁻¹. Verificou-se um aumento do sinal analítico até a vazão de 1,5 mL min⁻¹, diminuindo para vazões superiores. Assim, selecionou-se a vazão de 1,5 mL min⁻¹ como ótima.

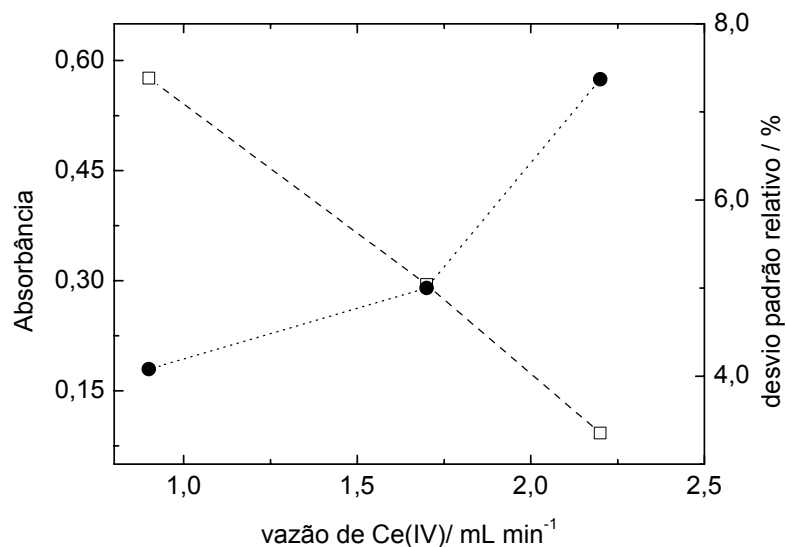


FIGURA 4.25 Efeito da vazão da solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ $3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na determinação de solução de referência acetilcisteína ($n=3$). Absorbância (---□---) e precisão (...●...).

A Tabela 4.17 apresenta os parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas.

TABELA 4.17 Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de acetilcisteína empregando Ce(IV)/ferroína como reagentes

Parâmetros	Faixa estudada*	Selecionado
$\text{H}_2\text{SO}_4 / 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	2,4 a 15	4,3
$\text{Ce}(\text{IV}) / 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	0,6 a 6,5	3,3
Ferroína / $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	0,1 a 1,0	0,25
alça de amostragem / μL	100 a 500	375
Comprimento de B_1 / cm	65 a 150	100
Comprimento de B_2 / cm	55 a 150	65
Solução de Ce(IV) / mL min^{-1}	0,5 a 2,2	0,9
Solução de ferroína / mL min^{-1}	0,5 a 2,2	0,7
Solução transportadora / mL min^{-1}	1,1 a 3,0	1,5

*método univariado.

4.4.3 Parâmetros analíticos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína

A curva analítica foi obtida por injeções sucessivas em triplicata de soluções de referência de acetilcisteína na faixa de concentração de $1,32 \times 10^{-5}$ a $1,35 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A curva analítica obtida apresentou uma equação $\Delta\text{Abs} = -0,058 + 5.666,03 \times [\text{NAC}]$, onde ΔAbs é a variação da absorvância promovida pela solução contendo o analito injetado e [NAC] é a concentração de acetilcisteína em mol L⁻¹ ($r=0,9997$). O limite de detecção obtido foi de $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica). O desvio padrão relativo para uma solução de referência de acetilcisteína $2,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foi de 1,4 % ($n=10$).

4.4.4 Estudo de interferência

Dando continuidade aos trabalhos desenvolvidos, avaliou-se o potencial de interferência de substâncias presentes nas formulações farmacêuticas. O estudo foi realizado adicionando-se concentrações de cada excipiente em uma solução de referência e o sinal analítico obtido foi comparado com o sinal analítico obtido de uma solução de referência sem adição da substância em estudo. Os resultados são mostrados na Tabela 4.18. A concentração tolerada da substância considerada foi aquela que causou um desvio-padrão não superior a $\pm 5\%$ da resposta obtida comparada com a solução que continha apenas a substância de referência. Das substâncias avaliadas, o citrato de sódio foi a que causou maior interferência, provavelmente devido à formação de complexo com os íons Ce(IV). Sendo assim, a análise de formulações farmacêuticas que continham essa substância em altas concentrações, como xaropes e envelopes efervescentes não puderam ser analisadas.

TABELA 4.18 Influência das substâncias excipientes na determinação de acetilcisteína

Interferente	Concentração tolerada / mol L ⁻¹
EDTA	4,1x10 ⁻⁴
Sacarose	4,8x10 ⁻³
Cloreto de Benzalcônio ^a	1,7x10 ⁻¹
Sacarina	5,3x10 ⁻⁴
Acessulfame – K	2,2x10 ⁻⁴
Polivilpirrolodona ^a	9,7x10 ⁻³
Carbonato de Sódio	4,3x10 ⁻³
Benzoato de Sódio	7,4x10 ⁻⁴
Citrato de sódio	1,4x10 ⁻⁶

Concentração da solução de referência de acetilcisteína 3,8x10⁻⁵ mol L⁻¹;^a % m/v.

4.4.5 Estudo da recuperação de acetilcisteína em produtos farmacêuticos

No estudo da recuperação, três alíquotas diferentes de uma solução de referência de acetilcisteína foram adicionadas em quatro amostras comerciais contendo uma concentração final de 1,2x10⁻⁵ mol L⁻¹ e os resultados comparados com aqueles obtidos com as soluções da amostra, sem adição da solução de referência de acetilcisteína. Os resultados mostrados na Tabela 4.19 indicam a ausência de interferência da matriz das amostras. Sendo assim, as amostras estudadas podem ser analisadas com a injeção direta da solução de amostra no sistema de análise por injeção em fluxo.

TABELA 4.19 Estudo da recuperação de acetilcisteína em produtos farmacêuticos

Amostras	Acetilcisteína / 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
Acetilcisteína	1,45	1,52	104
(granulado)	2,18	2,29	105
	2,91	3,09	106
Fluicis [®]	1,46	1,50	103
(granulado)	2,18	2,24	103
	2,91	3,08	106
Fluimucil [®]	1,46	1,43	98
(granulado)	2,18	2,24	100
	2,91	3,08	104

n=3.

4.4.6 Robustez

A robustez do sistema de análise por injeção em fluxo desenvolvido neste trabalho foi avaliada verificando-se as equações das curvas analíticas obtidas em diferentes dias, sempre com soluções de reagentes/referência e o módulo de análise recém preparadas e montados. Obteve-se um desvio padrão relativo de 13,2% entre os coeficientes angulares das equações que descrevem a curva analítica (

TABELA 4.20), indicando que o sistema otimizado apresenta robustez adequada para implementação em laboratórios de análise de rotina.

TABELA 4.20 Equações das curvas analíticas obtidas em diferentes dias de trabalhos

Dias	equação	Coefficiente de regressão
1	Abs = -0,059 + 5.784,0 x [NAC]	0,999
3	Abs = -0012 + 5.464,8 x [NAC]	0,999
5	Abs = -0,012 + 4.984,4 x [NAC]	0,999
7	Abs = -0,029 + 4.435,3 x [NAC]	0,999
9	Abs = -0,018 + 4.238,9 x [NAC]	0,998

[NAC] concentração de acetilcisteína em mol L⁻¹.

4.4.7 Aplicação

Em seguida, realizou-se a análise de amostras comerciais contendo acetilcisteína. As amostras apresentavam-se na forma de pó cristalino comercializado em envelopes contendo de 20 mg e 40 mg de acetilcisteína por grama do produto.

O diagrama esquemático do sistema em fluxo empregado na determinação de acetilcisteína é mostrado na Figura 3.5.

O procedimento de análise por injeção em fluxo proposto para determinação de acetilcisteína foi utilizado para quantificar esse analito em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos empregando o sistema de análise em fluxo otimizado e o resultado empregando o procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira¹²⁶ estão mostrados na Tabela 4.21. Aplicando-se o teste-t pareado, verifica-se que as concentrações do analito obtidas pelos dois métodos não são estatisticamente diferentes entre si a um nível de 95% de confiança, indicando a precisão do sistema de análise por injeção em fluxo proposto.

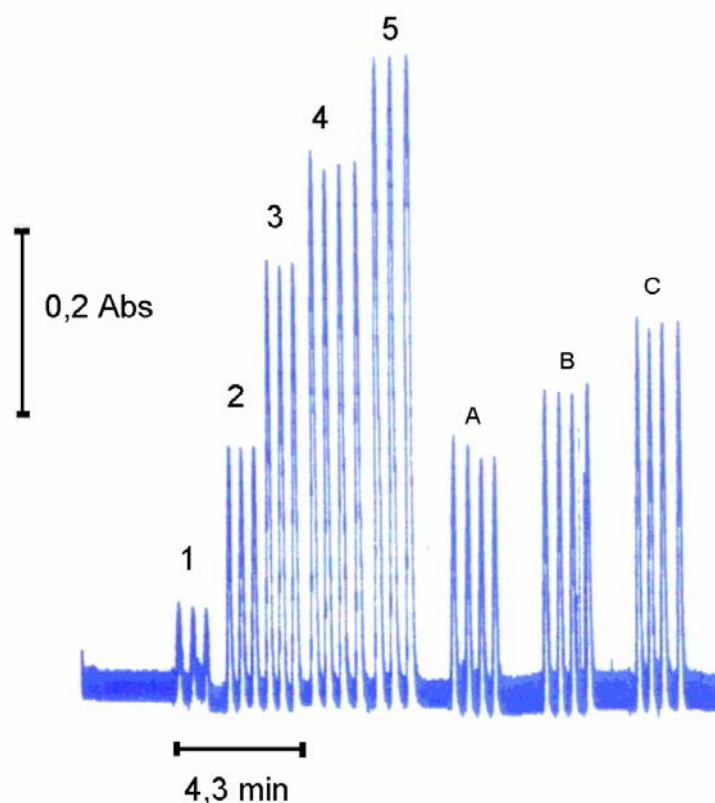


FIGURA 4.26 Sinais transientes obtidos para soluções de referência de acetilcisteína (1) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (2) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (3) $8,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (4) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (5) $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, seguidos dos sinais transientes em quadruplicadas das soluções de amostras (A-C).

TABELA 4.21 Determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas empregando o sistema em fluxo proposto e o método comparativo da Farmacopéia Brasileira¹²⁶

Amostras	Acetilcisteína mg/g			Erro relativo/%	
	Rotulado	Oficial	Proposto	E ₁	E ₂
Acetilcisteína [®]	20	20 ± 1	19,7 ± 0,8	-1,5	-1,5
Fluicis [®]	20	19,2 ± 0,9	20,4 ± 0,9	6,2	2,0
Fluimucil [®] (granulado)	40	41 ± 2	40,9 ± 0,5	-0,2	2,2

E₁: erro relativo entre método proposto vs. Oficial ; E₂ = erro relativo entre procedimento proposto vs. rotulado;

n=3; nível de confiança 95%.

4.5 Sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação espectrofotométrica indireta de acetilcisteína utilizando a geração química de bromo¹²⁷

O sistema em fluxo proposto baseou-se na habilidade de oxidação da acetilcisteína pelo bromo (Br₂) gerado quimicamente em linha como mostrado na equação 1 da Figura 4.27. A acetilcisteína é oxidada pelo bromo (Br₂) produzido em fluxo formando o dissulfeto de acetilcisteína (equação 2, Figura 4.27). Dessa maneira, desenvolveu-se um sistema em fluxo empregando a reação entre acetilcisteína e bromo, como reagente, onde o excesso de bromo foi monitorado espectrofotometricamente em 400 nm. A configuração física desse sistema proposto permitiu o uso de bromo em sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica e a destruição em linha com uma solução de ácido ascórbico 0,05% m/v do excesso de bromo gerado (equação 3, Figura 4.27). Este tratamento em linha foi necessário devido à alta toxicidade do bromo ao analista, uma vez que seus vapores irritam o sistema respiratório e olhos¹³⁶.

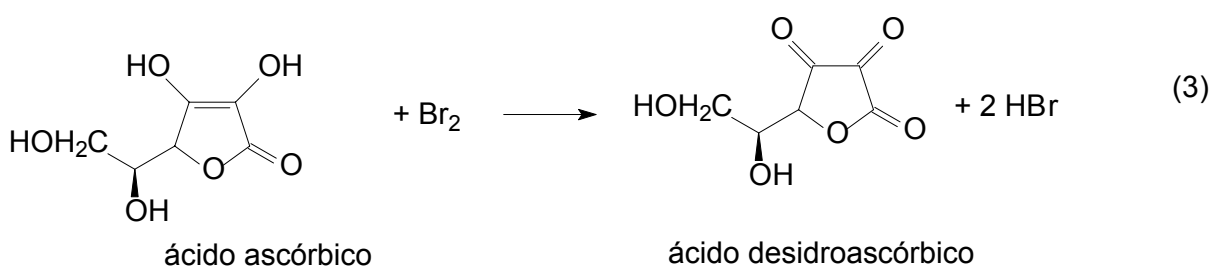
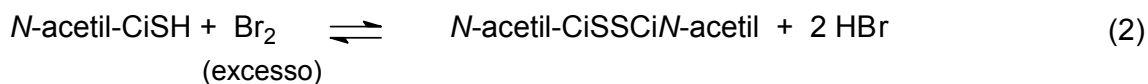
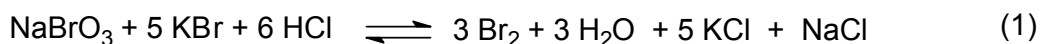


FIGURA 4.27 Reações químicas envolvidas na determinação de acetilcisteína empregando sistema de análise por injeção em fluxo utilizando a geração química de bromo (Br₂) como reagente.

4.5.1 Avaliação dos parâmetros químicos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas

A otimização dos parâmetros físicos do sistema de análise por injeção em fluxo foi realizada empregando o método univariado. Na otimização da geração de bromo, selecionaram-se as condições adequadas à geração de bromo.

O diagrama esquemático do sistema em fluxo empregado para otimização foi mostrado na Figura 3.6. Em todos os experimentos, vazões fixas em $1,7 \text{ ml min}^{-1}$ foram empregadas para propulsão de reagentes (C_1 , C_2 e C_3) e $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ para a solução transportadora (C).

A influência da concentração de HCl (C_2), entre a faixa de concentração de $9,7 \times 10^{-2}$ a $3,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, sobre a geração de bromo foi avaliada empregando solução de KBr $2,3 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ (C_1), solução de NaBrO_3 $1,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (C_3) e água como transportador (C). Neste estudo verificou-se o aumento do sinal da linha base com aumento da concentração de HCl até a concentração de $2,4 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se constante para a concentração superior, como mostrado na Figura 4.28. Sendo assim, selecionou-se esta concentração para os seguintes experimentos.

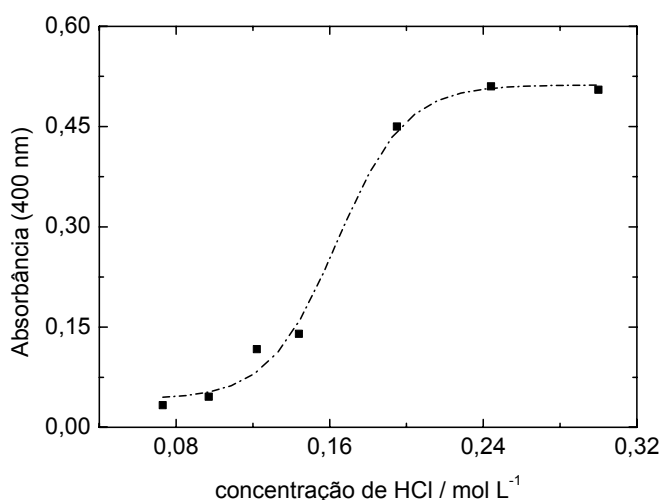


FIGURA 4.28 Estudo da concentração de HCl na produção de bromo (Br_2). A absorbância refere-se à magnitude da linha base.

Em seguida, foi também avaliado o efeito da concentração de brometo de potássio (C₁) entre 4×10^{-2} a $3,5 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ sobre a magnitude da linha base empregando uma solução de NaBrO₃ $1,9 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em C₃ e solução de HCl $2,4 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ em C₂. Os resultados obtidos indicam que a concentração do bromo gerado aumentou com aumento da concentração de brometo até a concentração de $3,5 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹. Uma solução de brometo $2,2 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ foi selecionada devido a melhor precisão obtida nesta concentração.

O efeito da concentração da solução de bromato (C₃) sobre o sinal analítico foi determinado empregando uma solução de brometo $2,2 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ em C₁ e solução de HCl $2,4 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ C₂. A absorvância aumentou com o aumento da concentração de bromato até a concentração de $1,9 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e, acima desta concentração permaneceu constante. Entretanto, uma concentração de $1,25 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ foi empregada, considerando-se um menor consumo de reagente.

4.5.2 Estudo dos parâmetros físicos do sistema FIA

Na otimização dos parâmetros físicos do sistema em fluxo empregou-se o método univariado, sempre buscando o melhor compromisso entre o sinal analítico (ΔA), precisão entre os sinais analíticos e frequência de amostragem.

A acetilcisteína quando injetada na solução transportadora (C), resulta em uma diminuição do sinal de absorvância devido ao consumo do bromo monitorado espectrofotometricamente em 400 nm, como mostrado nas reações 1 e 2 apresentadas na Figura 4.27

O efeito do comprimento do reator B₁ sobre a geração de bromo foi avaliado de 45 a 160 cm, monitorando-se o sinal da linha base. Avaliando-se os dados obtidos e apresentados na Figura 4.29, pode-se observar um aumento da absorvância até o comprimento de 140 cm, permanecendo essa constante em comprimentos maiores. Então, o comprimento de 140 cm foi selecionado como ótimo.

O efeito do comprimento do reator B₂ foi também investigado de 50 a 120 cm sobre a geração de bromo (Figura 4.29). A variação do comprimento desse reator não promoveu um aumento na concentração de bromo produzido. Dessa

maneira, selecionou-se o comprimento de 60 cm devido a melhor homogeneização obtida. O efeito do comprimento do reator B_3 sobre a destruição do bromo foi também avaliado entre os comprimentos de 50 a 120 cm. O comprimento de 60 cm foi capaz de consumir completamente o bromo. Selecionou-se assim o comprimento de 60 cm.

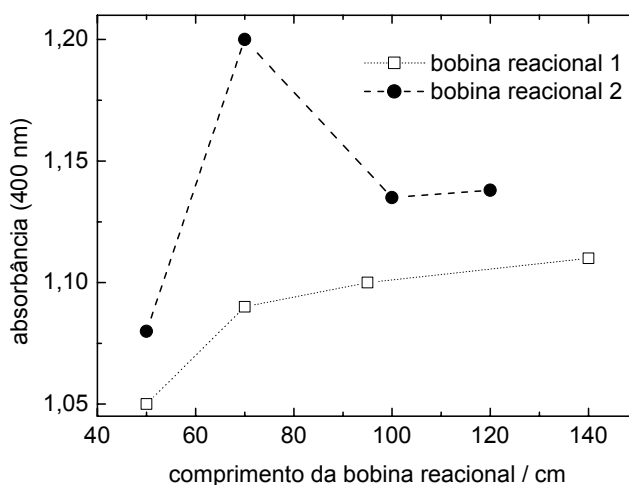


FIGURA 4.29 Estudo do efeito do comprimento das bobinas reacionais (B_1) e (B_2) na geração de bromo.

O efeito do volume de amostra sobre o sinal analítico de uma solução de referência de acetilcisteína $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi avaliado entre 125 a 375 μL . O aumento do volume de amostra resulta em um maior sinal analítico. Considerando-se a melhor razão entre a magnitude do sinal analítico e frequência de amostragem, selecionou-se o volume de 250 μL como o volume ideal.

Neste sistema proposto, as soluções de reagentes e a solução transportadora foram mantidas na mesma vazão pela bomba peristáltica. Avaliou-se a vazão de cada canal no intervalo de vazões de 1,2 a 2,5 mL min^{-1} . O melhor sinal analítico foi obtido empregando a vazão de 1,5 mL min^{-1} em cada canal. Sendo assim, selecionou-se essa vazão para o sistema em fluxo que foi empregado na determinação de acetilcisteína.

Para a destruição do bromo (Br_2) gerado quimicamente no sistema em fluxo foram avaliadas duas substâncias capazes de consumir o bromo: ácido fórmico e ácido ascórbico. Avaliou-se o efeito da concentração dessas substâncias no consumo do bromo, monitorando-se o sinal de absorvância da linha base em

comprimento de onda igual a 400 nm. Investigaram-se as concentrações da solução de ácido fórmico e ácido ascórbico de 2,0; 5,0 e 10% (m/v). A solução de ácido ascórbico 2,0% promoveu uma degradação de apenas 12% na concentração de bromo. Nas concentrações de 5,0% e 10% (m/v), o consumo de bromo foi total para ambas as substâncias testadas. A solução de mesma concentração de ácido fórmico 5% m/v promoveu a destruição total do bromo. Para maior segurança ao analista, a concentração do ácido ascórbico selecionada para a destruição de bromo no fluxo de descarte foi a concentração de 5% (m/v) à toxicidade do ácido fórmico¹³⁶.

A Tabela 4.22 a seguir, sintetiza os parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo proposto para a determinação de acetilcisteína empregando a geração química do reagente bromo (Br₂).

TABELA 4.22 Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de acetilcisteína empregando a geração de bromo

Parâmetros	Faixa estudada	Selecionado
HCl / 10 ⁻² mol L ⁻¹	9,7 a 30	24
KBr / 10 ⁻² mol L ⁻¹	4 a 35	22
NaBrO ₃ / 10 ⁻² mol L ⁻¹	0,8 a 1,9	1,25
Volume da alça de amostragem /µL	125 a 375	250
Comprimento de B ₁ / cm	45 a 160	140
Comprimento de B ₂ / cm	50 a 120	60
Vazão	1,2 a 2,5	1,5
Ácido ascórbico / %(m/v)	2,0 a 10	5,0

4.5.3 Parâmetros analíticos do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína empregando bromo como reagente

O sistema de análise por injeção em fluxo proposto apresentou uma curva analítica com uma variação na concentração de acetilcisteína entre 1,6x10⁻⁴ a 1,6 x10⁻³ mol L⁻¹ descrita pela equação $\Delta A = 0,002 + 289,5 C$; r=0,9973, onde ΔA é a variação da absorvância e C é a concentração de acetilcisteína em mol L⁻¹. O desvio

padrão relativo para uma solução de referência de acetilcisteína $5,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi de 1,2% (n=10). A frequência de amostragem foi de 60 determinações por hora.

4.5.4 Estudo de interferência

A interferência de substâncias no sistema proposto foi avaliada pelo estudo do efeito dos principais excipientes presentes nas formulações farmacêuticas, como EDTA, NaCl, citrato de sódio e sacarose. Nesse estudo, adicionou-se uma alíquota do excipiente em uma solução de referência de acetilcisteína 5×10^{-4} mol L⁻¹ e o resultado obtido foi comparado com o sinal analítico de uma solução de referência de acetilcisteína de mesma concentração. A concentração tolerada do excipiente foi aquela que causou um erro relativo menor que 5%.

TABELA 4.23 Estudo da seletividade na determinação de acetilcisteína

Excipiente	Concentração tolerada / mol L ⁻¹	Er / %
EDTA	$7,1 \times 10^{-3}$	-4,7
Citrato de sódio	$5,0 \times 10^{-3}$	-3,7
Sacarose	$8,2 \times 10^{-3}$	4,0
NaCl	$5,0 \times 10^{-3}$	4,0

Concentração de acetilcisteína: $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

4.5.5 Estudo da recuperação de acetilcisteína em formulações comerciais

No estudo da recuperação, três alíquotas diferentes de uma solução de referência de acetilcisteína foram adicionadas em três formulações farmacêuticas encontradas comercialmente, duas comercializadas na forma granulada e uma na forma de líquida, contendo uma concentração de acetilcisteína 2×10^{-4} mol L⁻¹ e os resultados comparados com aqueles obtidos com as soluções de amostra, sem adição da solução de referência de acetilcisteína. As recuperações obtidas variando de 79,8 a 106%, apresentadas na Tabela 4.24, mostram um pequeno efeito de

matriz da amostra avaliada no sistema de análise de injeção em fluxo. Então, o procedimento de adição múltipla de padrão foi empregado para a determinação de acetilcisteína na amostra Fluimucil[®] (Solução Nasal).

TABELA 4.24 Estudo da recuperação de acetilcisteína

Amostras	Acetilcisteína/ 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹		Recuperação / %
	Adicionado	Encontrado	
Acetilcisteína [®] (granulado)	2,48	2,62	106
	3,72	3,72	100
	4,96	4,79	96,7
Fluimucil [®] (granulado)	2,48	2,41	97,3
	3,72	3,67	98,8
	4,96	4,96	100
Fluimucil [®] (solução nasal)	2,48	2,08	83,9
	3,72	2,97	79,8
	4,96	4,53	91,3

n=3.

4.5.6 Robustez

A robustez do sistema em fluxo proposto foi avaliada verificando-se as curvas analíticas obtidas em diferentes dias, sempre com soluções de reagentes recém preparadas. As equações que descrevem as diferentes curvas analíticas são mostradas na Tabela 4.25. Como pode ser observado, um desvio padrão relativo menor que 8% no coeficiente angular das equações que descrevem as curvas analíticas indicam que o sistema em fluxo proposto é um procedimento robusto.

TABELA 4.25 Equações das curvas analíticas obtidas em diferentes dias

Dia	equação	Coefficiente de correlação (r)
1	$\Delta\text{Abs} = 0,009 + 313,28 \times [\text{NAC}]$	0,998
2	$\Delta\text{Abs} = 0,014 + 271,2 \times [\text{NAC}]$	0,999
5	$\Delta\text{Abs} = 0,054 + 282,53 \times [\text{NAC}]$	0,999
7	$\Delta\text{Abs} = -0,005 + 313,28 \times [\text{NAC}]$	0,998
9	$\Delta\text{Abs} = 0,009 + 266,88 \times [\text{NAC}]$	0,999

ΔAbs : variação de absorvância causada pela solução de referência de acetilcisteína;

[NAC]: concentração das soluções de referência de acetilcisteína.

4.5.7 Aplicações

O procedimento em fluxo proposto, mostrado na Figura 3.6, foi aplicado na determinação de acetilcisteína em formulações comerciais disponíveis. A Figura 4.30 mostra os sinais transientes obtidos com o sistema em fluxo proposto para a determinação de acetilcisteína.

A acetilcisteína foi determinada em produtos farmacêuticos usando o procedimento proposto e também um procedimento comparativo da Farmacopéia Brasileira¹²⁶ e os resultados são apresentados na Tabela 4.26. Os resultados obtidos empregando-se o sistema em fluxo proposto estão em boa concordância com aqueles resultados obtidos empregando-se o procedimento comparativo a um nível de confiança de 95% (teste-*t* pareado).

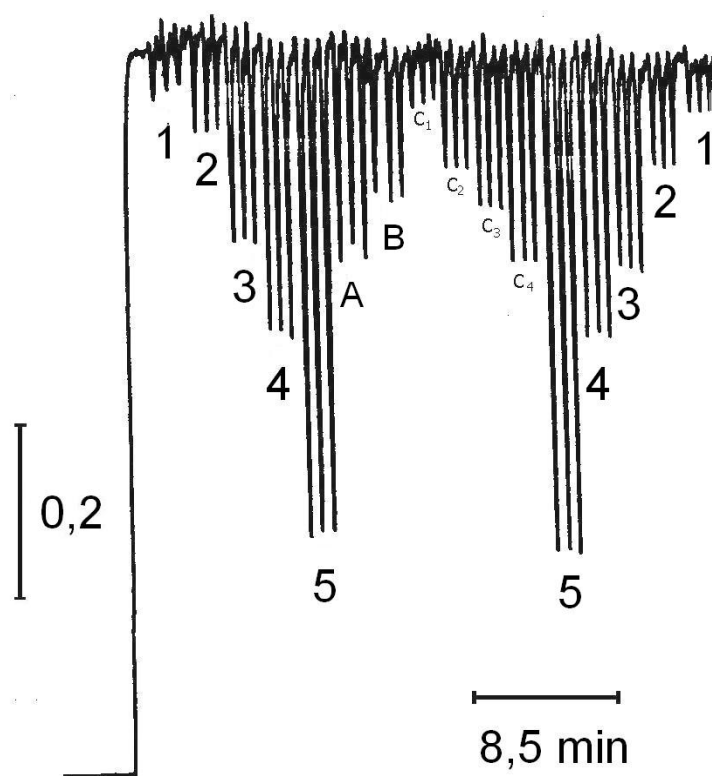


FIGURA 4.30 Sinais transientes obtidos em triplicata para a determinação de acetilcisteína: (1) $1,6 \times 10^{-4}$, (2) $3,3 \times 10^{-4}$, (3) $6,6 \times 10^{-4}$, (4) $9,8 \times 10^{-4}$ e (5) $1,6 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, seguidos de três amostras A, B e C e novamente as soluções de referência em concentração decrescente. Na determinação da amostra C empregou-se o método de adição múltipla de padrão (C_s: solução de amostra; C₁: $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; C₂: $3,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; C₃: $5,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹).

TABELA 4.26 Determinação de acetilcisteína em produtos farmacêuticos empregando o procedimento em fluxo proposto e o procedimento da Farmacopéia Brasileira¹²⁶

Amostras	Acetilcisteína (mg g ⁻¹)			Erro Relativo (%)	
	Rotulado	Método Oficial	Método proposto	E ₁	E ₂
Acetilcisteína [®] (granulado)	37,2	41,0±0,5	36,5±0,6	-1,9	-10,9
Flumicil [®] (granulado)	39,3	39,9±0,3	44,2±0,3	12,4	10,7
Flumicil [®] (solução nasal) ^a	11,5	11,3±0,4	11,4±0,4	-0,9	0,9

n=3, nível de confiança 95%; E₁ = FIA vs. rotulado; E₂ = FIA vs. Método comparativo.

^a mg mL⁻¹.

5 Conclusões

Algumas conclusões já foram apresentadas nos resultados e discussão desta tese. Algumas conclusões adicionais referentes aos cinco procedimentos em fluxo desenvolvidos para a determinação dos princípios ativos em formulações farmacêuticas serão a seguir descritas.

O sistema em fluxo para a determinação de furosemida permitiu sua determinação em formulações farmacêuticas. No procedimento desenvolvido empregou-se uma lâmpada ultravioleta com comprimento de onda de 380 nm e solução de peróxido de hidrogênio para a destruição do resíduo gerado em linha pelos radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$) gerados. O procedimento desenvolvido é simples, robusto e emprega reagentes de baixo custo.

Paralelamente, o procedimento em fluxo para a determinação de paracetamol empregando hipoclorito de sódio e *o*-tolidina, permitiu a determinação de paracetamol sem a necessidade de tratamento da amostra para eliminação da interferência de ácido acetilsalicílico¹³⁴. O sistema desenvolvido é simples, robusto e seguro para o analista.

O sistema em fluxo reverso (FIA-r) empregando nitrito de sódio como reagente permitiu a determinação de paracetamol com um consumo de reagentes menor que os outros procedimentos descritos na literatura que empregam o mesmo reagente^{46,102-104,137}.

O procedimento em fluxo para a determinação de acetilcisteína foi desenvolvido e baseou-se no monitoramento espectrofotométrico do Ce(IV) com solução de ferroína. Dessa maneira, substituiu-se o reagente Arsenazo de alta toxicidade¹³⁸, reagente cromogênico à base de arsênio empregado para a determinação de Ce(III).

O sistema em fluxo alternativo para a determinação de acetilcisteína que empregou bromo (Br_2) é um sistema simples, barato e seguro ao analista, devido à menor concentração de bromo gerado em linha que os procedimentos em batelada. A destruição do bromo gerado com solução de ácido ascórbico também foi um fator para segurança do analista e meio ambiente. Ademais, esse procedimento não apresentou interferência na determinação do analito em amostras comerciais que continham citrato de sódio.

6 Sugestões de Trabalhos Futuros

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, surgiram algumas idéias de novos sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação produtos farmacêuticos que poderão ser implementados no futuro.

Diversos analitos com amino grupos poderiam ser determinados utilizando hipoclorito de sódio e *o*-tolidina como reagentes. Desta maneira, um sistema polivalente poderia ser desenvolvido para a determinação seqüencial de dois ou mais fármacos, como furosemida, paracetamol, salicilamida, hidroclorotriazida entre outros.

Uma solução de Ce(IV) poderia ser empregada em fluxo para a oxidação e determinação de diversos fármacos contendo grupos tióis, como o captopril.

O paracetamol poderia ser determinado em fluxo empregando-se solução de nitrito de sódio em meio ácido, seguido de luminol em meio básico com detecção por quimiluminescência.

Outros sistemas em fluxo poderiam ser desenvolvidos para catecolaminas empregando-se oxidantes como o Br₂(aq), Ce(IV), IO₄⁻ entre outros e detecção das *o*-quinonas formadas em 410 nm.

7 Referências Bibliográficas

1. GÖRÖG, S., *Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis*. 1995, Boca Raton: CRC Press.
2. NEMCOVÁ, I.; CERMAKOVA, L. & GASPARIC, J., *Spectrophotometric Reactions*. Practical Spectroscopy, ed. EDWARD G. BRAME, J. Vol. 22. 1996, Wilmington: Marcel Dekker, Inc.
3. SCHMIDT, W., *Optical Spectroscopy in Chemistry and Life Sciences*. 2005: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
4. SAWYER, R., *Experimental Spectroscopy*. 2 ed. 1954, New York: Prentice-Hall.
5. EWING, G.W., *Métodos Instrumentais de Análise Química*. 1972. 64-68.
6. BECKMAN, A.O.; GALLAWAY, W.S.; KAYE, W. & ULRICH, W.F., "History Of Spectrophotometry at Beckman Instruments, Inc." *Anal. Chem.* **49**(3): 280A-296A, 1977.
7. WILLARD, H.H.; MERRITT JR, L.L. & DEAN, J.A., *Instrumental Methods of Analysis*. 4 ed. 1970, New York: Van Nostrand Reinhold Compoany.
8. MEITES, L., *Handbook of Analytical Chemistry*. 1963, New York: McGraw-Hill Book Company.
9. BURNS, D.T., *Aspects of the development of colorimetric analysis and quantitative molecular spectroscopy in the ultra-violet-visible region*. Advances in Standards and Methodology in Spectrophotometry, ed. BURGESS, C. & MIELENZ, K.D. Vol. 2. 1987, Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
10. MARTÍNEZ-CALATAYUD, J., *Flow Inejction Analysis of Pharmaceuticals - Automation in Laboratory*. 1 ed. 1996: Taylor & Francis Inc.
11. VALCARCEL, M. & LUQUE DE CASTRO, M.D., *Flow-injection analysis: principles and applications*. Ellis Horwood series in analytical chemsistry. 1987, New York: John Willey & Sons.
12. SHRINER, R.L.; FRISON, R.C.; CURTIN, D.Y. & MORRIL, T.C., *The systematic identification of organic compounds*. 1992, New York: John Willey & Sons.
13. RUZICKA, J. & HANSEN, E.H., *Flow injection Analysis*. Chemical Analysis. Vol. 62. 1988, New York: John Wiley & Sons.
14. ROCHA, F.R.P.; NÓBREGA, J.A. & FATIBELLO-FILHO, O., "Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. An overview". *Green Chem.* **3**: 216-220, 2001.
15. REIS, B.F.; GINÉ, M.F. & KRONKA, E.A.M., "Análise química por injeção em fluxo contínuo". *Quim. Nova.* **12**(1): 82-91, 1989.
16. DEN BOEF, G., "Unstable Reagents in Flow Analysis". *Anal. Chim. Acta.* **216**: 289-297, 1989.
17. RUZICKA, J. & HANSEN, E.H., "Flow-Injection analysis and its early history". *Talanta.* **29**: 157, 1982.
18. WANG, R.Y.; JARRAT, J.A.; KEAY, P.J.; HAWKES, J.J. & COAKLEY, W.T., *Talanta.* **52**: 129, 2000.
19. ALBERTUS, F.; HORSTKOTTE, B.; CLADERA, A. & CERDA, V., "A robust multisyringe system for process flow analysis Part I. On-line dilution and single point titration of Protolytes". *Analyst.* **124**: 1373-1381, 1999.
20. ROCHA, F.R.P.; RODENAS-TORRALBA, E.; REIS, B.F.; MORALES-RUBIO, A. & DE LA GUARDIA, M., "A portable and low cost equipament for flow injection chemiluminescence measurements". *Talanta.* **67**: 673-677, 2005.
21. MATOS, R.C.; GUTZ, R.C.; ANGNES, L.; FONTENELE, R.S. & PEDROTTI, J.J., "Propulsor pneumático versátil e isento de pulsação para sistemas de análise em fluxo". *Quim. Nova.* **24**(6): 795-798, 2001.
22. BERGAMIN, F.H.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. & JACINTHO, A.O., "Ion exchange in flow injection analysis: Determination of ammonium ions at the µg

- I⁻¹ level in natural waters with pulsed nessler reagent". *Anal. Chim. Acta.* **117**: 81-89, 1980.
23. KRUG, F.J.; F.H., B. & ZAGATTO, E.A.G., "Commutation in flow injection analysis ". *Anal. Chim. Acta.* **179**: 103-118, 1986.
24. DE FARIA, L.C. & PASQUINI, C., "Um módulo automático de introdução de amostra para sistemas de análise por injeção em fluxo". *Quim. Nova.* **14**(3): 216-218, 1991.
25. QUARESMA, M.C.B.; CASSELLA, R.J.; DE LA GUARDIA, M. & SANTELLI, R.E., "Rapid on-line sample dissolution assisted by focused microwave radiation for silicate analysis employing flame atomic absorption spectrometry: iron determination". *Talanta.* **62**(4): 807-811, 2004.
26. CRIADO, A.; CARDENAS, S.; GALLEGO, M. & VALCARCEL, M., "Continuous flow spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals following continuous microwave assisted alkaline hydrolysis". *Talanta.* **53**(2): 417-423, 2000.
27. OLIVEIRA, A.F.; FATIBELLO, O. & NOBREGA, J.A., "Focused-microwave-assisted reaction in flow injection spectrophotometry: a new liquid-vapor separation chamber for determination of reducing sugars in wine". *Talanta.* **55**(4): 677-684, 2001.
28. CASSELLA, R.J.; SANTELLI, R.E.; BRANCO, A.G.; LEMOS, V.A.; FERREIRA, S.L.C. & CARVALHO, M.S., "Selectivity enhancement in spectrophotometry: on-line interference suppression using polyurethane foam minicolumn for aluminum determination with methyl thymol ." *Analyst.* **124**: 805-808, 1999.
29. DE LA GUARDIA, M.; KHALAF, K.D.; HASAN, B.A.; MORALES-RUBIO, A. & CARBONELL, V., "In-line, Titanium Dioxide-catalyzed, Ultraviolet Mineralization of Toxic Aromatic Compounds in Waste Stream from a Flow Injection-based Resorcinol Analyser". *Analyst.* **120**: 231-234, 1995.
30. DE LA GUARDIA, M.; KHALAF, K.D.; CARBONELL, V. & MORALES-RUBIO, A., "Clean analytical method for the determination of propoxur". *Anal. Chim. Acta.* **308**: 462-468, 1995.
31. MARTINEZ-CALATAYUD, J. & GOMEZ-BENITO, C., "Flow-injection spectrofluorimetric determination of paracetamol". *Anal. Chim. Acta.* **231**: 259-264, 1990.
32. WELZ, B. & SPERLING, M., "Flow injection: The ultimate approach to automation in analytical atomic spectroscopy". *Pure & Appl. Chem.* **65**(12): 2465-2472, 1993.
33. COUTO, C.M.C.M. & MONTENEGRO, M.C.B.S.M., "Detectores potenciométricos para sistemas de análise por injeção em fluxo, evolução e aplicação". *Quim. Nova.* **23**(6): 774-784, 2000.
34. ZHANG, X.R.; BAEYENS, W.R.G.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.M. & OUYANG, J., "Recent developments in chemiluminescence sensors". *Trac-Trend. Anal. Chem.* **18**(6): 384-391, 1999.
35. BORGES, E.P.; FERNANDES, E.N.; ROCHA, F.R.P. & REIS, B.F., "Desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo para medidas por quimiluminescência". *Quim Nova.* **25**(6B): 1191-1193, 2002.
36. DE JESUS, D.P.; SAITO, R.M. & LAGO, C.L., "Determination of boron in natural water and products derived from grape using an automated flow injection analysis system with piezoelectric detection". *J. Braz. Chem. Soc.* **15**(5): 714-718, 2004.

37. MAGNA, A.; OLIVEIRA, A.F & FATIBELLO, O., "Flow injection piezoelectric determination of brix in sugar cane juice and in the alcoholic fermentation process". *Anal. Lett.* **29**: 2411-2419, 1996.
38. MARTELLI, P.B.; REIS, B.F.; ARAUJO, A.N.; CONCEICAO, M. & MONTENEGRO, B.S.M., "A flow system with a conventional spectrophotometer for the chemiluminescent determination of lactic acid in yoghurt". *Talanta*. **54**(5): 879-885, 2001.
39. LEITE, O.D.; FATIBELLO-FILHO, O. & ROCHA, F.R.P., "Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência". *Quim Nova*. **27**(2): 337-341, 2004.
40. OLIVEIRA, P.C.C.; GOUVEIA, V.J.P. & MASINI, J.C., "Construção e aplicação de uma cela espectrofotométrica de camada delgada para análises em fluxo". *Qui. Nova*. **24**(3): 399-403, 2001.
41. VIDAL, A.D.; REYES, J.F.G.; BARRALES, P.O. & DIAZ, A.M., "UV spectrophotometric flow-through multiparameter sensor for the simultaneous determination of acetaminophen, acetylsalicylic acid, and caffeine". *Anal. Lett.* **35**(15): 2433-2447, 2002.
42. VIDAL, A.D.; BARRALES, P.O. & DIAZ, A.M., "Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in pharmaceuticals by means of a single flow-through UV multiparameter sensor". *Microchim Acta*. **141**(3-4): 157-163, 2003.
43. MOREIRA, A.B.; DIAS, I.L.T.; NETO, G.O.; ZAGATTO, E.A.G. & KUBOTA, L.T., "Solid-phase fluorescence spectroscopy for the determination of acetylsalicylic acid in powdered pharmaceutical samples". *Anal. Chim. Acta*. **523**(1): 49-52, 2004.
44. EPA. www.epa.gov. visitada em 28 de agosto de 2005.
45. EATON, A.D.; CLESCERI, L.S. & GREENBERG, A.E., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19 ed. 1995, Whashington: American Public Health Association.
46. USP, *United states pharmacopeial XXII*. 1990, Rockville, MD: U.S Pharmacopeial Convention.
47. JOHNSON, K.S. & PETTY, R.L., "Determination of phosphate in seawater by flow injection analysis with injection of reagent". *Anal. Chem.* **54**: 1185-1187, 1982.
48. TRYBA, B.; MORAWSKI, A.W.; INAGAKI, M. & TOYODA, M., "The kinetics of phenol decomposition under UV irradiation with and without H₂O₂ on TiO₂, Fe-TiO₂ and Fe-C-TiO₂ photocatalysts". *Appl. Catal. B-Environ.* **65**: 86-92, 2006.
49. SCHRANK, S.G.; JOSE, H.J.; MOREIRA, R.F.P.M. & SCHRÖDER, H.F., "Applicability of Fenton and H₂O₂/UV reactions in the treatment of tannery wastewaters". *Chemosphere*. **60**: 644-655, 2005.
50. FRIEDMAN, C.L.; LEMLEY, A.T. & HAY, A., "Degradation of Chloroacetanilide Herbicides by Anodic Fenton Treatment". *J. Agr. Food Chem.* **54**: 2640-2651, 2006.
51. BIANCO-PREVOT, A.; FABBRI, D.; PRAMAURO, E.; MORALES-RUBIO, A. & DE LA GUARDIA, M., "Continuous monitoring of photocatalytic treatments by flow injection. Degradations of dicamba in aqueous TiO₂ dispersions". *Chemosphere*. **44**: 249-255, 2001.
52. CHACÓN, J.M.; LEAL, M.T.; SÁNCHEZ, M. & BANDALA, E.R., "Solar photocatalytic degradation of azo-dyes by photo-Fenton process". *Dyes Pigments*. **69**: 144-150, 2006.

53. KATSUMATA, H.; KANECO, S.; SUZUKI, T.; OHTA, K. & YOBIKO, Y., "Photo-Fenton degradation of alachlor in the presence of citrate solution". *J. Photoch. Photobio. A*. **180**: 38-45, 2006.
54. POULOPOULOS, S.G.; ARVANITAKIS, F. & PHILIPPOPOULOS, C.J., "Photochemical treatment of phenol aqueous solutions using ultraviolet radiation and hydrogen peroxide". *J. Hazard. Mater. B*. **129**: 64-68, 2006.
55. TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P.; EMMEL, A. & LEAL, E.S., "Degradação de BTXS via processos oxidativos avançados". *Quim nova*. **28**(1): 61-64, 2005.
56. CONNORS, K.A.; AMIDON, G.L. & STELLA, V.J., *Chemical Stability of Pharmaceuticals*. 1986, New York: John Wiley & Sons.
57. DIAS, I.L.T.; NETO, G.D. & MARTINS, J.L.S., "Metodologias analíticas para a determinação da furosemida". *Lecta*. **22**(1/2): 19-26, 2004.
58. GHANEKAR, A.G.; GUPTA, V. & GIBBS, C.W., "Stability of furosemide in aqueous systems". *J Pharm Sci*. **67**(6): 808-811, 1978.
59. CARDA-BROCH, S.; ESTEVE-ROMERO, J. & GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M.C., "Furosemide assay in pharmaceuticals by micellar liquid chromatography: study of the stability of the drug". *J Pharm. Biomed. Anal.* **23**(5): 803-817, 2000.
60. CORBETT, C.E., *Farmacodinâmica*. 5 ed. 1977, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
61. FUCHS, F.D. & WANNMACHER, L., *Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional*. 2 ed. 1999, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
62. GOODMAN, L.S. & GILMAN, A., *Bases Farmacológicas de la Terapêutica*. 4 edition ed. 1974, New York: Interamericana. 191,268.
63. *Farmacopea Internacional*. 3 ed. ed. Vol. 2. 1983, Genebra: Organización Internacional da Salud.
64. DIAS, I.L.T.; NETO, G.D.; VENDRAMINI, D.C.; SOMMER, C.; MARTINS, J.L.S. & KUBOTA, L.T., "A poly(vinyl chloride) membrane electrode for the determination of the diuretic furosemide". *Anal. Lett.* **37**(1): 35-46, 2004.
65. BASAVIAH, K.; CHANDRASHEKAR, U. & NAGEGOWDA, P., "Rapid titrimetric and spectrophotometric determination of frusemide (furosemide) in formulations using bromate-bromide mixture and methyl orange". *Indian. J. Chem. Techn.* **12**(2): 149-155, 2005.
66. ABDELHAY, M.H., "Stability-Indicating Derivative Spectrophotometric Determination of Frusemide". *Int. J. Pharm.* **99**(2-3): 333-336, 1993.
67. GARCIA, M.S.; SANCHEZPEDRENO, C.; ALBERO, M.I. & RODENAS, V., "Flow-injection spectrophotometric determination of frusemide or sulphathiazole in pharmaceuticals". *J Pharm. Biomed. Anal.* **15**(4): 453-459, 1997.
68. GOTARDO, M.A.; GIGANTE, A.C.; PEZZA, L. & PEZZA, H.R., "Determination of furosemide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy". *Talanta*. **64**: 361-365, 2004.
69. MERCK, I., *Index Merck*. 1999, New York: ACS.
70. MORISON, R.T. & BOYD, R.N., *Química Orgânica*. 6 ed. 1986, New York: Fundação Calouste.
71. PORTER, W.H. & MOYER, T.P., *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2 ed, ed. BURTIS, C.A. & ASHWOOD, E.R. 1999.
72. KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, J.H., *Química Farmacêutica*. 1982, Rio de Janeiro: Guanabara Dois. 159.

73. ANVISA, *Risco de intoxicação com analgésicos e antitérmicos*, in *Risco de intoxicação com analgésicos e antitérmicos*, ANVISA, Editor. 2002.
74. KISELY, S.R.; LAWRENCE, D. & PRESTON, N.J., "The effect of recalling paracetamol on hospital admissions for poisoning in Western Australia". *Med. Com.* **178**(2): 72-74, 2003.
75. WERMUTH, C.G., *THE PRATICY OF MEDICINAL CHEMISTRY*. 1999, New York: Academic Press. 660.
76. IVANOVIC, D.; MEDENICA, M.; NIVAUDGUERNET, E. & GUERNET, M., "4th-Derivative Spectrophotometric Determination of Some Pharmaceutical Substances". *Spectrosc Lett.* **28**(4): 557-571, 1995.
77. MEDENICA, M.; IVANOVIC, D. & MALENOVIC, A., "The second-derivative spectrophotometric assay of a multicomponent analgetic mixture". *Spectrosc Lett.* **33**(2): 173-183, 2000.
78. ERK, N. & ONUR, F., "Simultaneous determination of analgine and paracetamol in tablets by spectrophotometric methods". *Anal. Lett.* **30**(6): 1201-1210, 1997.
79. SENA, M.M. & POPPI, R.J., "N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine". *J Pharm. Biomed. Anal.* **34**(1): 27-34, 2004.
80. ERK, N.; OZKAN, Y.; BANOGLU, E.; OZKAN, S.A. & SENTURK, Z., "Simultaneous determination of paracetamol and methocarbamol in tablets by ratio spectra derivative spectrophotometry and LC". *J Pharm. Biomed. Anal.* **24**(3): 469-475, 2001.
81. ORTEGA-BARRALES, P.; PADILLA-WEIGAND, R. & MOLINA-DIAZ, A., "Simultaneous determination of paracetamol and caffeine by flow injection-solid phase spectrometry using C-18 silica gel as a sensing support". *Anal. Sci.* **18**(11): 1241-1246, 2002.
82. MEDINA, A.R.; DE CORDOVA, M.L.F. & DIAZ, A.M., "A very simple resolution of the mixture paracetamol and salicylamide by flow injection-solid phase spectrophotometry". *Anal. Chim. Acta.* **394**(2-3): 149-158, 1999.
83. RUIZ-MEDINA, A.; FERNANDEZ-DE CORDOVA, M.L.; AYORA-CANADA, M.J.; PASCUAL-REGUERA, M.I. & MOLINA-DIAZ, A., "A flow-through solid phase UV spectrophotometric biparameter sensor for the sequential determination of ascorbic acid and paracetamol". *Anal. Chim. Acta.* **404**(1): 131-139, 2000.
84. MEDINA, A.R.; DE CORDOVA, M.L.F. & MOLINA-DIAZ, A., "Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet pls multiptosensing device". *J Pharm. Biomed. Anal.* **21**(5): 983-992, 1999.
85. BOUHSAIN, Z.; GARRIGUES, S. & DELAGUARDIA, M., "Flow injection-Fourier transform infrared spectrometric determination of paracetamol in pharmaceuticals". *Analyst.* **121**(5): 635-639, 1996.
86. MOREIRA, A.B.; OLIVEIRA, H.P.M.; ATVARS, T.D.Z.; DIAS, I.L.T.; NETO, G.O.; ZAGATTO, E.A.G. & KUBOTA, L.T., "Direct determination of paracetamol in powdered pharmaceutical samples by fluorescence spectroscopy". *Anal. Chim. Acta.* **539**(1-2): 257-261, 2005.
87. ORTEGA-BARRALES, P.; RUIZ-MEDINA, A.; FERNANDEZ-DE CORDOVA, M.L. & MOLINA-DIAZ, A., "Sensitive and simple determination of diclofenac sodium by use of a continuous flow-injection procedure with solid-phase spectroscopic detection". *Anal. Sci.* **15**(10): 985-989, 1999.
88. CANADA, M.J.A.; REGUERA, M.I.P.; MEDINA, A.R.; DE CORDOVA, M.L.F. & DIAZ, A.M., "Fast determination of paracetamol by using a very simple

- photometric flow-through sensing device". *J Pharm. Biomed. Anal.* **22**(1): 59-66, 2000.
89. ROCHA, F.R.P. & TEIXEIRA, L.S.G., "Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS". *Quim Nova.* **27**(5): 807-812, 2004.
90. PULGARIN, J.A.M. & BERMEJO, L.F.G., "Flow-injection stopped-flow spectrofluorimetric kinetic determination of paracetamol based on its oxidation reaction by hexacyanoferrate(III)". *Anal. Chim. Acta.* **333**(1-2): 59-69, 1996.
91. MARTINEZ-CALATAYUD, J.; PASCUAL-MARTI, M.C. & SAGRADO-VIVES, S., "Determination of Paracetamol by a Flow-Injection Analysis". *Anal. Lett.* **19**(19-20): 2023-2038, 1986.
92. ANICETO, C. & FATIBELLO, O., "Flow injection spectrophotometric determination of paracetamol (acetaminophen) in pharmaceutical formulations". *Quim nova.* **25**(3): 387-391, 2002.
93. ALAPONT, A.G.; ZAMORA, L.L. & CALATAYUD, J.M., "Indirect determination of paracetamol in pharmaceutical formulations by inhibition of the system luminol-H₂O₂-Fe(CN)₆(3-) chemiluminescence". *J Pharm. Biomed. Anal.* **21**(2): 311-317, 1999.
94. EASWARAMOORTHY, D.; YU, Y.C. & HUANG, H.J., "Chemiluminescence detection of paracetamol by a luminol-permanganate based reaction". *Anal. Chim. Acta.* **439**: 95-100, 2001.
95. OLIVA, M.; OLSINA, R.A. & MASI, A.N., "Selective spectrofluorimetric method for paracetamol determination through coumarinic compound formation". *Talanta.* **66**(1): 229-235, 2005.
96. VERMA, K.K.; JAIN, A. & STEWART, K.K., "Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Acetaminophen in Drug Formulations". *Anal. Chim. Acta.* **261**(1-2): 261-267, 1992.
97. BOUHSAIN, Z.; GARRIGUES, S.; MORALESRUBIO, A. & DELAGUARDIA, M., "Flow injection spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals by means of on-line microwave-assisted hydrolysis and reaction with 8-hydroxyquinoline (8-quinolinol)". *Anal. Chim. Acta.* **330**(1): 59-69, 1996.
98. FILIK, H.; HAYVALI, M. & KILIC, E., "Sequential spectrophotometric determination of paracetamol and p-aminophenol with 2,2'-(1,4-phenylenedivinylene) bis-8-hydroxyquinoline as a novel coupling reagent after microwave assisted hydrolysis". *Anal. Chim. Acta.* **535**(1-2): 177-182, 2005.
99. CEKIC, S.D.; FILIK, H. & APAK, R., "Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol and p-aminophenol in pharmaceutical products with Tiron using dissolved oxygen as oxidant". *J. Anal. Chem.* **60**(11): 1019-1023, 2005.
100. XU, C.L. & LI, B.X., "Spectrophotometric determination of paracetamol with microwave assisted alkaline hydrolysis". *Spectrochim Acta a.* **60**(8-9): 1861-1864, 2004.
101. NAGARAJA, P.; MURTHY, K.C.S. & RANGAPPA, K.S., "Spectrophotometric method for the determination of paracetamol and phenacetin". *J Pharm. Biomed. Anal.* **17**(3): 501-506, 1998.
102. BURAKHAM, R.; DUANGTHONG, S.; PATIMAPORNLEERT, L.; LENGHOR, N.; KASIWAD, S.; SRIVICHAI, L.; LAPANANTNOPPAKHUN, S.; JAKMUNEE, J. & GRUDPAN, K., "Flow-injection and sequential-injection determinations of paracetamol in pharmaceutical preparations using nitrosation reaction". *Anal. Sci.* **20**(5): 837-840, 2004.

103. KNOCHEN, M.; GIGLIO, J. & REIS, B.F., "Flow-injection spectrophotometric determination of paracetamol in tablets and oral solutions". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **33**(2): 191-197, 2003.
104. SUAREZ, W.T.; VIEIRA, H.J. & FATIBELLO, O., "Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos empregando um sistema de análise por injeção em fluxo com geração de ácido nitroso". *Eclet. Quim.* **30**(1): 21-28, 2005.
105. GALVEZ, A.M.; MATEO, J.V.G. & CALATAYUD, J.M., "Study of various indicating redox systems on the indirect flow-injection biamperometric determination of pharmaceuticals". *Anal. Chim. Acta.* **396**(2-3): 161-170, 1999.
106. NI, Y.N.; WANG, Y.R. & KOKOT, S., "Differential pulse stripping voltammetric determination of paracetamol and phenobarbital in pharmaceuticals assisted by chemometrics". *Anal. Lett.* **37**(15): 3219-3235, 2004.
107. VIEIRA, I.C.; LUPETTI, K.O. & FATIBELLO, O., "Determination of paracetamol in pharmaceutical products using a carbon paste biosensor modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*)". *Quim. Nova.* **26**(1): 39-43, 2003.
108. STEY, C.; STEURER, J.; BACHMANN, S.; MEDICI, T.C. & TRAMÈR, M.R., "The effect of oral N-acetylcysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review". *Eur. Respir. J.* **16**: 253-262, 2000.
109. GILLISSEN, A. & NOWAK, D., "Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy". *Resp. Med.* **92**: 609-623, 1998.
110. VERMA, K.K., "Titrimetric determination of thiols: tetrathionate, iron (III), cysteine and hexacyanoferrate(III) as thiol reagents". *Talanta.* **26**: 277-282, 1979.
111. ABU EID, M., "Spectrophotometric determination of cysteine and N-acetylcysteine in pharmaceutical preparations". *Mikrochim Acta.* **129**(1-2): 91-95, 1998.
112. FORNAZARI, A.; SUAREZ, W.T.; VIEIRA, H.J. & FATIBELLO, O., "Flow injection spectrophotometric system for N-acetyl-L-cysteine determination in pharmaceuticals". *Acta Chim. Slov.* **52**(2): 164-167, 2005.
113. RAGGI, M.A.; CAVRINI, V. & DIPIETRA, A.M., "Colorimetric Determination of Acetylcysteine, Penicillamine, and Mercaptopropionylglycine in Pharmaceutical Dosage Forms". *J. Pharm. Sci.* **71**(12): 1384-1386, 1982.
114. 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.
115. GARCIA-MOLINA, F.; PENALVER, M.J.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J.N.; GARCIA-CANOVAS, F. & TUDELA, J., "Enzymatic method with polyphenol oxidase for the determination of cysteine and N-acetylcysteine". *J. Agr. Food Chem.* **53**(16): 6183-6189, 2005.
116. 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.
117. AL-GHANNAM, S.M.; EL-BRASHY, A.M. & AL-FARHAN, B.S., "Fluorimetric determination of some thiol compounds in their dosage forms". *Farmaco.* **57**(8): 625-629, 2002.
118. LENARCZUK, T.; ROSZCZYK, I. & KONCKI, R., "Quick cuvette test for thiol compounds". *Anal. Lett.* **33**(1): 137-144, 2000.
119. DO CARMO, D.R.; DA 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.

120. PINTO, P.; SARAIVA, M.; SANTOS, J.L.M. & LIMA, J., "Fluorimetric determination of aminocaproic acid in pharmaceutical formulations using a sequential injection analysis system". *Talanta*. **68**(3): 857-862, 2006.
121. ALVAREZCOQUE, 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): 975-977, 1989.
122. HERNANDEZ, M.J.M.; ALVAREZCOQUE, 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.
123. SANCHEZPEDRENO, C.; ALBERO, M.I.; GARCIA, M.S. & RODENAS, V., "Determination of n-acetylcysteine in pharmaceutical samples by flow-injection". *Analyst*. **117**(5): 925-928, 1992.
124. *British Pharmacopeia*. 1990. London.
125. VIEIRA, H.J. & FATIBELLO-FILHO, O., "Indirect flow injection determination of N-acetyl-L-cysteine using cerium(IV) and ferroin". *Quim. Nova*. **28**(5): 797-800, 2005.
126. *Farmacopéia Brasileira*. 1977, São Paulo: Organização Andrei Editora.
127. 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 using bromine as reagent". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**(4): 771-775, 2005.
128. MILLER, J.C. & MILLER, J.N., *Estadística para Química Analítica*. 1993, Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana S.A.
129. JOHNSON, J.D. & OVERBY, R., "Stabilized neutral orthotolidine, SNORT, colorimetric method for chlorine". *Anal. Chem.* **41**: 1744, 1969.
130. CHERONS, N.D., *Organic Functional Group Analysis by Micro and Semimicro Methods*. 1964: John Wiley & Sons, Inc. 338-343.
131. SALVADOR, A.; CHISVERT, A.; RODRIGUEZ, A. & MARCH, J.G., "Indirect spectrophotometric determination of p-aminobenzoic acid in sunscreen formulations by sequential injection analysis". *Anal. Chim. Acta*. **493**(2): 233-239, 2003.
132. AMELIN, V.G.; KOLODKIN, I.S. & IRININA, Y.A., "Test method for the determination of hydrogen peroxide in atmospheric precipitation and water using indicator papers". *J Anal. Chem.* **55**(4): 374-377, 2000.
133. RALFS, M. & HEINZE, J., "Disposable optochemical sensor for the determination of chlorine concentrations in the ppb-range". *Sensor Actuat B-Chem.* **44**(1-3): 257-261, 1997.
134. VILCHEZ, J.L.; BLANC, R.; AVIDAD, R. & NAVALON, A., "Spectrofluorometric Determination of Paracetamol in Pharmaceuticals and Biological-Fluids". *J Pharm. Biomed. Anal.* **13**(9): 1119-1125, 1995.
135. BEDNER, M. & MACCREHAN, W.A., "Transformation of acetoaminophen by chlorination produces the toxicants 1,4-benzoquinone and n-acetyl-p-benzoquinoneimine". *Environ. Sci. Technol.* **40**(2): 516-522, 2006.
136. ANN ARMOUR, M.; BROWNE, L.M. & WEIR, G.L., *Hazardous Chemicals – Information and Disposal Guide*. 1987: University of Alberta. 72-73.
137. WALASH, M.I.; ELBRASHY, A.M. & SULTAN, M.A., "Polarographic-behavior and determination of paracetamol and salicylamide after treatment with nitrous-acid". *Mikrochim Acta*. **113**(1-2): 113-124, 1994.
138. UENO, K.; IMAMURA, T. & CHENG, L., *Handbook of Organic Analytical Reagents*. 2 ed. 1992, London: CRC Press.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)