

João Alexandre Velho Prior

SISTEMAS AUTOMÁTICOS EM FLUXO CONTÍNUO PARA O CONTROLO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

PORTO | 2005

**SISTEMAS AUTOMÁTICOS EM FLUXO CONTÍNUO PARA
O CONTROLO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

**Dissertação apresentada à
UNIVERSIDADE DO PORTO
com vista à obtenção do grau de doutor**

por

João Alexandre Velho Prior

Novembro, 2005

**Serviço de Química-Física
Faculdade de Farmácia
Universidade do Porto
Porto, Portugal**

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Résumé	vii

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1. Introdução	1 - 1
1.1. Controlo de qualidade de formulações farmacêuticas	1 - 5
1.2. Automação e automatização	1 - 13
1.3. Métodos de fluxo	1 - 19
1.3.1. Métodos de fluxo contínuo	1 - 21
1.3.1.1. Análise por Injecção em Fluxo	1 - 22
1.3.1.2. Análise por Injecção Sequencial	1 - 27
1.3.1.3. Multicomutação	1 - 31
1.3.1.3.1. Conceitos gerais	1 - 31
1.3.1.3.2. Evolução da multicomutação	1 - 37
1.3.1.4. Multiseringa	1 - 75
1.3.1.5. Lab-on-valve	1 - 78
1.3.1.6. Multi-impulsão	1 - 81
1.3.1.6.1. Conceitos gerais	1 - 81
1.3.1.6.2. Evolução da multi-impulsão	1 - 85
1.4. Metodologias analíticas automáticas para a análise de produtos farmacêuticos	1 - 93
1.5. Referências bibliográficas	1 - 95

CAPÍTULO 2

Parte Experimental

2.1. Introdução	2 - 1
2.2. Reagentes e soluções	2 - 1
2.3. Equipamento e instrumentação	2 - 2
2.3.1. Montagens de fluxo baseadas no conceito de multicomutação	2 - 3
2.3.1.1. Sistemas de propulsão e transporte	2 - 3
2.3.1.2. Unidades de comutação: válvulas solenóides ..	2 - 6
2.3.1.3. Sistema de detecção	2 - 8
2.3.1.4. Sistema de controlo	2 - 9
2.3.1.4.1. Aparelhagem	2 - 9
2.3.1.4.2. Programas informáticos	2 - 10
2.3.2. Montagens de fluxo baseadas no conceito de multi-impulsão	2 - 11
2.3.2.1. Sistemas de propulsão, inserção e transporte ...	2 - 11
2.3.2.2. Sistema de detecção	2 - 13
2.3.2.3. Sistema de controlo	2 - 13
2.3.2.3.1. Aparelhagem	2 - 13
2.3.2.3.2. Programas informáticos	2 - 14
2.4. Optimização e avaliação das montagens de fluxo	2 - 14
2.5. Preparação de padrões e amostras	2 - 15
2.6. Métodos de referência	2 - 16
2.7. Procedimentos de avaliação das metodologias analíticas desenvolvidas	2 - 17
2.8. Referências bibliográficas	2 - 19

CAPÍTULO 3**Determinação espectrofotométrica de clomipramina num sistema de fluxo multicomutado**

3.1. Introdução	3 - 1
3.2. Parte Experimental	3 - 6
3.2.1. Reagentes	3 - 6
3.2.2. Equipamento	3 - 7
3.2.3. Montagem de fluxo multicomutado	3 - 8
3.2.4. Método de referência	3 - 12
3.3. Resultados e discussão	3 - 13
3.3.1. Ensaio preliminares por procedimentos discretos	3 - 13
3.3.2. Desenvolvimento e otimização do sistema de fluxo ..	3 - 20
3.3.3. Análise de formulações farmacêuticas	3 - 29
3.4. Conclusões	3 - 31
3.5. Referências bibliográficas	3 - 34

CAPÍTULO 4**Determinação de trimipramina com um sistema automático multicomutado com inversão de fluxo**

4.1. Introdução	4 - 1
4.2. Parte Experimental	4 - 7
4.2.1. Reagentes	4 - 7
4.2.2. Equipamento	4 - 8
4.2.3. Montagem de fluxo	4 - 9
4.2.4. Método de referência	4 - 12

4.3. Resultados e discussão	4 - 13
4.3.1. Análise de formulações farmacêuticas	4 - 31
4.4. Conclusões	4 - 34
4.5. Referências bibliográficas	4 - 36

CAPÍTULO 5

Determinação de isoniazida por um sistema em fluxo contínuo

5.1. Introdução	5 - 1
5.2. Parte Experimental	5 - 8
5.2.1. Reagentes	5 - 8
5.2.2. Equipamento	5 - 9
5.2.3. Montagem de fluxo	5 - 10
5.2.4. Método de referência	5 - 14
5.3. Resultados e discussão	5 - 14
5.3.1. Volume de passo da bureta, comprimento do reactor, volume de amostra e estratégia de amostragem	5 - 17
5.3.2. Comprimento do reactor	5 - 29
5.3.3. Caudal (frequência de passo das buretas)	5 - 32
5.3.4. Concentração de NQS e pH	5 - 37
5.3.5. Análise de formulações farmacêuticas	5 - 39
5.4. Conclusões	5 - 40
5.5. Referências bibliográficas	5 - 43

CAPÍTULO 6

Determinação de pirazinamida por quimioluminescência num sistema de fluxo com multi-impulsão

6.1. Introdução	6 - 1
6.2. Parte Experimental	6 - 8
6.2.1. Reagentes	6 - 8
6.2.2. Equipamento	6 - 9
6.2.3. Montagem de fluxo	6 - 11
6.2.4. Método de referência	6 - 15
6.3. Resultados e discussão	6 - 16
6.3.1. Optimização dos parâmetros químicos	6 - 18
6.3.2. Optimização dos parâmetros do sistema de fluxo	6 - 25
6.3.3. Análise de formulações farmacêuticas	6 - 37
6.3.4. Exploração do sistema de fluxo	6 - 40
6.4. Conclusões	6 - 42
6.5. Referências bibliográficas	6 - 46

CAPÍTULO 7

Conclusões Finais	7 - 1

ANEXO

Lista de Publicações Científicas

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, a quem especialmente agradeço por me ter possibilitado a realização deste doutoramento, assim como, a maneira especial e dedicada com que me acolheu no laboratório.

Ao meu amigo Professor Doutor João Luís, um abraço de gratidão à “sua” medida, pela marcante presença durante o desenvolvimento de todo este trabalho, o que possibilitou a sua concretização. O meu profundo reconhecimento pela sua orientação inteligente e criativa na selecção de Portos, e também, por todo o trabalho desenvolvido pelo seu primeiro aluno de doutoramento.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio, à qual agradeço a bolsa de doutoramento que me foi atribuída (SFRH/BD/2833/2000) e todo o apoio financeiro, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, um agradecimento por me ter acolhido como aluno de doutoramento.

Aos Professores Doutores: Rui Lapa, Salette Reis, Conceição Montenegro, Lúcia Saraiva, Alberto Araújo, Beatriz Quinaz, Agostinho Almeida e Eduarda Fernandes, e também à Marcela Segundo, um obrigado por todas as ajudas com que cada um contribuiu à sua maneira durante o desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Isabel Cardoso, um beijinho de gratidão, pela amizade, ternura e palavras de incentivo (e pelas bolachinhas à 1 da manhã... nos muitos dias de trabalho nocturno) durante o desenrolar do trabalho laboratorial.

Aos já doutorados, Ivone Pinto (companheira do álcool etílico 96%), Rita Catarino (vizinha), Adriana Pimenta e Nestor Zarate, muitos beijinhos e abraços, por todos os momentos de excelente disposição que proporcionaram.

Aos meus amigos do laboratório: Christophe Siquet (grande abraço de agradecimento pelas traduções), Marlene Lúcio, Karine Marques, Marta Ribeiro, Helena Ferreira, Luís Magalhães, David Costa, Paula Pinto, Emília Santos, Célia Amorim, e todos os outros, deixo beijinhos e abraços, por todo o apoio e amizade com que vivemos todos juntos no laboratório.

Ao Rodrigo Santos um abraço pelos momentos de amizade, companheirismo e apoio.

À D. Belmira Pereira, um “amigo” agradecimento, por todos os auxílios nas resoluções dos problemas no dia-a-dia de trabalho, no laboratório.

À amiga Paula Jerónimo (Tssshh!), um beijinho pela amizade desenvolvida.

Ao amigo Pedro Maia, pelos prolongados “luscos-fuscos” ao som Drum’n’Bass, um especial abraço, por todas as filosofias e reflexões incidentes na realização humana de todos os seres enquanto egocêntricos e... simplesmente humanos!

À minha amiga Cristina Lopes “Pires”, beijinhos de sincera gratidão, por toda a amizade, partilha, companheirismo, jantares, ..., e cafés!

Ao meu amigo de longa data, Gabriel Pereira, um abraço de amizade sincera, mas de não agradecimento, devido a todas as vezes a que fui “forçado” a desviar-me do meu trabalho sério e árduo, para enveredar em “quantum-leaps”.

Ao meu grande amigo, Artur Figueirinha, também um abraço de amizade sincera, por todas as (desesperadamente) hilariantes multi-discussões e multi-representações teatrais. Presunto e petiscos só no final...!

Ao Ricardo Oliveira, meu amigo, um abraço de gratidão por aguardar pacientemente pelos jantares (constantemente adiados) e pela(s) desforra(s) no snooker!

À minha namorada Rosário, um beijinho especial por toda a compreensão, paciência, carinho, amizade, ... e força!

Aos meus queridos pais e irmão, a quem tudo devo..., não há palavras que descrevam o significado da sua presença na minha vida!

RESUMO

O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de sistemas analíticos automáticos para o controlo químico de formulações farmacêuticas. Os sistemas de fluxo implementados possibilitaram variadíssimas formas de intervenção sobre a zona de amostra, nomeadamente a exploração de diferentes estratégias de amostragem, incluindo a amostragem binária, a inserção de volumes únicos e a inserção por confluência de zonas, e também permitiram, um controlo efectivo do transporte da zona de reacção para o sistema de detecção.

Implementou-se um procedimento analítico para a determinação de clomipramina em formulações farmacêuticas, baseado num sistema automático de fluxo multicomutado. A estratégia de inserção de amostra e de reagentes por amostragem binária favoreceu o desenvolvimento da reacção, e o controlo do volume de amostra inserido, baseado na utilização de uma amostragem temporizada, possibilitou manipular a dispersão da amostra no interior do sistema, excluindo a necessidade de efectuar modificações na configuração física da montagem.

Rentabilizando a elevada versatilidade operacional proporcionada pela multicomutação, foi desenvolvida uma metodologia analítica para a determinação de trimipramina em formulações farmacêuticas, que combinou a estratégia de amostragem binária com a utilização de uma inversão do sentido do fluxo, resultando num desenvolvimento rápido da reacção.

Foi também concebido um sistema de análise em fluxo contínuo, baseado na utilização de buretas automáticas que actuam simultaneamente como unidades de inserção e de propulsão de soluções. Este sistema, aplicado para a determinação de isoniazida em formulações farmacêuticas, possibilitou a combinação da estratégia de amostragem binária com a inserção de segmentos de soluções com

volume de cerca de 1 μ L, resultando num favorecimento da mistura amostra e reagente, mesmo em condições de dispersão limitada.

Foi desenvolvida uma metodologia analítica baseada na implementação de um sistema de fluxo com multi-impulsão, para a determinação de pirazinamida em formulações farmacêuticas. A elevada extensão de mistura das soluções conferida pelo fluxo pulsado, característico destes sistemas, possibilitou a utilização de um sistema de detecção por quimioluminescência. Foram obtidos dois intervalos de resposta linear para concentrações de pirazinamida, unicamente através de alterações nos valores dos parâmetros de controlo do sistema, via computador.

A validação dos sistemas analíticos desenvolvidos foi realizada por avaliação comparativa dos resultados obtidos relativamente aos fornecidos pelos métodos indicados pelas Farmacopeias.

ABSTRACT

The aim of this work was the development of automated analytical systems for the chemical control of pharmaceutical formulations. The implemented flow systems allowed several ways of manipulation of the zone sample, namely the exploitation of different sampling strategies, including the binary sampling, the insertion of unique volumes and the merging zones, and also allowed a precise control of the reaction zone transportation towards detection system.

It was developed an analytical procedure for the determination of clomipramina in pharmaceutical formulations, based on a multicommutated flow system. The use of the binary sampling approach for the sample and reagents insertion into the analytical system enhanced the reaction development, and the time dependent control of the sample volume inserted into the system, allowed the manipulation of the dispersion of the sample inside the system, without the need for any physical reconfiguration of the manifold.

The high operational versatility provided by multicommutation was exploited in an analytical methodology for the determination of trimipramine in pharmaceutical formulations, through the combination of the binary sampling approach with flow-reversion, yielding a very fast reaction development.

It was also conceived a continuous flow analytical system, based in the use of multiple syringe-pumps, that act simultaneously as sample-insertion, reagent-introduction, and solution-propelling units. This system, applied for the determination of isoniazid in pharmaceutical formulations, allowed the combinations of the binary sampling approach with the insertion of small solution volumes of approximately 1 μL , resulting in an enhancement of the sample and reagent mixing, even in limited dispersion conditions.

It was developed an analytical methodology based on the concept of multi-pumping, for the determination of pyrazinamide in pharmaceutical formulations. The high extension of the solutions mixture due to the pulsed flow, characteristic of these systems, allowed the use of a chemiluminescence detection system. It were obtained two ranges of linear response for pyrazinamide concentrations, only by performing modifications of the parameter values controlling the system, through computer.

The validation of the developed flow systems was accomplished by a comparative evaluation of the obtained results in relation to the ones supplied by the execution of the reference procedures in the Pharmacopoeias.

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail était le développement de systèmes analytiques automatiques pour le contrôle chimique de formulations pharmaceutiques. Les systèmes de flux implémentés ont rendu possible plusieurs formes d'intervention sur la zone d'échantillonnage, comme l'exploration de différentes stratégies d'échantillonnage, ainsi que l'échantillonnage binaire, l'insertion de volumes uniques et l'insertion par confluence de zones, et ils ont permis également un contrôle précis de la zone de réaction jusqu'au système de détection.

Une procédure analytique a été implémentée pour la détermination de la clomipramine dans des formulations pharmaceutiques, basée sur un système automatique de flux multicommuté. La stratégie d'insertion de l'échantillon et des réactifs par échantillonnage binaire a favorisé le développement de la réaction, et le contrôle du volume de l'échantillon inséré, basé sur l'utilisation d'un échantillonnage temporisé, a permis de manipuler la dispersion de l'échantillon à l'intérieur du système, excluant la nécessité d'effectuer des modifications de la configuration physique du montage.

En rentabilisant la versatilité opérationnelle élevée proportionnée par la multicommutation, une méthodologie analytique pour la détermination de la trimipramine dans des formulations pharmaceutiques, qui combinait la stratégie de l'échantillonnage binaire avec l'utilisation d'un changement de sens du flux résultant en un avancement rapide de la réaction, a été développée.

Un système d'analyse en flux continu, basé sur l'utilisation de burettes automatiques qui agissent simultanément comme unités d'insertion et de propulsion des solutions, a été conçu. Ce système, appliqué à la détermination d'isoniazide dans des formulations pharmaceutiques, a rendu possible la combinaison de la stratégie d'échantillonnage binaire avec l'insertion de segments

de solutions de volume d'environ 1 μL , résultant en une amélioration du mélange échantillon/réactif, même dans des conditions de dispersion limitée.

Une méthodologie analytique, basée sur l'implémentation d'un système de flux multi-impulsion, a été développée pour la détermination de pirazinamide dans des formulations pharmaceutiques. L'extension élevée du mélange des solutions conférée par le flux pulsé, caractéristique de ce système, a rendu possible l'utilisation d'un système de détection par chimiluminescence. Deux intervalles de réponse linéaire pour des concentrations de pirazinamide ont été obtenus uniquement par des altérations des valeurs des paramètres de contrôle du système, *via* ordinateur.

La validation des systèmes analytiques développés a été réalisée par l'évaluation comparative des résultats obtenus relativement à ceux fournis par des méthodes indiquées par les pharmacopées.

CAPÍTULO

1

INTRODUÇÃO GERAL

As metodologias analíticas em fluxo contínuo, caracterizadas por uma grande versatilidade, flexibilidade e facilidade de automatização, assumem um papel cada vez mais importante no desenvolvimento de sistemas automáticos de análise de produtos farmacêuticos. As metodologias de fluxo possibilitam o desenvolvimento e implementação de sistemas de análise em fluxo, os quais fornecem um conjunto de características operacionais que permitem um leque alargado de intervenções e manipulações da amostra em condições de elevada reprodutibilidade.

1. Introdução

Nas últimas décadas tem vindo a assistir-se a uma readaptação e ramificação da Química Analítica. Esta área da Química, vasta pelas suas aplicações, sofreu transformações nos seus objectivos, que passaram a englobar, por exemplo, o desenvolvimento de métodos analíticos mais rápidos, mais fáceis de executar, com menos custos e com menor geração de resíduos, por consequência das evoluções tecnológicas, e novas necessidades industriais e socio-económicas. Na actualidade vive-se uma era tecnológica em constante evolução, que exerce uma influência acentuada na área de análise química de compostos e substâncias, como por exemplo, a nível da indústria farmacêutica. Os desenvolvimentos modernos nos campos da automação, quimiometria, técnicas de separação e de medição, amostragem e pré-tratamento de amostras têm vindo a ser gradualmente incorporados como procedimentos normais ou até de rotina em Química Analítica [1].

A exactidão, precisão, selectividade e sensibilidade são os principais requisitos de um método analítico, que são consideradas quando o químico analítico avalia diversas metodologias com vista à obtenção de informação química de um sistema, e deste modo, essas exigências analíticas devem ser permanentemente consideradas como referências para a análise de amostras e comparação entre estratégias analíticas e métodos de análise [2]. No entanto, quando na prática se executa uma determinação analítica, não são apenas estes princípios básicos a ter em consideração, mas também alguns aspectos práticos, como por exemplo, o tempo necessário para a execução da análise da amostra, o custo da análise, o conforto e segurança na execução, assim como efeitos laterais relacionados com o

consumo de reagentes e produção de resíduos, sendo este último aspecto importante tendo em conta factores ambientais [1].

Na área de análise química tem-se vindo a observar gradualmente um maior uso da automatização em procedimentos envolvendo determinações químicas, em consequência do aumento do conhecimento tecnológico disponibilizado, tornando a automação uma ferramenta de análise. As novas estratégias analíticas automatizadas possibilitaram um aumento do número de amostras analisadas por unidade de tempo, a redução da exposição do operador a amostras perigosas, a eliminação de erros associados ao factor humano, um incremento da eficiência analítica, a redução do consumo de reagentes e produção de resíduos, e a maximização da capacidade analítica do equipamento disponível. Deste modo, a opção pelas metodologias automáticas por parte dos laboratórios de controlo justifica-se com base em aspectos económicos derivados de um menor envolvimento do operador e o aumento do número de análises efectuadas com menor consumo de reagentes. Através da diminuição do consumo de reagentes ocorre um decréscimo dos custos analíticos e resulta simultaneamente num aumento da segurança ambiental devido à diminuição da formação de resíduos perigosos [3].

A expressão “química analítica verde” engloba uma série de práticas e estratégias realizadas com vista a reduzir ou evitar os efeitos laterais poluentes dos métodos analíticos. Para manter as principais características da Química Analítica sem sacrificar outros parâmetros importantes como o custo e a velocidade da análise, é óbvio que a melhoria dos métodos analíticos deve incidir na redução dos resíduos, na miniaturização do equipamento analítico e na descontaminação “in-line” ou reciclagem dos resíduos analíticos [4, 5]. É importante garantir que os novos desenvolvimentos nas metodologias analíticas integrem todos estes objectivos e que sejam incorporados na análise química de amostras e aquisição de dados.

O maior recurso a instrumentos para realizar análises químicas possibilita o processamento de amostras com volume reduzido ou inclusive várias determinações em simultâneo. Outra vantagem, que não pode deixar de ser mencionada, é o facto de a automatização das metodologias analíticas ter originado novas perspectivas e actuações face a análises de difícil execução manual, consequência de uma necessidade de obtenção de resultados mais exactos e precisos, de forma mais rápida e segura. Tal situação ocorre quando se pretende, por exemplo, recorrer a métodos de análise baseados em reacções incompletas, melhorar o desempenho em situações em que a espécie a determinar é instável, ou em situações em que a recuperação da espécie é incompleta, como no caso de extracções ou diálises, e por último na implementação de métodos cinéticos. Em parte todas as vantagens referidas anteriormente se relacionam com o facto de com a automatização dos métodos analíticos ocorrer igualmente a automatização da etapa analítica de manipulação da amostra, podendo englobar as etapas de amostragem e o seu pré-tratamento [6]. Nos métodos de análise discretos existe uma grande influência negativa na qualidade e eficiência da análise causada pela manipulação da amostra [7], em que se destaca a diminuição da precisão, a necessidade de trabalhar com volumes elevados de amostra, uma tendência para um decréscimo na utilização dos procedimentos de qualidade e um aumento significativo do tempo dedicado pelo operador à execução da análise.

Em meados do século anterior, aproximadamente, os principais esforços foram essencialmente centralizados no desenvolvimento de novos e mais sofisticados métodos de medições baseados em princípios físico-químicos, e deste modo, hoje em dia, existe um grande número de técnicas e metodologias apropriadas para serem convenientemente adaptadas para a resolução de qualquer problema específico, através da automação [8].

No entanto, é necessário prestar atenção às várias etapas das análises químicas: amostragem, pré-tratamento da amostra, esquema analítico (selecção da metodologia mais apropriada, hifenização entre técnicas analíticas), medição do sinal analítico, aquisição/tratamento dos dados e descontaminação dos resíduos. Quando se procura obter o máximo de informação possível durante essas etapas, encontra-se diversos problemas, como por exemplo, perda ou contaminação dos analitos, extracções ou dissoluções muito morosas, selectividade e sensibilidade.

A automatização de todas as etapas de uma análise química pode ser concretizada por intermédio do conceito de análise em fluxo [1]. A análise química em fluxo surge como uma das mais relevantes estratégias para a integração de todas as etapas referidas acima e para o desenvolvimento de metodologias para a resolução de problemas que possam ser limitativos da execução rotineira de análises químicas, como por exemplo, no controlo químico numa indústria farmacêutica.

Considerando a etapa analítica de amostragem e a necessidade de conservação das amostras, é sabido que a qualidade dos resultados depende não só da selecção apropriada e da representatividade das amostras, como também das alterações nas condições das amostras do seu próprio ambiente desde a colheita até ao transporte para o laboratório, constituindo este facto provavelmente o “calcanhar de Aquiles” de qualquer método analítico, independentemente do uso da mais sofisticada instrumentação [1]. Deste modo, os conceitos de análise em fluxo [9], que no início foram aplicados à automação das técnicas de medição [10] oferecem hoje excelentes possibilidades para a melhoria da etapa de amostragem e para reduzir os riscos do armazenamento das amostras. Um sistema de análise em fluxo pode facilmente ser transportado para o local de recolha de amostras (como por exemplo, a recolha de água do mar no alto-mar), ou produção de amostras (como por exemplo, numa indústria farmacêutica), e permitir a determinação directa, em

fluxo, dos elementos ou compostos em causa, sem necessidade de armazenamento e conservação das amostras.

1.1. Controlo de qualidade de formulações farmacêuticas

O fabrico de medicamentos pode ser inserido no âmbito mais geral da indústria química, e assim compreende-se que os métodos analíticos desempenhem um papel importante em todas as fases de investigação, desenvolvimento, produção e uso clínico de medicamentos [11].

Actualmente, o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica pressupõe uma série de etapas, que contudo podem diferir em alguns aspectos de indústria para indústria [12], nomeadamente: i) síntese, em pequena escala, de uma série de compostos orgânicos para os quais se espera, teoricamente, o desenvolvimento de actividade biológica; ii) testes farmacológicos dos compostos; iii) selecção de um (ou mais) dos compostos para estudos posteriores; iv) síntese do composto em pequena escala; v) estudos toxicológicos, desenvolvimento analítico e de pré-formulação; vi) investigação da nova formulação (forma farmacêutica e excipientes); vii) síntese de um lote, ligeiramente maior, do composto; viii) testes clínicos de fase I (Farmacologia Clínica); ix) testes clínicos de fase II (avaliação da dose, efeitos laterais e biodisponibilidade); x) testes clínicos de fase III; xi) primeira produção de lote (completa ou parcial); xii) aplicação da nova formulação; xiii) produção de lotes (estudos de estabilidade); xiv) produção de rotina (exclusão do lote de estabilidade); xv) possível alteração da fórmula (estudos de estabilidade).

Neste sentido, e de um ponto de vista analítico, o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica requer, entre outros, testes biológicos, nomeadamente avaliações de mutagenicidade, carcinogenicidade, toxicidade, farmacodinâmica, farmacocinética, etc. Estas análises, que decorrem apenas durante as primeiras etapas de desenvolvimento de uma formulação [13], despertam a procura de novas técnicas analíticas de elevada sensibilidade, selectividade, precisão e exactidão, que permitem a determinação tanto da substância activa como dos seus metabolitos em fluidos biológicos e tecidos.

Além dos testes biológicos, incluem-se também estudos químicos detalhados das matérias-primas, de intermediários sintéticos do próprio fármaco e do produto na formulação final. Estes estudos devem identificar tipos e níveis de impurezas, produtos e velocidade de degradação e, ainda, métodos analíticos adequados à monitorização destes factores. As fontes prováveis de problemas de segurança e os procedimentos do controlo da qualidade e especificações do produto ficam assim definidos, tendo sempre como objectivo obedecer aos requisitos impostos por agências regulamentares, nacionais ou estrangeiras [14].

O esforço analítico envolvido no desenvolvimento e comercialização de uma formulação pode ser subdividido numa série de tarefas como: i) determinação da identidade e da pureza das matérias-primas e intermediários usados na produção do fármaco; ii) determinação da identidade e da pureza do fármaco; iii) isolamento e identificação de impurezas vestigiárias no fármaco; iv) determinação de produtos de degradação do fármaco; v) determinação da identidade e pureza dos excipientes usados na manufactura dos produtos formulados; vi) determinação da identidade do fármaco no produto formulado; vii) determinação de produtos de degradação do produto formulado; viii) estabelecimento de um padrão de referência analítica para o fármaco.

Os requisitos da selectividade, precisão, exactidão e o grau de complexidade que é aceitável do procedimento analítico, variam consideravelmente de tarefa para tarefa (referidas acima), pelo que surge a necessidade de recorrer a uma variedade de técnicas analíticas para o seu desempenho [14].

Uma vez definido e validado um processo de fabrico, existe então a necessidade de um controlo constante para cada lote produzido, no sentido de garantir a qualidade, segurança e eficácia do produto comercial, devendo cada lote encontrar-se devidamente documentado, no que se refere aos vários estágios da produção.

A implementação do controlo de qualidade numa indústria farmacêutica deve-se à necessidade dos medicamentos para uso humano corresponderem exactamente a padrões relacionados com a sua qualidade, segurança e eficácia [15]. De uma forma ampla, o controlo da qualidade é definido como o controlo diário da qualidade dos produtos preparados por uma determinada empresa. Na indústria farmacêutica, o controlo da qualidade envolve uma equipa de cientistas e técnicos, responsáveis por aceitar ou rejeitar as matérias primas e os materiais de embalagem, pelo número indefinido de inspecções e testes ao longo do processo de fabrico, por assegurar o controlo e monitorização dos vários sistemas estabelecidos e, ainda, por aprovar ou rejeitar as formulações farmacêuticas preparadas [16].

O controlo da qualidade inclui por isso testes analíticos que acompanham todas as fases de processamento de um medicamento, desde a descoberta de uma nova molécula com actividade terapêutica, ao desenvolvimento de uma formulação, à sua produção (englobando testes analíticos do produto acabado e a avaliação de todas as operações, começando com a recepção das matérias-primas e continuando ao longo da produção, operações de embalagem, testes do produto acabado, documentação e distribuição) e controlo químico, até ao uso clínico. A

informação obtida com as técnicas analíticas é o suporte de importantes decisões tomadas durante todas as fases que um medicamento tem de passar até ser comercializado.

Neste sentido, estabelecem-se genericamente especificações e padrões para as várias formulações farmacêuticas. As especificações são concebidas com o objectivo primordial de assegurar o uso de materiais e de processos de manufactura adequados, enquanto que os padrões surgem como resultado da variabilidade de um determinado processo de fabrico, da estabilidade de um produto e das limitações dos métodos usados nos testes de verificação. Os procedimentos envolvidos na concretização destes objectivos dependem não apenas da forma farmacêutica em questão, mas também de uma mistura complexa de factores que incluem a natureza e propriedades da substância activa, a dosagem e via de administração, os excipientes usados na manufactura do produto e a estabilidade em condições normais de armazenamento [15].

Antes de qualquer demonstração directa das especificações de eficácia terapêutica e de segurança dos doentes através de ensaios clínicos, importa garantir que os medicamentos cumpriram todas as especificações de qualidade. Assim, a garantia de qualidade viabilizada por essas especificações poderá encurtar o tempo de aprovação de novos fármacos, evitar que problemas de qualidade deturpem resultados clínicos e ainda diminuir os custos globais do processo de produção. Significa que para além dos testes farmacológicos e toxicológicos indispensáveis para a avaliação da eficácia e segurança dos medicamentos, a indústria farmacêutica recorre a testes laboratoriais de carácter químico, físico e físico-químico para avaliar o cumprimento das especificações de qualidade.

Portanto, métodos analíticos altamente específicos, sensíveis e confiáveis desempenham um papel preponderante em todos os aspectos do controlo de qualidade, quer seja na avaliação das especificações das matérias-primas e

excipientes, do controlo em processo, ou das especificações do produto acabado [11]. A avaliação da segurança e da eficácia das formulações farmacêuticas encontra-se por isso dependente da existência de métodos adequados para o controlo da qualidade do produto.

Os estudos de formulação têm como objectivo elaborar uma formulação ideal, para que se possa iniciar a produção das formas farmacêuticas em grande escala. Para garantir que os produtos finais possuem a identidade, pureza, potência, qualidade e uniformidade pretendidas, os procedimentos de produção devem ser rigorosamente seguidos.

A produção é realizada seguindo exactamente os procedimentos operacionais estabelecidos e é necessário, antes mesmo de iniciar a produção, verificar que todas as matérias-primas utilizadas durante a produção cumpriram as especificações de qualidade previamente definidas.

Para assegurar que a produção decorreu como era esperado é necessário identificar os passos críticos do processo, verificar se estes foram convenientemente executados, e ainda avaliar se os padrões de qualidade do produto estão dentro dos limites previamente definidos. Esta estratégia é conhecida pelo controlo em processo (controlo “in-line”), que não é mais que uma série de testes concebidos para controlar os problemas que podem surgir durante a produção de uma forma farmacêutica, de modo a que uma acção correctiva e imediata possa ser considerada. O objectivo do controlo de qualidade em processo é monitorizar todas as propriedades do produto que podem afectar a sua qualidade, podendo assim detectar variações em relação aos limites de tolerância de um produto.

As determinações analíticas efectuadas na monitorização de reacções químicas e bioquímicas envolvidas nos processos de produção devem fornecer sistematicamente medidas quantitativas dos vários parâmetros que controlam

essas reacções [17,18]. Estas determinações possibilitam assim, obter rapidamente um relatório do estado do processo de produção. A obtenção desta informação química em tempo real é extremamente útil para melhorar a consistência, qualidade e quantidade dos processos produtivos. O controlo em processo pode ser utilizado para efectuar correcções aos processos produtivos, se for caso disso, sendo de vital importância para o uso eficiente da energia, do tempo e das matérias-primas.

Um dos testes de controlo de qualidade de formulações farmacêuticas é a determinação do teor de princípio activo. A importância do controlo analítico deste parâmetro decorre de uma possível alteração química da substância activa durante o seu armazenamento, da existência de um erro de fabrico por incorporação de quantidades diferentes daquelas previstas para o produto final, etc. Os métodos analíticos quantitativos utilizados para a determinação do teor de princípio activo devem ser selectivos, precisos e exactos. Além disso, exige-se que estas análises, em grande escala, sejam económicas e com elevados ritmos de determinação. A automatização associada às metodologias de fluxo satisfaz todos estes requisitos.

Para a análise quantitativa de fármacos veiculados em formulações farmacêuticas, as mais diversas farmacopeias referem frequentemente várias etapas preliminares de preparação das amostras, que incluem muitas vezes vários processos extractivos repetidos [14]. Este procedimento visa obter a separação do fármaco a determinar, do veículo ou base da formulação ou, ainda, de eventuais substâncias activas presentes. Apesar disso, a preparação da amostra pode conduzir, na maioria das situações, a modificações químicas do composto em análise, dando origem a compostos quimicamente aparentados que podem interferir na determinação. Adicionalmente, o elevado número de manipulações também envolvido aumenta a probabilidade da ocorrência de erros aleatórios. Neste

sentido, as determinações daqui decorrentes tornam-se menos exactas e/ou precisas, além de não se adequarem às análises de rotina requeridas no controlo da qualidade de um produto em fabrico.

Não será pois surpreendente que estes métodos clássicos de separação tenham dado lugar, em numerosas monografias apresentadas nas mais recentes edições das farmacopeias, aos métodos instrumentais correspondentes.

No entanto, as técnicas instrumentais separativas são também aquelas que predominam na escolha dos vários investigadores, em trabalhos dedicados à análise de formulações farmacêuticas.

Por entre as várias técnicas instrumentais separativas destaca-se claramente a cromatografia. A técnica cromatográfica mais utilizada é baseada em sistemas de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), associados a um detector, mais ou menos, universal. O sistema de detecção mais frequentemente utilizado é um espectrofotómetro de ultravioleta/visível, sintonizado usualmente a um comprimento de onda da região ultravioleta, embora actualmente, sejam utilizados cada vez com maior frequência sistemas de detecção com diode-array.

Embora os procedimentos estabelecidos com os sistemas cromatográficos forneçam resultados de boa precisão e exactidão, podendo ser implementados quer com um objectivo quantitativo, quer com um objectivo qualitativo, eles envolvem algumas manipulações das amostras, particularmente desarejamento e filtração, e longos períodos de condicionamento de uma coluna de separação apropriada. A sua implementação em controlo analítico de rotina poderá não ser a mais adequada, pela impossibilidade de realização de análises expeditas. Adicionalmente, o equipamento aqui envolvido é dispendioso e requer pessoal especializado para o seu funcionamento, o que sugere a procura de técnicas alternativas.

Os ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas são igualmente importantes para o controlo de qualidade dos medicamentos, para a avaliação da similitude das características de diferentes lotes. Quando estes testes fornecem uma informação detalhada das características dinâmicas do processo dissolução são também úteis para acompanhar os estudos de desenvolvimento de novas formas de dosagem. A maioria dos ensaios oficiais descritos nas Farmacopeias, com excepção dos que recorrem a aparelhos de fluxo contínuo, é baseada na recolha manual de amostra do meio de dissolução durante alguns, ou apenas um, períodos de tempo predeterminados. A informação analítica assim obtida pode revelar-se insuficiente para descrever o processo cinético de dissolução, impossibilitando uma contribuição nos estudos de concepção e avaliação de novas formas de dosagem. Além disso, os procedimentos manuais de análise discreta apresentam baixos ritmos de determinação, são pouco práticos e particularmente difíceis, ou até mesmo impossíveis de executar, quando vários testes estão a decorrer em paralelo nos vasos de multi-dissolução (geralmente seis). A monitorização contínua dos princípios activos nos meios de dissolução exige, por isso, a sua automatização. Fang *et. al.* [19], em 1999, identificou as características de um teste de dissolução automático ideal: i) elevada eficiência no pré-tratamento e determinação em linha da amostra, permitindo a monitorização em tempo real; ii) elevada frequência de amostragem para obter uma elevada resolução do perfil de dissolução; iii) baixo consumo de amostra para que a introdução de distúrbio no volume do meio de dissolução seja mínimo, particularmente quando estão envolvidas elevadas frequências de amostragem; iv) testes em paralelo nos vasos de multi-dissolução com um único detector; v) determinação simultânea de multi-componentes numa forma de dosagem; vi) elevada estabilidade do pré-tratamento da amostra e do sistema detector em condições de operação contínua por períodos

prolongados; vii) monitorização contínua da linha de base e da recalibração em linha do sistema de detecção; viii) reduzido consumo de reagentes.

1.2. Automação e automatização

A crescente automatização dos métodos de análise química teve origem na necessidade de aumentar o número de análises de rotina efectuadas nos laboratórios, de maneira a responder rapidamente e eficazmente, com menor dependência do analista e o mais importante, menor custo. De facto, a automatização das metodologias analíticas envolve um duplo objectivo: obter o máximo de informação possível de uma amostra, com o menor custo possível [2]. Inicialmente, os primeiros sistemas analíticos automáticos comercializados foram direccionados para os laboratórios clínicos [20]. No entanto, a aplicação deste tipo de sistemas expandiu-se para outras áreas, como por exemplo, o controlo de processos industriais (farmacêuticos e alimentares) e a monitorização (por exemplo, ambiental) [21].

A monitorização, entendida como o conjunto de metodologias analíticas que permitem extrair informações de sistemas em evolução, está a experimentar um crescimento significativo ao rentabilizar a enorme evolução a nível tecnológico na área da instrumentação analítica e automatização [22]. O modo clássico de realizar uma monitorização ambiental consiste numa amostragem pontual e a sua posterior análise e medição num laboratório. Quando há necessidade de efectuar um grande número de medições de um modo rotineiro, a automatização pode reduzir drasticamente o tempo de análise e o custo do pessoal. Resolvido o problema das análises de rotina de grandes números de amostras, a evolução na

área da automatização levou ao desenvolvimento de equipamentos dotados de funcionamento autónomo e destinados a obter informações sobre determinado analito de uma forma contínua em tempo real, ou com algum retardamento. Todos os avanços tecnológicos obtidos até agora, que permitiram a simplificação do procedimento analítico assim como a automatização deste, ofereceram à monitorização as ferramentas necessárias para a obtenção de informação em tempo quase real.

Em relação ao controlo de processos industriais, qualquer processo implica a existência de procedimentos para a manutenção da qualidade do produto final e, consequentemente, também para garantir a qualidade da matéria-prima e de certas fases do processo de fabrico. Em termos de economia e de eficiência, a conversão química envolvida deve ser monitorizada no reactor ou na corrente de produção, isto é, em linha com o processo de produção. Isto implica a utilização de metodologias analíticas que possam ser facilmente e rapidamente adaptáveis a este tipo de medições em linha, que possibilitem a obtenção de rápidas respostas e que sejam precisos, sensíveis, robustos e reproduzíveis. As condições de operação devem permitir a inserção directa de amostras para análise, ou a sua manipulação directa como quando se pretende medições de parâmetros físicos, como a temperatura, pressão ou caudal. Este facto torna-se mais difícil de realizar quando estão envolvidas variáveis químicas, devido às dificuldades impostas pela selectividade do sensor, ou do seu uso, ou pela necessidade de calibrações e recalibrações, como por exemplo, quando se utiliza eléctrodos selectivos [23]. As metodologias de análise em fluxo podem ser adaptadas para a monitorização química em diferentes fases de um processo de produção.

A crescente adesão à automatização dos procedimentos analíticos conduziu à aplicação de novos conceitos e termos cujo significado ainda pouco consolidado pode gerar alguma ambiguidade e confusão.

Com o objectivo de normalizar a nomenclatura relacionada com os métodos automáticos de análise, a Comissão para a Nomenclatura Analítica da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) estabeleceu a definição de alguns dos termos mais usados. Deste modo, é hoje possível evitar equívocos decorrentes da utilização das mesmas palavras com sentidos diversos, como por exemplo:

- (i) Mecanismo: uma combinação de peças, em que pelo menos uma dessas peças é móvel, capazes de produzir um efeito;
- (ii) Mecanização: o uso de mecanismos para substituir, refinar, estender ou complementar o esforço humano;
- (iii) Máquina: um sistema constituído por um conjunto de mecanismos capaz de realizar uma ou mais acções.

O conceito de instrumentação, está relacionado com a produção e/ou transmissão de informação, de acordo com a IUPAC. Sendo assim, um instrumento é uma máquina usada para observar, medir ou comunicar uma propriedade (parâmetro), a qual substitui, refina, estende ou complementa o esforço humano podendo ser constituído por um ou mais mecanismos.

A utilização de sistemas (instrumentos) aos quais é adicionado um componente de decisão, sem intervenção humana, denomina-se automação. Mais concretamente, é definida como o uso de uma combinação de mecanismos e/ou instrumentos, para substituir, refinar, estender ou complementar um esforço humano, na realização de uma determinada tarefa, em que pelo menos uma das operações envolvidas, é controlada, sem intervenção humana, através de um sistema de retroalimentação. Um sistema de retroalimentação, é definido como um mecanismo instrumental combinando elementos sensores e actuadores, os quais podem alterar o modelo de realização de determinada tarefa.

Ainda de acordo com a IUPAC, um sistema analítico automatizado é uma colecção de módulos analíticos de automatização e de instrumentos analíticos modulares configurados para automatizar uma análise completa, desde a entrada da amostra à saída de informação [24]. O sistema analítico contém uma interface para o usuário para permitir a interacção humana e pode também ter um módulo de arquivo para fornecer pesquisas posteriores.

Esta noção de automação conduz a uma distinção, bem evidente, entre sistemas automáticos e automatizados:

- (i) **Sistemas Automáticos:** sistemas sem capacidade de decisão, portanto sem sistema de retroalimentação, em que determinadas acções, incluídas num conjunto mais ou menos alargado de operações, são realizadas sequencialmente e de forma repetitiva, sem intervenção humana;
- (ii) **Sistemas Automatizados:** sistemas que são controlados ou regulados por sistemas de retroalimentação, sem intervenção de um operador. Estes sistemas são automonitorizados e autocontrolados, possuindo uma independência de actuação superior à dos sistemas automáticos.

Com o objectivo de evitar situações eventualmente ambíguas, derivadas do facto de por vezes ser difícil estabelecer com precisão os limites ou a fronteira entre sistemas automáticos e sistemas automatizados, utilizar-se-á indiscriminadamente a expressão sistemas automáticos, corrente na língua Portuguesa, para designar os sistemas analíticos (automáticos ou automatizados) cujo desenvolvimento contribui para minimizar a intervenção humana.

Na actualidade, em campos tão diversos como processos químicos industriais, meio ambiente ou biotecnologia, existe uma procura crescente de dados químicos, que idealmente devem ser obtidos em tempo real. Tal exigência provocou uma aceleração na investigação e desenvolvimento de métodos automáticos de análise, de onde resultou o aparecimento de diferentes metodologias e estratégias para a

execução de processos analíticos. Consequentemente, surgiram diferentes classificações das metodologias automáticas, sendo pouco consensuais. Neste trabalho adoptou-se a classificação proposta por Valcárcel e Luque de Castro [25]. Nesta classificação, os métodos automáticos dividem-se fundamentalmente em 3 grupos, em função do tipo de processamento de amostra: métodos descontínuos, robóticos e contínuos. De seguida, apresenta-se de uma forma resumida o que caracteriza cada uma destas categorias:

- i) Os métodos descontínuos dizem respeito a sistemas manuais que foram mecanizados, isto é, sistemas em que existe um mecanismo responsável pelo transporte dos recipientes com a amostra e introdução dos reagentes, e portanto todas as etapas que constituem o processo analítico. De salientar que cada amostra é mantida em recipientes separados onde se realizam os diversos processos analíticos, tais como diluições, adições de reagentes, misturas e aquecimentos. Cada amostra é encaminhada mecanicamente para um detector como por exemplo um espectrofotómetro ou um voltímetro, onde se realiza a medida da grandeza que vai ser relacionada com a concentração da espécie na amostra. Como resultado deste procedimento é obtido um conjunto de sinais discretos correspondendo cada um a uma das amostras introduzidas no instrumento automático.
- ii) Os métodos robotizados são essencialmente caracterizados por um braço mecânico que mimetiza as tarefas realizadas por um operador humano, mas com a vantagem de serem realizadas com maior rapidez e eliminando erros do operador. O braço mecânico é controlado por computador, sendo este também responsável pela aquisição e tratamento dos dados analíticos. O dispositivo mecânico pode exercer diversas funções, de acordo com as rotinas de programação, que podem ser adicionalmente de “aprendizagem” e/ou auto-programação. Alguns exemplos de automação laboratorial são bem conhecidos e incluem tituladores automáticos, colectores de amostras.

iii) Os métodos contínuos, em que a amostra ou amostras, são sucessivamente introduzidas num fluxo líquido ou gasoso, que pode ser reagente ou não, e que desde o ponto de introdução até à unidade de detecção, sofrem processos reactivos químicos ou físicos, que originam transições no sinal analítico. O fluxo é rejeitado à saída do sistema e o sinal fornecido pelo instrumento de medida é registado num instrumento conveniente. O sinal fornecido pelo instrumento de medida é do tipo contínuo, isto é, medido ininterruptamente em função do tempo, originando cada amostra um sinal transitório em forma de curva cujas características, geralmente a altura máxima, se relaciona com o parâmetro que se quer medir em cada amostra. Os requisitos exigíveis a analisadores para uma monitorização, desejavelmente devem englobar um reduzido consumo de amostra e reagentes, um elevado ritmo de amostragem, rapidez de análise, especificidade e selectividade mesmo quando as amostras são de matriz complexa, estruturação simples, fácil manutenção e possibilidade de automatização em todas as etapas da análise, desde a amostragem às medições e também calibrações periódicas. Ainda se inclui baixos custos de instalação, operação e manutenção, por influência da sua estrutura modular que lhe confere flexibilidade em situações de necessária reconfiguração para adaptação a novas aplicações analíticas. As metodologias de automatização que têm maior potencialidade para responder aos requisitos apresentados são os métodos em fluxo, especialmente os de fluxo contínuo.

O controlo de qualidade de formulações farmacêuticas é cada vez mais desafiante para os analistas químicos e requer procedimentos analíticos rápidos, mecanizados ou automatizados. Esse controlo pode incidir na determinação de um princípio activo (ou princípios activos) das formulações farmacêuticas, ou em estudos cinéticos da sua libertação dessas formulações. A possibilidade de adaptação, em alguns casos, dos métodos discretos, caracterizados por serem dispendiosos e demorosos, por métodos de análise em fluxo automáticos para a determinação de

uma determinada substância de interesse é sempre vantajoso. Consequentemente, o número de tais procedimentos desenvolvidos para aplicação farmacêutica está constantemente a aumentar. Em virtude da maioria dos fármacos serem compostos orgânicos, os métodos espectrofotométricos e de luminescência são os mais explorados como método de detecção acoplado a estes sistemas [23].

A espectrometria de absorção molecular é sem dúvida o método de detecção mais utilizado nos laboratórios analíticos devido à larga disponibilidade e acessibilidade dos instrumentos requeridos. O grande número de trabalhos realizados recorrendo a esta técnica de detecção é consequência da sua excelente flexibilidade na adaptação a uma grande variedade de problemas analíticos.

O interesse analítico nos métodos de quimioluminescência deriva do facto de ocorrer a formação de moléculas fluorescentes sem implicar a aplicação de irradiação prévia, evitando desta maneira diversos problemas derivados de dispersão da luz, excitação não selectiva ou instabilidade na intensidade da fonte de luz.

1.3. Métodos de Fluxo

Tal como se referiu anteriormente, os métodos de análise em fluxo são tradicionalmente definidos como baseados na introdução de uma alíquota de amostra num fluxo transportador, seja ele líquido ou gasoso, e que pode ser simultaneamente um reagente ou não, formando uma zona de amostra que é transportada até uma unidade de detecção, onde ocorre a medição de uma propriedade física ou química, relacionadas normalmente com a concentração, após reacção com um ou mais reagentes. No entanto, os métodos em fluxo podem

funcionar apenas como método de transporte da amostra até ao detector, sem que ocorra qualquer reacção, como ocorre em algumas metodologias de fluxo com sistemas de detecção por espectrofotometria de absorção atómica com atomização por chama.

Com a constante e crescente evolução tecnológica a acompanhar os desenvolvimentos na investigação em fluxo, surgiram novas técnicas que impuseram uma reclassificação dos métodos em fluxo, com inevitáveis ramificações [26].

Em continuação com a divisão dos métodos automáticos exposta anteriormente, os métodos contínuos de análise automática podem ser divididos em dois tipos gerais: métodos contínuos segmentados e métodos contínuos não segmentados.

Os métodos contínuos segmentados, que foram propostos pela primeira vez por Skeggs em 1957 [27], associam-se normalmente ao modo de funcionamento dos Autoanalisadores da firma Technicon que deteve durante muitos anos, em exclusivo, a comercialização destes instrumentos. Neste método as amostras são aspiradas sequencialmente e entre elas intercalam-se bolhas de ar que as separam (ou segmentam o fluxo). Este processo inclui na maioria dos casos um ciclo de lavagem. As bolhas de ar intercaladas no sistema são retiradas antes de atingirem o detector.

Os métodos contínuos não segmentados distinguem-se essencialmente do anterior nos seguintes aspectos: i) o fluxo não se encontra segmentado por bolhas de ar; ii) a amostra é injectada no sistema; iii) no momento da detecção não é alcançado nem o equilíbrio físico (homogeneização da amostra com os reagentes), nem existe (não tem necessidade de existir) o equilíbrio químico.

As metodologias de fluxo possibilitam automatizar facilmente e com baixo custo numerosas determinações analíticas. Ainda para mais, estas técnicas são rápidas, precisas e têm um custo de manutenção reduzido, apresentam baixos consumos de

amostras e reagentes (factor importante na perspectiva de Química Verde), minimizam os erros de operação e permitem realizar determinações múltiplas [2]. Outra característica a ressaltar é a sua possibilidade de miniaturização [28].

As metodologias em fluxo contínuo são as mais divulgadas na comunidade científica, porque representam um vasto leque de ferramentas que possibilitam eficazmente a automatização de processos de análise. Deste modo, estes métodos serão alvo de uma abordagem mais detalhada, no âmbito do trabalho desenvolvido.

1.3.1. Métodos de Fluxo Contínuo

É evidente que a constante evolução tecnológica provocou a ramificação da Análise em Fluxo. Após a realização de milhares de estudos e aplicações de Análise por Injecção em Fluxo, surgiu a metodologia Análise por Injecção Sequencial, depois a Multicomutação, a Multiseringa, seguido de *Lab-On-Valve*, e muito recentemente, a Multi-Impulsão.

Em seguida apresenta-se uma breve referência das metodologias de fluxo referidas acima, sendo a multicomutação e multi-impulsão apresentadas com maior desenvolvimento, por serem as estratégias de fluxo utilizadas na dissertação.

1.3.1.1. Análise por Injecção em Fluxo

Nas últimas décadas as potencialidades dos métodos de Fluxo Contínuo foram evidenciadas pelos milhares de trabalhos científicos publicados, incidindo estes na Análise por Injecção em Fluxo [29], muito embora na última década outras metodologias de fluxo tenham sido alvo de investigação e desenvolvimento. A Análise por Injecção em Fluxo (FIA) (Figura 1.1) surgiu face à necessidade de automatizar métodos de análise de rotina que exigiam uma frequência de amostragem elevada [30].

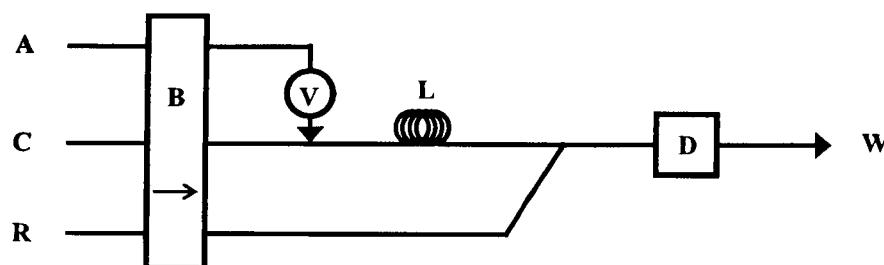


Figura 1.1

Montagem FIA convencional: A – amostra; C – solução transportadora; R – reagente; B – bomba peristáltica; V – válvula; L – reactor; D – detector; W – dreno.

De entre as metodologias automatizadas tem maior destaque a FIA, pois constituiu o ponto de partida para a utilização da automação em análises químicas por fluxo contínuo, dado que o que mais a distingue é o recurso a instrumentos e material de laboratório de muito fácil acesso, baixo custo e também

reprodutibilidade cada vez mais elevadas e, exactidão e precisão igualmente distintas.

Inclusivamente, apesar das potencialidades de todas as outras metodologias de análise em fluxo que lhe sucederam, a FIA continua a ser a mais usada, muito possivelmente por não requerer o recurso a equipamentos informáticos e electrónicos, assim como, conhecimentos de programação informática.

A FIA permitiu melhorar significativamente numerosas metodologias analíticas, especialmente em termos de manipulação e processamento das amostras, dado que revelou uma elevada capacidade de controlo reprodutível do volume de amostra introduzido no sistema, da mistura da amostra com os reagentes e dos tempos de desenvolvimento da reacção. Consequentemente, métodos analíticos clássicos, assim como, métodos recentemente desenvolvidos, nomeadamente cinéticos, enzimáticos ou com o uso de reagentes instáveis, foram fácil e rapidamente implementados em sistemas de análise em fluxo [21].

A metodologia FIA baseia-se na injeção de uma alíquota de amostra líquida, definida em função das dimensões da alça (loop) de amostragem do dispositivo de injeção, normalmente uma válvula rotativa ou um injector-comutador [31-33], numa solução transportadora ou reactiva, que flui continuamente. A zona de amostra, formada pela inserção de uma alíquota de amostra no fluxo transportador, é transportada até ao detector que continuamente regista um sinal. Durante o percurso para a detecção a amostra pode ser sujeita a um conjunto de reacções, que podem ser com a solução transportadora, ou pela adição, através de confluências, de distintas soluções com reagentes específicos que originam determinadas reacções químicas. De uma forma resumida, e com base na descrição da metodologia FIA, as suas funções são [34]:

- i) Actuar como um processo de transporte de amostras e padrões até ao instrumento de medida (por exemplo, um espectrofotómetro de absorção atómica

ou um detector electroquímico) quando os analitos possuem características físico-químicas que possibilitem a sua detecção;

ii) Possibilitar a implementação e execução de reacções químicas e a introdução dos seus produtos de reacção num instrumento de medida;

iii) Facilitar a implementação de técnicas de separação contínua não-cromatográficas (por exemplo, diálise, extracções líquido-líquido ou sólido-líquido, troca iónica, precipitação) como forma de incrementar a sensibilidade ou a selectividade;

iv) Possibilitar o desenvolvimento de processos de separação contínua baseados em reacções de derivatização, com o propósito de facilitar ou incrementar a transferência de massa e/ou a detecção.

Embora a injeção de um volume fixo e reprodutível de amostra, num fluxo transportador não segmentado, tivesse sido vital para a FIA, outros conceitos se mostraram igualmente como alicerces da FIA, nomeadamente a dispersão controlada – e a capacidade da sua manipulação para servir melhor os objectivos analíticos – e os tempos de reacção constantes e reprodutíveis, que possibilitaram o abandono das medições em estado estacionário, e consequentemente, trouxeram análises mais rápidas que as tradicionais em sistemas de fluxo contínuo segmentado, e também resultaram na redução do consumo de reagentes e amostra. Durante o transporte da zona de reacção até ao detector, ocorrem fenómenos de diluição, geralmente em ambas as suas interfaces, anterior e posterior, denominados de dispersão. Em paralelo com estes fenómenos de diluição podem ocorrer reacções químicas entre a amostra e reagentes. A dispersão, que é dependente da geometria e hidrodinâmica do sistema, origina um gradiente de concentrações variáveis ao longo do sistema analítico. Sendo a dispersão constante e reprodutível, assim como os restantes parâmetros físicos do sistema,

como por exemplo, tempo de residência e temperatura, não existe necessidade de aguardar pelo equilíbrio físico (homogeneização entre amostra e reagentes) e equilíbrio químico (reação química completa) para realizar a detecção e medição.

Os componentes básicos de um sistema de análise FIA são:

- i) Sistema de propulsão: responsável pelo transporte, por aspiração ou propulsão, da zona de reação e reagentes no sistema FIA; pode ser uma bomba peristáltica ou bomba de pistão;
- ii) Sistema de inserção de amostra: equipamento que introduz a amostra no fluxo transportador, sem o interromper, e que pode ser, por exemplo, uma válvula rotativa ou um injetor-comutador;
- iii) Sistema de transporte: é o sistema de tubos através dos quais circulam os líquidos, e que podem ser de teflon (PTFE) ou polipropileno, e com diâmetros internos diversos. Englobam os reactores, que podem estar empacotados com reagentes (enzimas imobilizadas ou reagentes em fase sólida, por exemplo), ou incluir câmaras de mistura ou módulos separativos;
- iv) Sistema de detecção: responsável pela transdução de um sinal analítico durante a passagem da zona de reação, e que pode ser um espectrofotómetro, um espectrofluorímetro, um detector electroquímico, etc;
- v) Sistema de aquisição e registo dos dados: um registador ou um microcomputador, que recebe os sinais analíticos fornecidos pelo detector.

A metodologia FIA originou não só a possibilidade de executar os procedimentos analíticos convencionais de um modo mais simples, rápido e inovador, mas, mais importante, em virtude da sua versatilidade permitiu realizar procedimentos analíticos, que no tempo eram difíceis ou impossíveis de executar, de um modo robusto. Neste contexto, inclui-se métodos baseados na exploração dos gradientes de concentração criados pela injeção da amostra, e também métodos em que são

gerados constituintes transitórios e metastáveis, ou onde o próprio sinal analítico é transitório dada a sua natureza, como por exemplo em procedimentos baseados em medidas químio ou bioluminométricas [21]. Este tipo de ensaios era de muito difícil execução, porque a cinética envolvida nas reacções químicas com o resultado de emissão de energia na forma de luz é geralmente rápida, mas com o surgimento da metodologia FIA, tornou-se mais praticável o relacionamento da luz emitida com a concentração, e deste modo, a exploração destes procedimentos para ensaios quantitativos [25].

Deste modo, além de uma elevada capacidade adaptativa a objectivos específicos, é de realçar a facilidade com que se podem integrar dispositivos que realizem um pré-tratamento, como por exemplo, separativo ou de concentração, da amostra injectada [21]. Com esta acção pretende-se geralmente aumentar a selectividade e sensibilidade da análise. As estratégias são diversas e incluem módulos de diálise, de difusão de gases, extracção com solventes, extracção em fase sólida, reactores tubulares, etc.

Em virtude da facilidade de manipulação da zona de amostra e da zona de reacção num sistema FIA, ocorreu também um desenvolvimento paralelo de técnicas associadas como a paragem de fluxo, a técnica *sandwich* e técnicas de gradiente [35].

A vantagem mais imediata resultante da aplicação de uma paragem de fluxo [36] é o aumento dos tempos de reacção sem necessidade de alterar as dimensões dos reactores, ou alterar os caudais, e portanto, sem aumentar os fenómenos de dispersão. Deste modo, recorrendo a esta técnica consegue eliminar-se o ruído de fundo (porque permite eliminar problemas associados com a fraca mistura dos reagentes, com o consequente aumento do sinal analítico), ou realizar análises baseadas em metodologias cinéticas, ou aumentar a sensibilidade de uma técnica. Adicionalmente, pelo facto de esta técnica possibilitar a optimização da mistura

das soluções, ocorre uma diminuição do consumo de reagente em relação ao método contínuo. No entanto, o recurso à paragem de fluxo provoca uma elevada diminuição do ritmo de amostragem, e implica a utilização de um controlo do sistema que faculte tempos de paragem reprodutíveis, como por exemplo, através de um controlo computadorizado.

A técnica *sandwich* [37] baseia-se na inserção de uma alíquota de amostra entre dois reagentes diferentes, de modo que para um volume elevado de amostra e em condições optimizadas se possa obter duas interfaces de reacção distintas, que correspondem a dois sinais analíticos separados, e portanto, a uma análise biparamétrica. Com base neste conceito, deduz-se as possibilidades de utilização, quer para a determinação simultânea de dois analitos, quer para a análise simultânea da amostra em duas zonas de concentração diferentes.

Nas técnicas de gradiente ocorre uma exploração dos gradientes de concentração originados pelos fenómenos de dispersão na zona de amostra. Os gradientes de concentração são uma característica da análise em fluxo, produzida pelos tempos reprodutíveis e dispersão controlada da amostra. A reprodutibilidade de pontos individuais de concentração ao longo do gradiente é tão preciso quanto a altura dos sinais analíticos (picos).

1.3.1.2. Análise por Injecção Sequencial

Com a aplicação crescente da Análise por Injecção em Fluxo em diversas determinações químicas, surgiram novas necessidades aquando da implementação de análises químicas mais complexas, que envolviam o uso de um número elevado de reagentes, procurando contudo a simplificação das montagens

analíticas. A Análise por Injecção Sequencial (SIA) [38] surgiu para colmatar as deficiências de autonomia, robustez, simplicidade e versatilidade apresentadas pela metodologia FIA, e caracteriza-se por um elevado grau de flexibilidade nas análises que envolviam um número relativamente elevado de reagentes, sem ser necessário a reconfiguração da montagem de fluxo [39].

Salienta-se que o seu aparecimento e desenvolvimento foram facilitados pela proliferação de computadores e pela possibilidade do seu interfaceamento com unidades de propulsão e com as válvulas automáticas, que são os componentes cruciais para a sua implementação [40].

Um sistema de fluxo baseado na metodologia SIA, quando comparado com um sistema FIA, partilha de quase os mesmos componentes. Um sistema SIA básico (Figura 1.2) é constituído por um dispositivo propulsor bidireccional, um reactor de armazenagem, uma válvula selectora multiposição, um detector, tubagem adequada para unir os diferentes componentes do sistema, e um microcomputador. Este componente possibilita o controlo sincronizado do dispositivo de propulsão e da válvula selectora multiposição, de modo a definir o volume e direcção de escoamento das diferentes soluções.

Deste modo, a mais relevante diferença entre FIA e SIA reside no facto de que no caso de SIA o sistema de injecção é constituído por uma válvula selectora multiposição, com controlo automático. A válvula selectora multiposição é constituída por diversas portas laterais e uma porta central. O seu funcionamento consiste no acesso alternativo de cada porta lateral à porta central, e portanto, o número de posições possível depende do número de portas laterais.

A colocação do sistema de propulsão, geralmente uma bomba peristáltica, no percurso do canal central da válvula selectora, permite o acesso à amostra, dreno, solução de lavagem, reagentes, canal de reacção e detector, apoiados em cada uma das várias portas laterais da válvula rotativa multiposição.

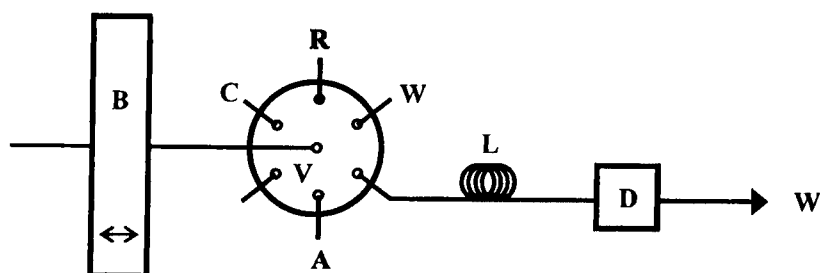


Figura 1.2

Montagem SIA convencional: A – amostra; C – solução transportadora; R – reagente; B – bomba peristáltica; V – válvula multiposição; L – reactor; D – detector; W – dreno.

Num sistema de fluxo SIA um determinado volume de amostra é aspirado para uma alça, suficientemente longa para evitar o contacto das soluções com o sistema de propulsão. As restantes soluções são aspiradas do mesmo modo, sob controlo temporizado. Para efectuar o transporte da zona de amostra em direcção ao detector, ocorre a inversão da direcção do fluxo, característica dominante da metodologia SIA, e que incrementa os fenómenos de mistura entre a amostra e reagentes. Deste modo, em SIA o escoamento das soluções não se processa sempre na mesma direcção.

Embora a SIA possibilite intervenções na zona de amostra em muito idênticas à metodologia FIA, possuindo por isso funções idênticas às de FIA, a sua principal diferença funcional, nomeadamente a configuração estrutural das montagens analíticas e a inserção temporizada das amostras e reagentes, conferem-lhe potencialidades analíticas [41], vantajosas em relação à FIA (em FIA, na grande maioria dos casos, a amostragem é feita na base de “volume fixo”). Destaca-se a implementação de reacções mais complexas, contudo, envolvendo montagens analíticas mais simples, apesar da utilização de um número elevado de soluções químicas; produção de um menor volume de resíduos indesejáveis, devido ao

consumo inferior de reagentes e amostra, porque tradicionalmente nestes sistemas deixa de ser necessário um fluxo permanente de solução transportadora e também porque os reagentes e amostras são utilizados de uma forma mais eficiente, já que só os volumes estritamente necessários são processados; e, uma maior flexibilidade operacional com o controlo temporizado, contudo, mais versátil do volume de soluções.

A facilidade com que os parâmetros experimentais podem ser alterados e controlados pelo computador, o conhecimento dos perfis dos caudais e a selecção criteriosa do binómio tempo/caudal utilizando apenas uma unidade propulsora, tornam estes sistemas simples, robustos, estáveis a longo prazo e com poucas exigências de manutenção. A simplicidade de configuração é uma das suas características, não requerendo grandes reconfigurações físicas sempre que se altere a determinação analítica, ou as condições em que esta é realizada. Assim, qualquer alteração das condições experimentais, como por exemplo, volume de injeção, tipo de reacção, diluição de amostra, relação reagente/amostra, é conseguida através de uma alteração das instruções introduzidas no computador. Deste modo, ao contrário das complexas montagens FIA, não há necessidade de reconfiguração física do percurso das soluções.

No entanto, uma válvula multiposição é substancialmente mais dispendiosa que a válvula convencional de FIA, conferindo um custo muito elevado aos sistemas SIA, que também não podem ser controlados por meios manuais, necessitando por isso, de dispositivos controladores e computacionais. A activação de uma válvula SIA é efectuada através de um dispositivo com um circuito integrado para controlo, e que por sua vez pode ser controlado por computador, por intermédio de uma aplicação informática desenvolvida para tal efeito.

A grande desvantagem apontada, em relação à metodologia FIA, é a redução dos ritmos de determinação em cerca de 30% a 50%, pois o tempo requerido para a

análise de uma determinada amostra é resultado não só do tempo de reacção e de medida, mas também do tempo consumido na aspiração das diferentes soluções.

1.3.1.3. Multicomutação

1.3.1.3.1 Conceitos gerais

A multicomutação surgiu na última década, como estratégia para determinações analíticas, como consequência de uma evolução do conceito de comutação em análises em fluxo. A comutação pressupõe a existência de dois estados e sua alternância. Em multicomutação o uso de um dispositivo injector (embora, se possa recorrer a vários dispositivos) consistindo numa válvula electromecânica activada por um solenóide, passível de automatização e controlo computadorizado, para a inserção de amostra e reagente, tornou possível o desenvolvimento de sistemas de fluxo equiparados a redes de análise (Figura 1.3) [42].

Os sistemas de multicomutação possuem como principal característica uma grande rapidez de comutação em determinados pontos num sistema de análise. A versatilidade de opções de comutação em diversos locais num sistema analítico, assim como, a sua velocidade de variação de estados, permitiram o desenvolvimento de uma nova estratégia de inserção de amostra e reagente denominada amostragem binária [43]. As elevadas frequências de comutação das válvulas solenóides confere de imediato uma vantagem, relativamente aos outros dispositivos de injeção, em termos de procedimento de inserção de amostra e

reagentes, o que pode ser facilmente alterado e ajustado com base num controlo temporizado.

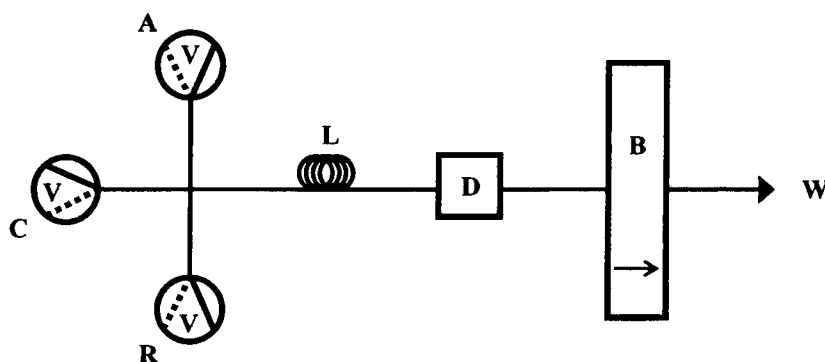


Figura 1.3

Montagem multicomutada convencional: V – válvula solenóide; A – amostra; C – solução transportadora; R – reagente; L – reator; D – detector; B – sistema de propulsão; W – dreno.

A amostragem binária (Figura 1.4) consiste na intercalação de pequenas alíquotas de amostra (da ordem dos μL) com pequenas alíquotas de reagente, definidas em função de um controlo temporizado de abertura e fecho da válvula em combinação com um caudal de aspiração das soluções, o que proporciona uma mais rápida homogeneização da zona de amostra e por isso um mais rápido desenvolvimento da reacção, quando em comparação com sistemas que se baseiam unicamente na dispersão de grandes volumes de amostras e reagentes. Contudo, em multicomutação continua a haver uma componente de difusão na mistura de soluções.

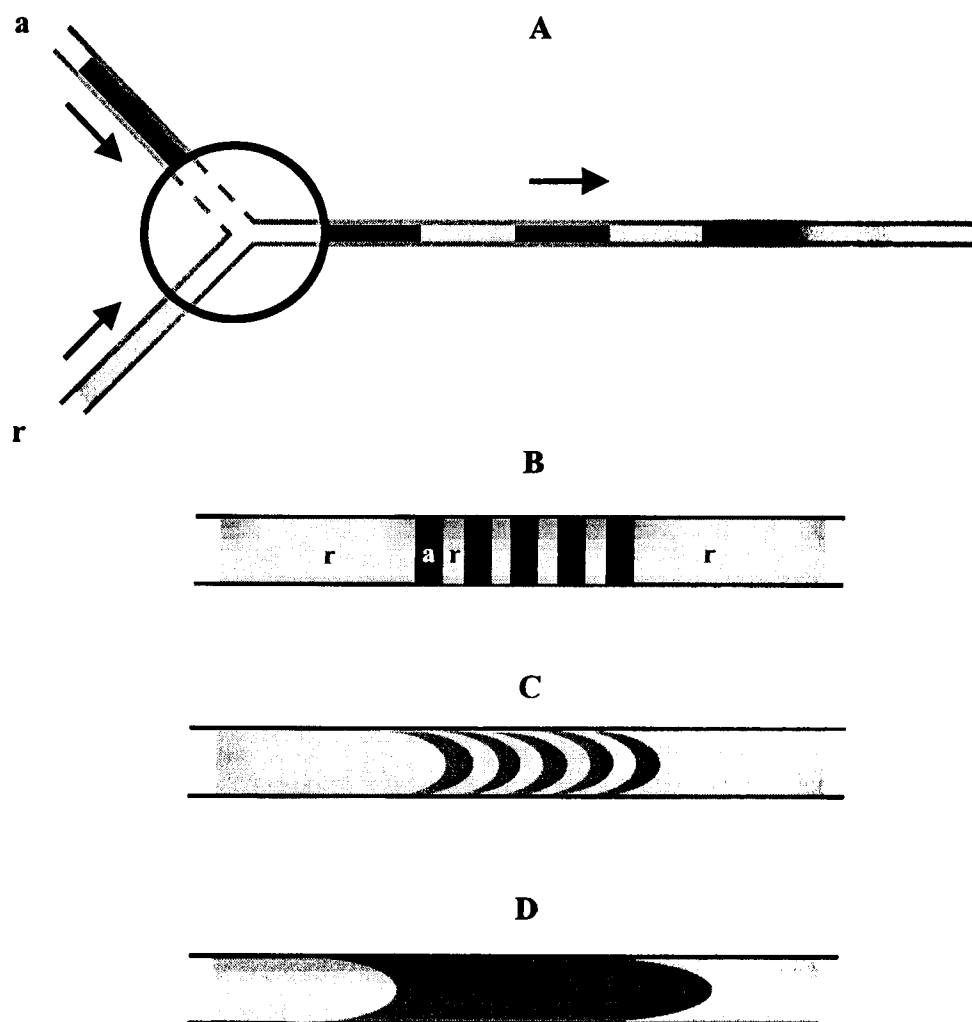


Figura 1.4

Amostragem binária: a – amostra; r – reagente.

- (A) – válvula solenóide e amostragem binária;
- (B) – intercalação de pequenos segmentos de amostra alternados com segmentos de reagente;
- (C) – mistura das duas soluções durante a fase de transporte;
- (D) – homogeneização da zona de amostra.

Este conceito de inserção de soluções em multicomutação proporciona mais uma vantagem face aos sistemas FIA: a reacção química, para produção do composto a detectar, pode ter início durante a fase de amostragem. Em FIA, o reagente é

adicionado à amostra após inserção desta no percurso analítico, não sendo por isso o intervalo de amostragem aproveitado para desenvolvimento da reacção [43].

A multicomutação permite uma simplificação das montagens e redução do consumo dos reagentes quando as soluções são aspiradas, através da colocação do dispositivo propulsor após o detector, visto que deste modo as soluções são aspiradas para um canal único em direcção ao detector. Este procedimento é original e ainda hoje predomina nas montagens referidas na literatura. No entanto, a estratégia de aspiração das soluções aumenta a probabilidade de ocorrência de bolhas de ar, devido às pressões inferiores que surgem no interior do sistema analítico.

O transporte das soluções por impulsão através da colocação da unidade propulsora antes das válvulas solenóides implica que para cada solução exista um canal de impulsão, como sucede quando se utiliza uma bomba peristáltica, por exemplo. Desta forma, ocorre inevitavelmente um aumento da complexidade da montagem analítica dado que existe um maior número de canais de transporte para gerir, e por isso, também aumenta a probabilidade de ocorrência de erros nas determinações devido ao aumento do número de tubagens envolvidas. Também os volumes de soluções envolvidos numa montagem em que os fluidos são impulsados através de uma bomba peristáltica são necessariamente maiores do que os volumes envolvidos quando se aspiram as soluções, porque a impulsão com bomba peristáltica implica uma circulação constante dos líquidos. No entanto, esse consumo pode ser reduzido através da recirculação das soluções, o que também contribui para um aumento da complexidade da montagem analítica. Salienta-se contudo, que o recurso à impulsão dos fluidos limita acentuadamente o aparecimento de bolhas de ar, porque dentro das tubagens as pressões são positivas.

A multicomutação constitui uma alternativa a outras metodologias de fluxo, como por exemplo, sistemas baseados em SIA. Em multicomutação, quando se utiliza válvulas solenóides, é de referir o inferior custo de cada válvula de comutação (unidade de injeção), e a associada optimização dos recursos utilizados, dado que uma válvula solenóide pode ser responsável pela introdução em fluxo de uma ou duas soluções, permitindo deste modo uma adaptação do número de válvulas solenóides consoante o número de reagentes do sistema químico. No caso de sistemas SIA há por vezes canais da válvula selectora multiposição que não são utilizados resultando no seu sub-aproveitamento, sendo ainda o custo das mesmas, muito superior.

No entanto, a longo prazo uma válvula selectora multiposição revela-se mais duradoura em virtude da sua superior robustez, podendo resultar num custo de manutenção inferior ao da utilização de válvulas solenóides de comutação, pois estas são mais susceptíveis a falhas consoante a sua utilização.

Por outro lado, as válvulas solenóides permitem obter frequências muito elevadas de comutação, devido às suas características funcionais, possibilitando a realização da amostragem binária, que resulta numa mais rápida homogeneização amostra/reagente com inferior dispersão. As válvulas multiposição possuem velocidades de rotação, entre canais sequentes, inferiores às de comutação das válvulas solenóides, repercutindo tal facto operacional na impossibilidade de realização de amostragem binária, assim como de comutação célere da solução ou percurso pretendido. Até recentemente (2002), tal impossibilidade de amostragem binária pelas válvulas multiposição era agravada pela unidireccionalidade de rotação das válvulas, o que implicava uma rotação completa da válvula para regressar ao mesmo canal de partida. Actualmente, já se encontram disponíveis válvulas selectoras multiposição bidireccionais.

Possíveis desvantagens dos sistemas de análise por multicomutação estão fundamentalmente associadas com as características operacionais das válvulas solenóides. Destacam-se a inferior robustez e pressões de trabalho inferiores: as válvulas solenóides utilizadas nesta dissertação apresentam uma pressão máxima de trabalho de 30 psi, embora o mesmo fabricante disponibilize válvulas que permitem trabalhar a pressões de 60 psi. A inferior robustez das válvulas solenóides origina a longo prazo custos superiores de manutenção, embora no caso de um sistema de multicomutação seja possível a substituição de uma válvula, sem afectar a restante montagem, sendo que em SIA a substituição da válvula selectora multiposição acarreta imediatamente um custo bastante superior, além de afectar toda a montagem analítica.

Em conclusão, através da combinação de um conjunto de características operacionais muito vantajosas, como por exemplo, a simplicidade das montagens analíticas e seu funcionamento, e o conceito de inserção de amostra por amostragem binária, a multicomutação possibilita os meios para atingir um desenvolvimento rápido da reacção, baixo consumo de reagentes e uma variedade alargada de intervenções sobre a zona de amostra sem implicar modificações na configuração da montagem. Estas capacidades podem ser aperfeiçoadas através da utilização em simultâneo de uma metodologia de amostragem baseada em tempo, que permite a selecção do volume de amostra mais apropriado, e a implementação de estratégias analíticas complementares, como por exemplo, amostragem de zonas ou recirculação de amostra, o que assegura um controlo efectivo da dispersão de amostra e possibilita a execução de diluições numa vasta gama que pode ser ajustada de acordo com a concentração da amostra, mas também proporciona um intervalo alargado para as determinações.

1.3.1.3.2. Evolução da Multicomutação

Em 1985, Rothwell e Woolf [44] realizaram um trabalho com a aplicação de uma válvula solenóide miniaturizada (Figura 1.5), com controlo por um circuito temporizador. Deste modo, foi possível a realização de injeções reprodutíveis de volumes variáveis de amostra, com base num controlo de tempo. Os autores efectuaram ensaios comparativos entre a utilização da válvula solenóide e a utilização de uma válvula rotativa convencional. Naquela época, com as válvulas rotativas convencionais, a introdução de um determinado volume de amostra no sistema era função das dimensões do reactor de amostragem utilizado, e para alterar o volume de amostra introduzido exigia uma alteração física das dimensões do reactor de amostragem. Com a válvula solenóide de 3 vias, e controlada por um circuito temporizador, o volume de amostra era definido em função do tempo de abertura da válvula e do caudal, sendo este último controlado por uma bomba peristáltica, que impulsionava a amostra para um fluxo transportador. Concluíram os autores, a partir dos resultados de ensaios de determinação do fosfato pelo método do azul de molibdénio, que a válvula solenóide apresentava um desempenho semelhante ao de uma válvula rotativa convencional, mas com um ritmo de amostragem superior embora com inferior reprodutibilidade. A reprodutibilidade da etapa de amostragem nestas situações depende da sincronização dos pulsos das bombas peristálticas com as comutações das válvulas solenóides.

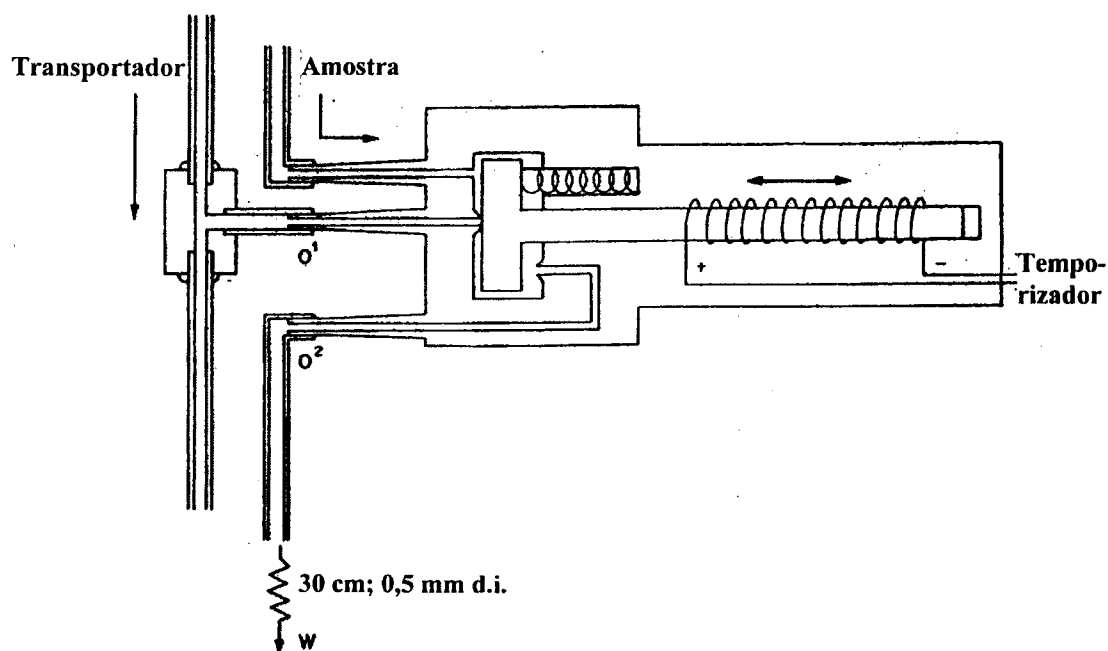


Figura 1.5

Injetor de válvula solenóide. Solenóide desactivado – O^1 fechado; solenóide activado – O^2 fechado. Adaptado de [44].

Em 1987, Malcolm-Lawes *et. al.* [45] com o intuito de aumentar a versatilidade dos sistemas FIA, propuseram a aplicação de válvulas solenóides de 3 vias (Figura 1.6) (com uma construção diferente da utilizada por Rothwell *et. al.*), para o controlo da solução transportadora e para promover a mistura de reagentes. A propulsão das soluções foi efectuada por intermédio de um gás sobre pressão e o accionamento das válvulas dependia de um controlo temporizado.

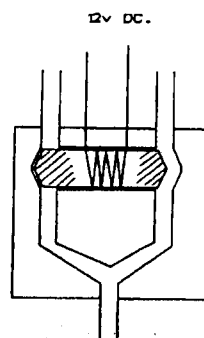


Figura 1.6

Estrutura das válvulas solenóides. Quando é aplicada corrente, o pistão representado a sombreado, move-se para a direita. Adaptado de [45].

No ano seguinte, Malcolm-Lawes e Pasquini [46] resolveram expandir a aplicabilidade destes dispositivos, e propuseram um sistema automático igualmente baseado num transporte dependente de gás sobre pressão, mas de forma a permitir a preparação em linha de reagentes com tempos de vida curtos e ainda a análise sequencial de analitos (Figura 1.7).

Estas inovadoras potencialidades analíticas deviam-se à possibilidade do accionamento alternado de grupos de válvulas solenóides, dispostas no sistema de modo a permitir a preparação dos reagentes, antes do contacto com as amostras. O accionamento das válvulas, controlado por um microcomputador, permitia atingir frequências de 20 Hz, o que originava uma eficiente mistura dos reagentes, porque tais frequências de comutação possibilitavam a mistura de pequenas alíquotas de soluções de reagentes, dependendo o volume das alíquotas também do caudal utilizado. De acordo com a Figura 1.7 a aspiração, através de uma seringa automática de um volume único de amostra ocorria numa zona diferente da montagem analítica onde ocorria a preparação dos reagentes, permitindo deste

modo, primeiro a preparação do reagente de tempo de vida curto, e posteriormente a sua mistura com a solução de amostra aspirada.

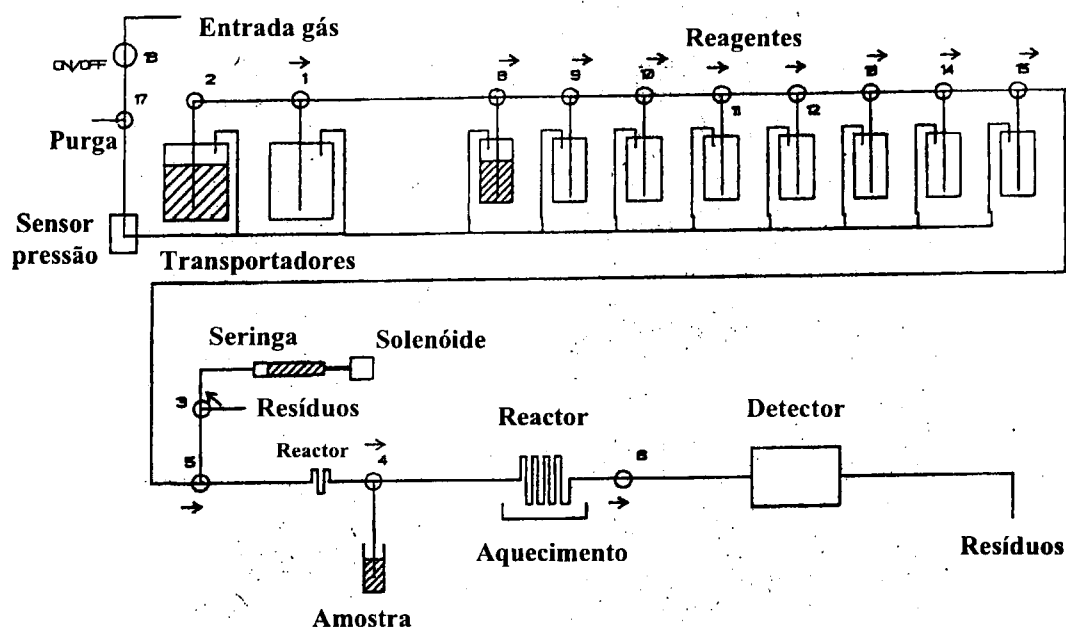


Figura 1.7

Montagem de fluxo representando as diversas interligações entre as válvulas accionadas por computador. As setas indicam os caminhos normalmente abertos das válvulas. Adaptado de [46].

O sistema analítico desenvolvido apresentou uma precisão, sensibilidade e reprodutibilidade semelhante ao de um sistema FIA convencional, embora com a vantagem de requerer volumes inferiores de amostra e reagentes para cada análise. Rocks, em 1989 [20], desenvolveu uma metodologia multianálise, tendo por base um sistema de Análise em Fluxo Com Dispersão Controlada [47], aperfeiçoado pelo recurso a válvulas solenóides de 3 vias controladas por microprocessador, que expandiram as potencialidades do sistema para a análise de múltiplos analitos.

Este sistema multianálise possibilitava, deste modo, a execução de diferentes determinações em amostras clínicas, através da inserção por aspiração, de diferentes reagentes.

Em 1991, Pasquini e Faria [48], desenvolveram um módulo de injeção de amostras em sistemas FIA, constituído por 3 válvulas solenóides (Figura 1.8). Este dispositivo, era controlado automaticamente, por um circuito temporizador, e permitia a amostragem de volumes de 20 a 300 μL , sendo a limitação do volume máximo definido pelo comprimento do tubo colocado entre duas válvulas e que funcionava como canal de amostragem.

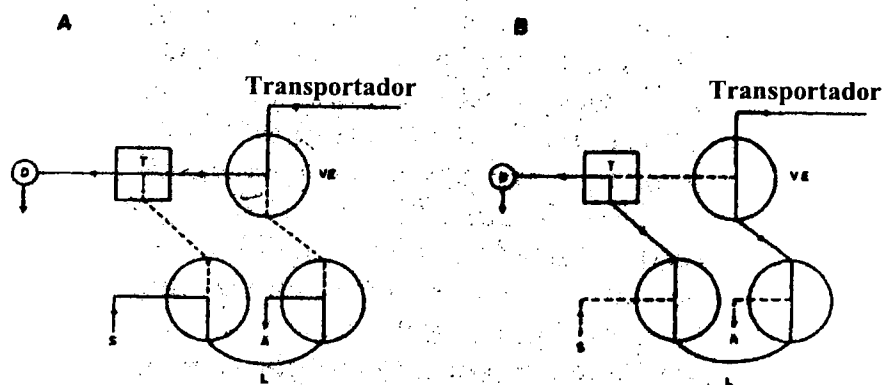


Figura 1.8

Diagrama do dispositivo de introdução da amostra. D – detector; T – confluência; VE – válvulas electromecânicas de 3 vias; S – entrada de amostra; L – alça de amostragem; A – aspiração de amostra. A – modo de amostragem, válvulas activadas; B – modo de injeção, válvulas desactivadas. Adaptado de [48].

Em 1992, Reis *et al.* [49] propuseram um sistema de análise direccionado para o manuseamento em fluxo das amostras e reagentes. O sistema de fluxo (Figura 1.9) podia assumir diferentes configurações, essencialmente devido à combinação de um injector-comutador e válvulas solenóides, controladas por um microcomputador. A disposição das válvulas solenóides e o seu accionamento selectivo no sistema de fluxo proporcionava múltiplas opções de manuseamento da zona de amostra, como por exemplo: confluência de zonas, amostragem de zonas, fluxo intermitente, injeções sequenciais, retenção de zonas e paragem de fluxo. Com base em procedimentos de diluições em linha, e no método das adições, realizaram determinações simultâneas em amostras vegetais digeridas, com detecção por espectrofotometria de emissão atómica em plasma.

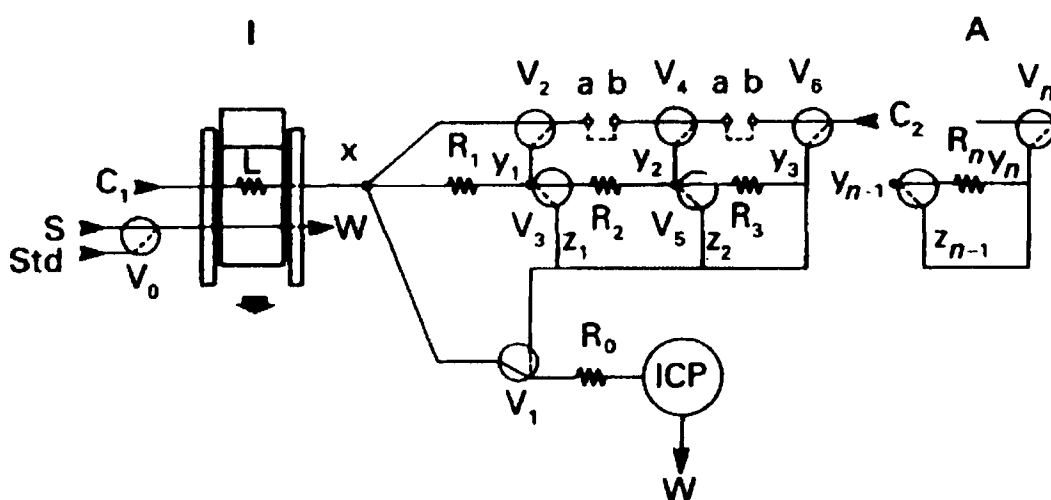


Figura 1.9

Montagem de fluxo modular. I – Injetor-comutador; V – válvulas solenóides de 3 vias; R – reagentes; L – alça de amostragem; ICP – ICP-AES; a, b – entradas alternativas; x, y, z – pontos de confluência; C – solução de transportador; S – solução de amostra; Std – soluções de padrões; w – dreno. Adaptado de [49].

Hara *et al.*, em 1993 [50], desenvolveram um sistema de fluxo com detecção potenciométrica (Figura 1.10), que denominaram de Analisador Potenciométrico de Alta Velocidade (*"High Speed Potenciometric Analyser – HSPA"*). Esta montagem exibiu tempos entre 1,2 e 1,3 segundos, para a análise individual de amostras de cloreto, tendo como detector um eléctrodo selectivo ao ião cloreto. Tais elevados rendimentos deveram-se em grande parte à aplicação de válvulas solenóides de 3 vias e também de 2 vias, que possibilitaram a rápida comutação do percurso analítico, e da solução padrão e amostra, sem paragem de funcionamento do sistema.

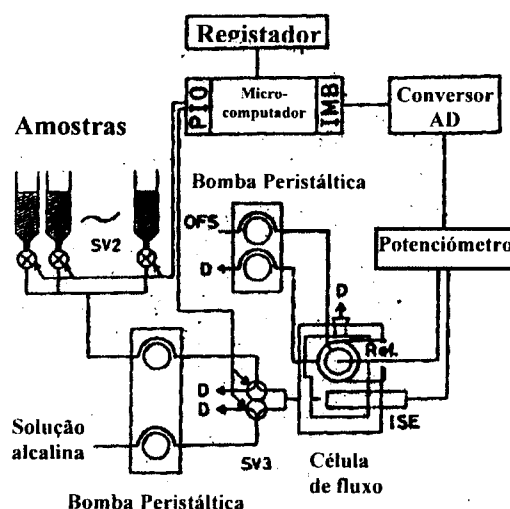


Figura 1.10

Montagem do analisador potenciométrico de alto rendimento. SV2 – válvulas solenóides de 2 vias; SV3 – válvulas solenóides de 3 vias; OFS – solução de enchimento exterior; D – dreno; PIO – placa de interface I/O programável; IMB – placa de interface e de memória. Adaptado de [50].

Em 1994, consolidou-se a utilização das válvulas solenóides com o aparecimento de uma nova estratégia de manuseamento de amostra e introdução de reagentes, em que, Reis *et al.* [43] designaram de multicomutação. Este trabalho envolveu a utilização das válvulas solenóides como dispositivos activos para a selecção do caminho analítico de entre vários, e também, como intervenientes no manuseamento de soluções, devido a cada válvula constituir um comutador independente, possibilitando a criação de uma rede de fluxo (Figura 1.11).

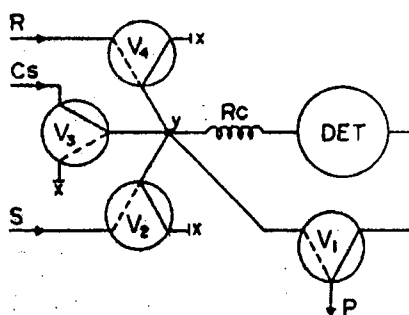


Figura 1.11

Montagem de fluxo para a determinação espectrofotométrica de ferro. V_1 a V_4 – válvulas solenóides de 3 vias; DET – detector; Rc – reator; Cs – transportador; R – reagente; S – amostra; x – canal obstruído; y – ponto de confluência; P – ligação à bomba peristáltica. Adaptado de [43].

Tendo como base a característica de comutadores independentes, foi então desenvolvido o conceito de amostragem binária. Este conceito pode ser concretizado recorrendo a uma válvula solenóide, sendo que a cada entrada da válvula corresponde uma solução, ou então, a duas válvulas solenóides (Figura 1.11), em que cada uma possui um canal obstruído. Esta última situação descrita, que envolve a utilização de válvulas solenóides com canais obstruídos, foi

utilizada inicialmente pelos autores do conceito de multicomutação (por motivos de maior simplicidade na programação para controlo do sistema), embora actualmente se recorra com mais frequência à situação em que se utiliza uma válvula solenóide para comutação entre duas soluções.

Verificou-se então, que a comutação das válvulas numa frequência elevada, isto é, com tempos de comutação muito curtos, possibilitava a obtenção de uma mistura homogénea de duas soluções, constituída por muito pequenas alíquotas, sendo o volume destas, no entanto, dependentes do caudal utilizado. Esta zona de amostra pode, deste modo, ser vista como um grupo de porções adjacentes de soluções que sofrem um processo rápido de mistura, enquanto são deslocadas pelo canal analítico. Para um volume total e constante de amostra e reagente, o grau de mistura é ampliado pelo decréscimo dos volumes das alíquotas e pelo aumento do número dessas porções. A inserção de n pares de alíquotas de amostra e reagente significa que existem $2n-1$ interfaces, nas quais a mistura ocorre por dispersão axial. Por contraste a muitos sistemas de fluxo, os processos de interacção entre amostra e reagente nas interfaces tem início já na fase de amostragem, provocando um aumento do tempo de residência médio sem que seja afectado o ritmo de amostragem.

Este trabalho deu início a uma série de publicações com o intuito de explorar, desenvolver e projectar o conceito de multicomutação na área da análise em fluxo. Martelli *et. al.* [51], em 1995, usaram a metodologia de multicomutação associada a amostragem binária, para estenderem as potencialidades da nova metodologia a multi-determinações analíticas, isto é, a determinação de dois analitos e o uso de mais que um reagente. Nesse trabalho desenvolveu-se dois sistemas de multicomutação, um para a determinação de níquel com uma topologia em linha (Figura 1.12) das válvulas solenóides, e outro que com uma disposição em estrela (Figura 1.13) permitiu a determinação de ferro (III) e crómio (VI).

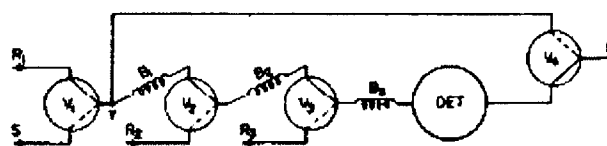


Figura 1.12

Montagem de fluxo para a determinação de níquel, numa configuração em linha. V_1 a V_4 – válvulas solenóides de 3 vias; B_1 a B_3 – reactores; DET – detector; S – amostra; R_1 a R_3 – reagentes; P – ligação à bomba peristáltica. Adaptado de [51].

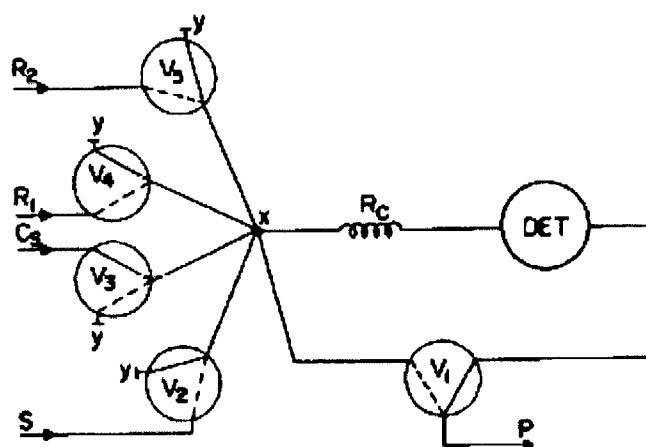


Figura 1.13

Montagem de fluxo para a determinação de ferro e crómio, numa configuração em estrela. V_1 a V_5 – válvulas solenóides de 3 vias; R_c – reactor; DET – detector; S – amostra; Cs – transportador; R_1 e R_2 – reagentes; P – ligação à bomba peristáltica. Adaptado de [51].

Evidenciou-se o potencial da mistura binária de reagentes e amostras, traduzido numa mais rápida homogeneização, boa precisão e exactidão, baixo consumo de

reagentes e ritmos de amostragem de 60 e 110 determinações por hora, para cada um dos sistemas, respectivamente.

Ainda em 1995, Araújo *et. al.* [52] prosseguem a série de trabalhos em multicomutação, com o desenvolvimento do um trabalho (Figura 1.14) em que foi explorado uma nova estratégia de amostragem de zonas, para a execução de elevadas diluições em linha. A amostragem de zonas efectuada num único canal analítico e associada com a técnica de paragem de fluxo foi aplicada à determinação espectrofotométrica da creatinina em amostras de urina, com base num método cinético. Uma vez mais, a multicomutação permitiu que as potencialidades da amostragem de zonas e paragem de fluxo fossem expandidas, com o acréscimo de uma simplificação da montagem analítica. O método cinético, derivado da reacção de Jaffé's, quando aplicado à análise de urina implica elevadas diluições das amostras, e sendo assim, a montagem analítica desenvolvida era constituída por três válvulas solenóides em configuração linear, e dois canais transportadores de solução: um canal para efectuar a diluição da amostra de urina, por amostragem temporizada da porção mais terminal e mais dispersa da zona de amostra, sendo rejeitada a porção remanescente; o segundo dedicado para realizar a paragem da zona de amostra, num banho aquecido, com o objectivo de incrementar o tempo de reacção e por conseguinte a sensibilidade da determinação.

É de salientar que a independência de execução destas duas fases de análise foi proporcionada pela multicomutação, devido à sua intrínseca versatilidade e elevado controlo na direccionalidade do fluxo. Tais características possibilitaram outra opção de amostragem de zonas, na sequência de uma única inserção de amostra e sem afectar negativamente o ritmo de amostragem: uma determinada zona de amostra era seleccionada para detecção, a qual por sua vez era seccionada transversalmente em duas porções, a anterior, encaminhada directamente para a

detecção, e a posterior, sujeita a uma paragem de fluxo para incremento do tempo de reacção.

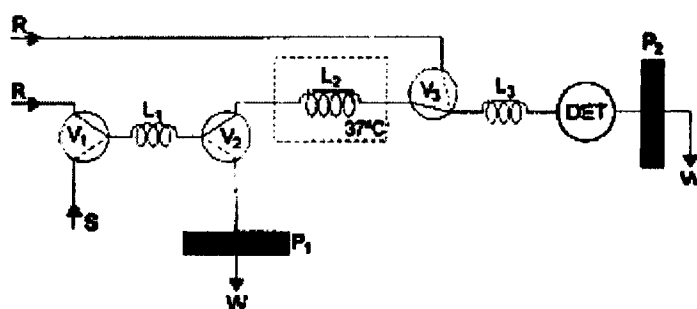


Figura 1.14

Montagem de fluxo para a determinação de creatinina. P_1 e P_2 – bombas peristálticas; V_1 a V_3 – válvulas solenóides de 3 vias; L_1 a L_3 – reatores; S – amostra; DET – detector; W – dreno; rectângulo preto – banho de água; setas – direcção do fluxo. Adaptado de [52].

Em 1996, é realizado por Oliveira *et. al.* [53] outro trabalho da série de artigos relativos à multicomutação na análise em fluxo. Este trabalho consistiu num sistema de divisão de fluxo para a determinação simultânea de cobre e zinco em plantas por espectrofotometria na zona do visível, em que as duas secções resultantes da divisão da zona de amostra foram sujeitas a dois tempos de residência diferentes, o que permitiu a determinação das concentrações de cobre e zinco em função das suas distintas cinéticas de reacção (Figura 1.15). A montagem de fluxo envolveu cinco válvulas solenóides, e as soluções de amostra e reagente eram impulsionadas e não aspiradas, através de uma bomba peristáltica.

A fase de amostragem era temporizada, e ficou demonstrado no trabalho a simplicidade e precisão do controlo temporizado das válvulas solenóides.

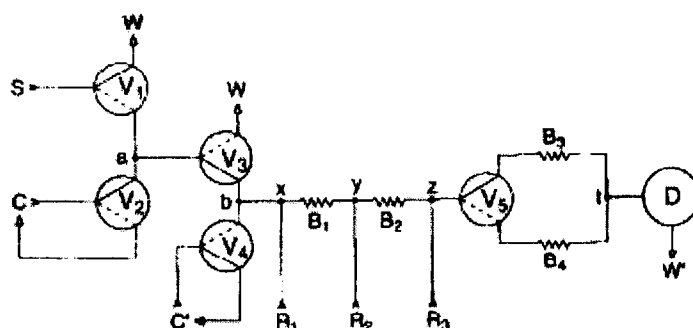


Figura 1.15

Montagem de fluxo para a determinação de cobre e zinco. V_1 a V_5 – válvulas solenóides de 3 vias; B_1 a B_4 – reatores; R_1 a R_3 – reagentes; S – amostra; C – transportador; D – detector; W – dreno; W' – recolha de resíduos para tratamento; a , b , x , y , z , t – confluências; linhas a tracejado – caminhos de fluxo alternativos das válvulas. Adaptado de [53].

Também em 1996, é produzido um trabalho de multicomutação por Kronka *et. al.* [54], que consistiu essencialmente numa aplicação prática de conceitos inerentes a multicomutação: amostragem binária e versatilidade no controlo independente das soluções intervenientes. A montagem de fluxo (Figura 1.16), aplicada na determinação sequencial de amónio e fosfato em digestos de plantas, era constituída por seis válvulas solenóides de 3 vias, com uma distribuição em estrela, e com dois pontos de confluência.

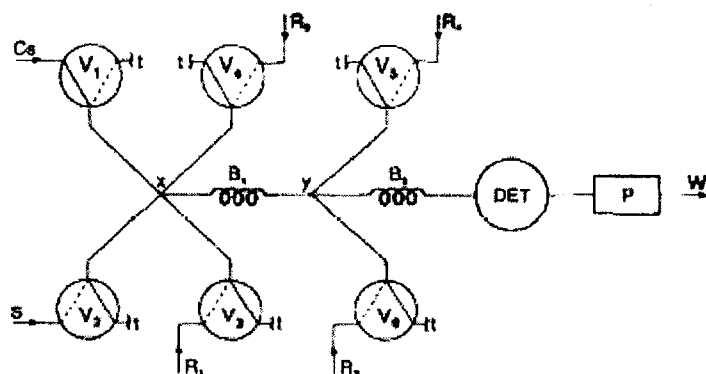


Figura 1.16

Montagem de fluxo para a determinação de amónia e fosfatos. V_1 a V_6 – válvulas solenóides de 3 vias; B_1 e B_2 – reatores; DET – detector; P – bomba peristáltica; R_1 a R_4 – reagentes; S – amostra; Cs – transportador da amostra; C – transportador; D – detector; W – dreno; x, y – confluências; t – canal de fluxo obstruído; linhas a tracejado – caminhos de fluxo alternativos das válvulas; setas – direcção do fluxo. Adaptado de [54].

Tal como em montagens anteriores, cada uma das válvulas era responsável pela inserção de uma solução, através da obstrução de uma das suas vias de forma a funcionar como um monocomutador aberto/fechado. O sistema de transporte era uma bomba peristáltica, responsável pela aspiração das amostras e reagentes, introduzidas no sistema por amostragem binária, isto é, eram inseridas por controlo temporizado das válvulas solenóides, com tempos de intercalação de 0,2 s. Primeiro era efectuada a determinação de amónio por reacção com salicilato, em meio alcalino, e depois, a determinação de fosfato com molibdato, em meio ácido. Embora o sistema fosse constituído por seis válvulas, responsáveis pela inserção de quatro reagentes, uma solução transportadora e uma solução de amostra, o seu funcionamento e controlo era de uma simplicidade muito superior

à de um sistema FIA convencional montado com o mesmo objectivo, possibilitando ainda um menor consumo de reagentes.

Outro trabalho publicado e dedicado à multicomutação foi realizado em 1998, por Vieira *et. al.* [55]. O sistema desenvolvido neste trabalho (Figura 1.17) foi aplicado à determinação de sulfato em plantas, por turbidimetria, tendo como mais valia o facto de proporcionar determinações numa gama alargada de concentrações. A montagem analítica era constituída por seis válvulas solenóides, dispostas em estrela em redor de um ponto de confluência, responsáveis pela inserção, por amostragem binária, da amostra e reagentes. O transporte das soluções era efectuado por um canal único, e consequentemente por aspiração.

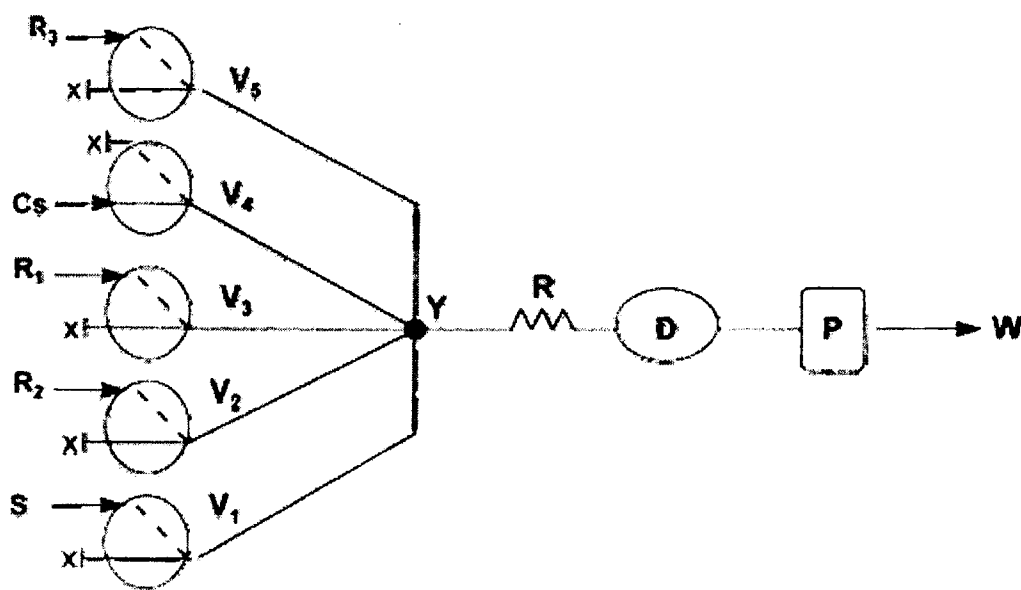


Figura 1.17

Montagem de fluxo para a determinação de fosfatos. V₁ a V₅ – válvulas solenóides de 3 vias; R – reactor; D – detector; P – bomba peristáltica; S – amostra; Cs – transportador; R₁ a R₃ – reagentes; y – confluência; x – canal de fluxo obstruído; W – dreno. Adaptado de [55].

Neste sistema, a versatilidade da multicomutação foi demonstrada uma vez mais, dado que permitia que qualquer sequência ou volume de amostragem pudesse ser facilmente seleccionado, sem necessidade de efectuar qualquer alteração na configuração física do mesmo. Com base nestes estudos, a utilização de dois volumes de amostragem possibilitou a determinação de sulfato em dois intervalos de concentração distintos, com um baixo consumo de reagentes. Assim, um volume de zona de amostra de 160 μL (94 μL de amostra), correspondente a cinco ciclos de intercalação de amostra/cloreto de bário/sulfato, com volumes de 18,8/9,9/3,3 μL , respectivamente, foi usada para uma gama de concentrações entre 0-150 mg L^{-1} , enquanto que uma zona de amostra de 132 μL (54 μL de amostra) obtida com quatro ciclos a 13,2/9,9/3,3 μL , das mesmas soluções, foi usada para análise no intervalo 100-500 mg L^{-1} .

Já em 1995, Korn *et. al.* [56] exploraram a estratégia de amostragem binária num sistema de fluxo multicomutado para encontrar o ponto de equivalência em titulações, com detecção espectrofotométrica do ponto final. Este sistema (Figura 1.18) rentabilizava vantagens da amostragem binária num fluxo com caudal constante, e possibilitou determinações num intervalo amplo de concentrações, sem necessidade de reconfigurações físicas da montagem.

A titulação por procura binária proposta neste trabalho consistia na procura da menor variação da fracção volumétrica de titulante/titulado que produzia uma variação na cor do indicador. Este processo foi implementado através da fixação de um volume total de titulante/titulado e variando as fracções volumétricas de ambas as soluções, fazendo variar as alíquotas de amostra e titulante inseridas por amostragem binária. Como vantagens salienta-se o curto tempo necessário para uma titulação, fornecendo ao mesmo tempo, resultados precisos e um consumo reduzido de soluções.

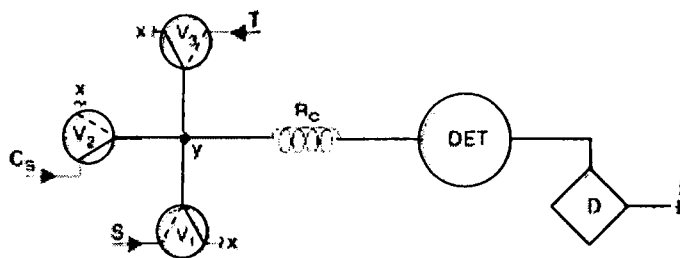


Figura 1.18

Montagem de fluxo para implementar o procedimento de procura binária. V1 a V3 – válvulas solenóides de 3 vias; DET – detector; Rc – reator; P – ligação à bomba peristáltica; Cs – transportador; S – amostra; T – titulante; y – confluência; x – canal de fluxo obstruído. Adaptado de [56].

Com algumas alterações, surgiu em 1999, por Martelli *et. al.* [57], uma nova proposta de sistema de análise multicomutado para titulações. Este sistema, agora com detecção potenciométrica do ponto de equivalência, assentava na utilização de um fluxo monosegmentado, que por isso implicava pelo menos o uso de uma válvula solenóide adicional para introdução de ar (Figura 1.19).

No entanto, utilizou-se mais uma válvula para possibilitar a introdução de uma solução diluente, devido a usar-se um método diferente para a procura binária do ponto de equivalência como explicado de seguida. Esse método por aproximações sucessivas, consistia em manter constante a fracção volumétrica relativa à amostra, e fazer variar a fracção de titulante através da adição de diferentes volumes de titulante e de solução diluente, sendo esta última para evitar efeitos de variações na matriz da amostra. A topologia da montagem de fluxo era igualmente em estrela.

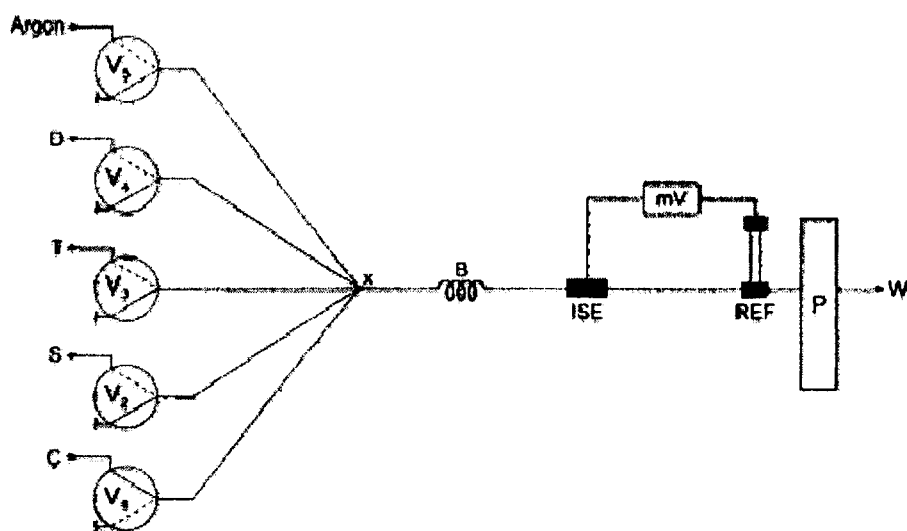


Figura 1.19

Montagem de fluxo para a titulação automática. V_1 a V_5 – válvulas solenóides de 3 vias; B – reactor; C – transportador; S – amostra; T – titulante; D – diluente; x – confluência; ISE – eléctrodo selectivo; REF – eléctrodo de referência; W – dreno; mV – potenciómetro; P – bomba peristáltica. Adaptado de [57].

Com detecção espectrofotométrica, e com base no mesmo algoritmo descrito, Reis *et. al.* [58] determinam ácido ascórbico em sumos e outras bebidas, por titulação (Figura 1.20). Recorrendo à monosegmentação e à amostragem binária, também se realizaram titulações ácido-base, através do método de Fibonacci (Figura 1.21) [59].

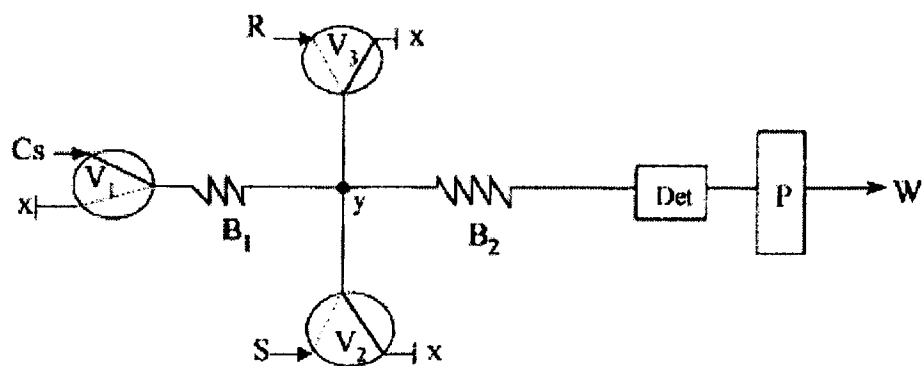


Figura 1.20

Montagem de fluxo. V_1 a V_3 – válvulas solenóides de 3 vias; B_1 e B_2 – reactores; Det – detector; P – bomba peristáltica; S – amostra; Cs – água; R – reagente; x – canal de fluxo obstruído; y – confluência; W – dreno. Linhas a tracejado indicam percurso analítico quando as válvulas estão activadas. Adaptado de [58].

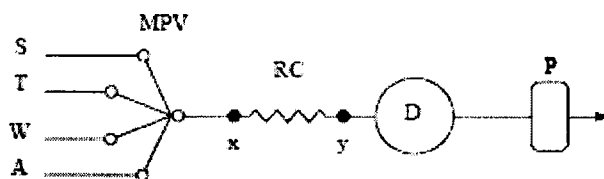


Figura 1.21

Montagem de fluxo. S, T, W, A – amostra, titulante, água, ar, respectivamente; MPV – válvula multi-porta, com válvulas solenóides de 2 vias acopladas; RC – reactor; D – detector; P – bomba peristáltica. Adaptado de [59].

Apenas com uma válvula solenóide de três vias, e recorrendo a uma estratégia diferente, foi realizado titulações ácido-base [60], argentometrias [61] e iodometrias [62]. Nestes trabalhos, a medição e registo do sinal analítico em

função de adições de diferentes volumes de titulante e/ou titulado, permitiu obter curvas de titulação.

Wang *et. al.* [63], em 1998, desenvolvem um sistema de análise (Figura 1.22) recorrendo a válvulas solenóides, mas sem associarem a metodologia ao conceito de multicomutação. Não obstante, realizaram a titulação potenciométrica de cálcio, e também, a determinação espectrofotométrica de ortofosfato pelo azul de molibdénio, através da inserção de volumes variáveis de amostra e reagentes, com base num controlo temporizado, como já tinha sido realizado por Reis *et. al.*, em 1994. A base do método volumétrico aqui utilizada era novamente a variação das fracções de tempo de actuação alternada das válvulas solenóides, para um pré-determinado intervalo de tempo total, que correspondia a um determinado volume de zona de amostra.

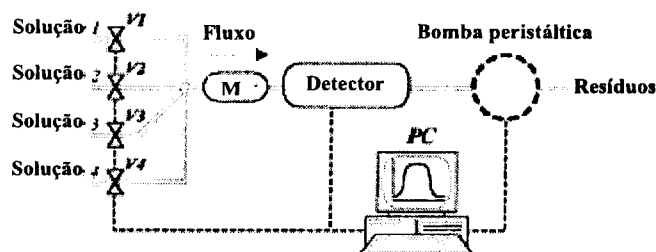


Figura 1.22

Montagem de fluxo. V1 a V4 – válvulas solenóides; M – câmara de mistura. Adaptado de [63].

Os mesmos autores que publicaram em 1996 o trabalho de multicomutação, referente à determinação de fosfatos em plantas, publicaram em 1997 [64], um trabalho considerado um aperfeiçoamento do anterior, para a determinação de fosfatos em águas. A vantagem deste trabalho era o facto de possibilitar a

determinação de fosfatos num maior intervalo de concentrações, devido à utilização de dois reactores paralelos. Tal configuração de montagem analítica (Figura 1.23) permitia que enquanto uma zona de amostra era retida no interior de um reactor durante um determinado tempo, uma segunda zona de amostra, idêntica à primeira, era introduzida e prontamente detectada. A técnica de paragem de fluxo permitiu então aumentar o tempo de reacção, e deste modo, contribuiu para um aumento da sensibilidade da determinação, conjuntamente com fenómenos de dispersão.

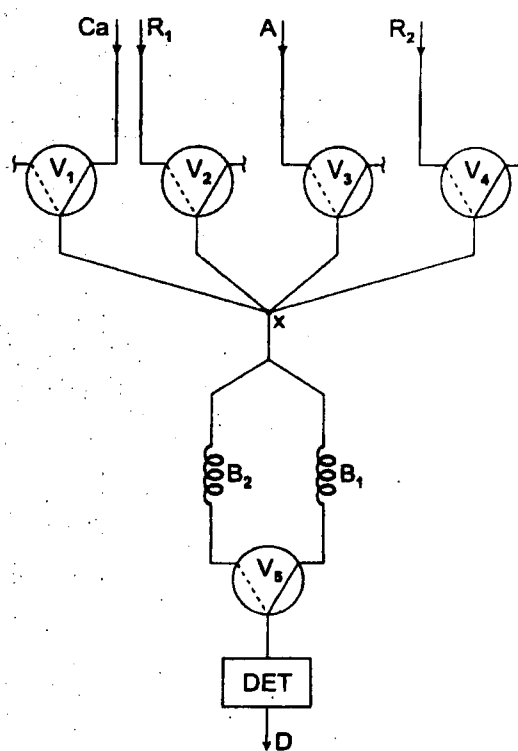


Figura 1.23

Montagem de fluxo para a determinação de fosfatos. V_1 a V_5 – válvulas solenóides de 3 vias; Ca – transportador de amostra; R_1 e R_2 – reagentes; B_1 e B_2 – reactores; DET – detector; D – dreno. Adaptado de [64].

Tumang *et. al.*, em 1998 [65], publicou um trabalho com ênfase na capacidade de controlo de percursos analíticos proporcionada pela multicomutação. Com o recurso à multicomutação, desenvolveu-se um sistema de redes analíticas, isto é, sistemas com possibilidade de diferentes percursos analíticos. Este sistema (Figura 1.24) constituído por cinco válvulas solenóides de três vias, e uma de quatro vias, possibilitou criar três percursos analíticos alternativos, com dimensões idênticas, nos quais eram inseridas e retidas três zonas de amostra durante o tempo necessário para que a reacção se completasse, procedendo por último à sua detecção. Neste sistema, as soluções eram impulsionadas, através de uma bomba peristáltica, e o volume de amostra era definido pelo comprimento do canal de amostragem e não por um controlo temporizado. Um sistema assim idealizado permitia a realização de reacções lentas, por aumento dos tempos de reacção, sem que no entanto fosse afectado negativamente o ritmo de amostragem, tal como comprova o ritmo de 35 amostras por hora, com um tempo de análise de 3 minutos por amostra, na determinação espectrofotométrica de boro em plantas.

Reis *et. al.* [66], em 2002, desenvolvem um sistema de análise (Figura 1.25) baseado num comutador operado electronicamente, e associado a válvulas solenóides de três vias para a determinação de amónia e fosfato em águas. Diversas zonas de amostra eram processadas em simultâneo, conseguindo-se deste modo um ritmo de amostragem de 56 amostras por hora, embora com um tempo de residência de 160 segundos.

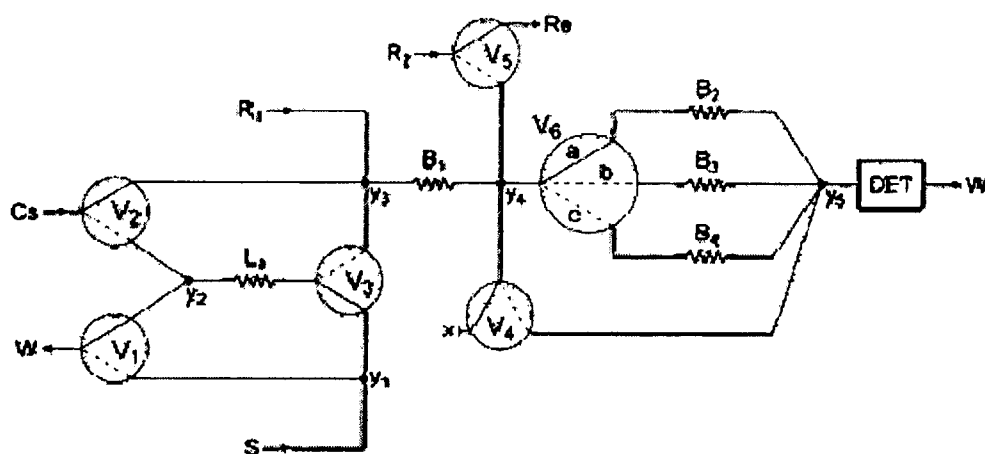


Figura 1.24

Montagem analítica para a determinação de boro. V₁ a V₅ – válvulas solenóides de 3 vias; V₆ – válvula solenóide de 4 vias; L₁ – alça de amostragem; B₁ a B₄ – reactores; DET – detector; y₁ a y₅ – confluências; x – canal de fluxo obstruído; Cs – transportador; R – reagentes; S – amostra; D – dreno. Adaptado de [65].

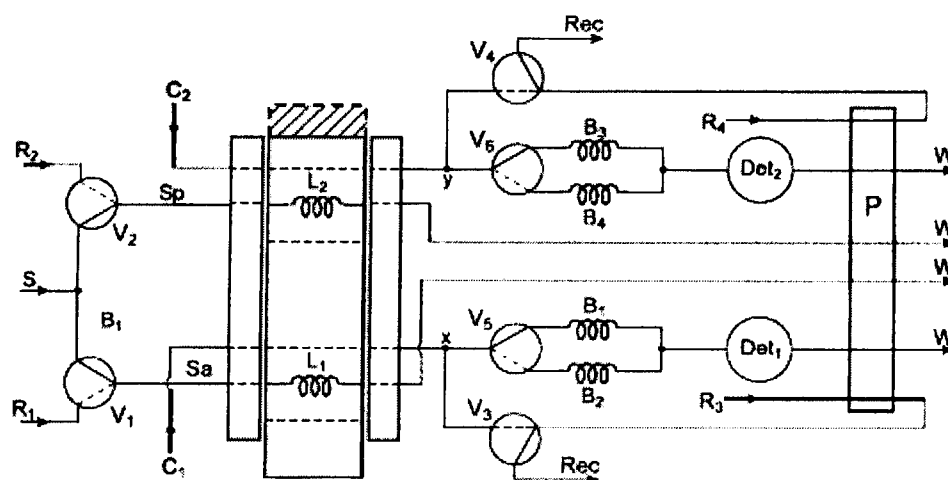


Figura 1.25

Montagem de fluxo para a determinação de amónia e fosfatos. V_1 a V_6 – válvulas solenóides de 3 vias; L_1 e L_2 – alças de amostragem; x e y – confluências; B_1 a B_4 – reactores; Det – detector; P – bomba peristáltica; C_1 e C_2 – transportadores; S – amostra; R_1 a R_4 – reagentes; Rec – recirculação de reagentes; linhas a tracejado – percurso analítico quando as válvulas estão activadas. Adaptado de [66].

Com o mesmo propósito, Lapa *et. al.* [67], implementaram um sistema multicomutado com dupla paragem de fluxo, através da utilização de cinco válvulas solenóides (Figura 1.26). As zonas de amostra, obtidas pelo recurso a amostragem binária, eram retidas por dois minutos, com o intuito de aumentar o tempo de reacção, ou seja, incrementar a sensibilidade sem afectar negativamente o ritmo de amostragem. Com este sistema foi possível realizar 30 determinações por hora de amiloride, em formulações farmacêuticas.

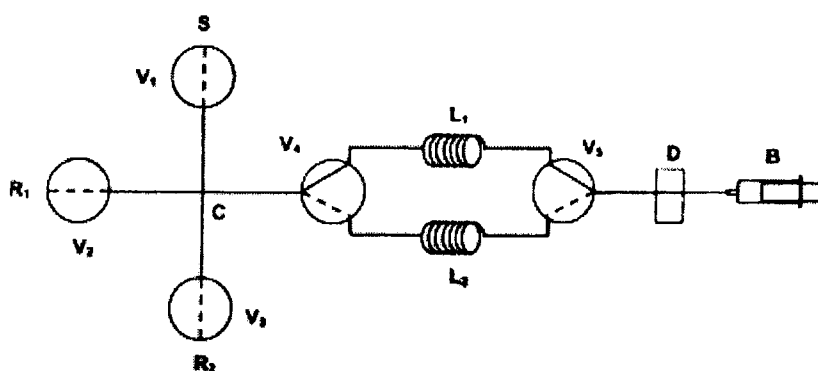


Figura 1.26

Montagem de fluxo para a determinação de amiloride. V₁ a V₃ – válvulas solenóides de 2 vias, normalmente fechadas; V₄ e V₅ – válvulas solenóides de 3 vias; D – detector; B – bureta automática; L₁ e L₂ – reactores; S – amostra; R₁ e R₂ – reagentes; C – confluência. Adaptado de [67].

Com o propósito de compilar os trabalhos efectuados com base no conceito de multicomutação, e para deste modo, informar o leitor sobre as aplicações desse conceito, os trabalhos apresentados em seguida dizem respeito ao

desenvolvimento de sistemas de fluxo multicomutado para a execução de diluições em linha, isto é, idealizados com o objectivo de incrementar a amplitude do intervalo de concentrações determináveis.

Um sistema de fluxo é proposto em 1996, por Giné *et. al.* [68], para realizar diluições automáticas em linha, com o recurso a válvulas solenóides, responsáveis pela introdução precisa de volumes de amostra e solvente no sistema (Figura 1.27). Neste trabalho propõe-se um procedimento alternativo aos utilizados anteriormente, nomeadamente a exploração de gradientes de concentração em amostragem de zonas, divisão de zonas e dispersão de volumes da ordem de microlitros de amostra inseridos. Estes procedimentos exigiam a sua aplicação na amostra e nos padrões, o que implicava uma estimativa prévia da concentração do analito nas amostras para preparar os padrões adequados. A metodologia explorada por Giné *et. al.* baseava-se numa diluição das amostras cuja concentração do analito ultrapassava a zona de resposta linear. A montagem analítica, por exploração da amostragem binária, permitia a inserção de fracções volumétricas variáveis de amostra, possibilitando diluições através da intercalação temporizada de uma solução diluente, de modo a que, mantendo constante o volume amostrado, a fracção volumétrica da amostra fosse reduzida. A razão entre a fracção volumétrica inicial e a ajustada, comparada numa base de tempo, definia o nível de diluição produzido.

Com a mesma finalidade, Gouveia *et. al.* dois anos mais tarde [69], desenvolve um sistema analítico (Figura 1.28) que possibilitava a diluição da amostra, em linha, sempre que o sinal analítico gerado pelo analito fosse superior à zona de resposta linear, através de dois procedimentos alternativos para a redução do volume de amostragem: diminuição do tempo de amostragem, aquando da inserção de uma única alíquota, fazendo-o variar entre 0,05 e 2 segundos, correspondendo um inferior tempo a um volume inferior de amostra inserido; e,

por redução da fracção volumétrica da amostra, no caso do recurso à amostragem binária, resultando num aumento da razão volume de reagente/volume de amostra. Este sistema permitia realizar ensaios de dissolução de comprimidos.

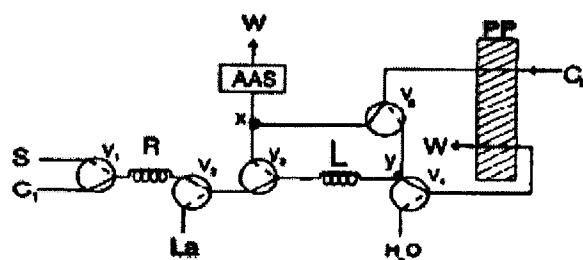


Figura 1.27

Montagem de fluxo para a determinação de cálcio, com diluição automática. PP – bomba peristáltica; V₁ a V₅ – válvulas solenóides de 3 vias; R – reactor; L – alça de amostragem; x e y – confluências; C₁, C₂, La – reagentes; S – amostra; W – dreno. Adaptado de [68].

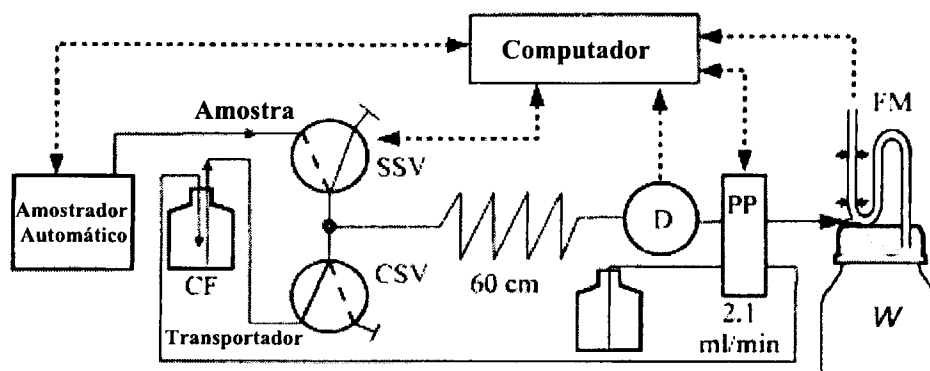


Figura 1.28

Montagem de fluxo. C – transportador; CSV – válvula solenóide do transportador; S – amostra; SSV – válvula solenóide da amostra; PP – bomba peristáltica; D – detector; W – dreno. Adaptado de [69].

Ainda no mesmo ano, Rocha *et. al.* [70] utilizam o conceito de multicomutação para desenvolverem um sistema de fluxo automático com o intuito de incrementarem a zona de resposta linear com aplicação na determinação de cálcio por espectrofotometria. A montagem analítica (Figura 1.29) englobava seis válvulas solenóides para permitirem a implementação de diferentes condições de processamento de amostras, o que resultava em diferentes graus de dispersão, sem qualquer modificação física na estrutura da montagem. Neste trabalho obtiveram-se coeficientes de dispersão entre 2,15 e 754, através de uma redução do volume de amostra em combinação com a alteração do comprimento do percurso analítico, ou em alternativa, pela aplicação de uma divisão de zonas. As válvulas solenóides permitiam a selecção de dois percursos analíticos para realizar a amostragem temporizada de zonas ou a divisão de fluxo, realizando-se, deste modo, a diluição da amostra previamente à adição dos reagentes.

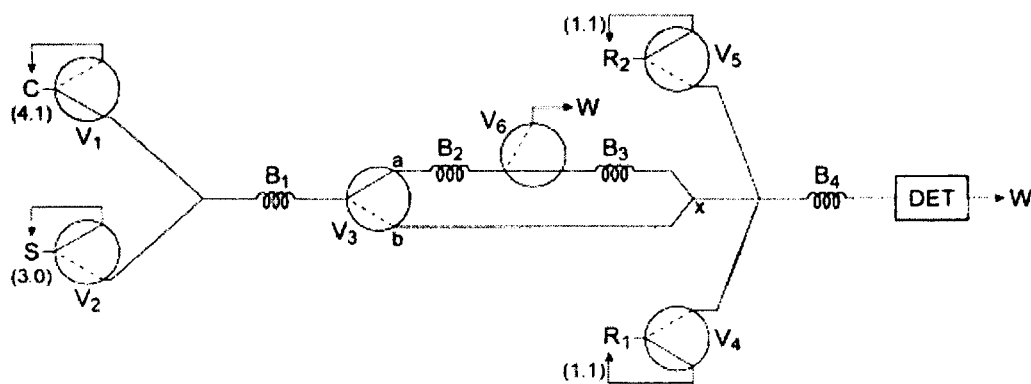


Figura 1.29

Montagem de fluxo para a determinação de cálcio, com diluição automática das amostras. V₁ a V₆ – válvulas solenóides de 6 vias; B₁ a B₄ – reatores; C – transportador; S – Amostra; R – reagentes; x – confluência; D – detector; W – dreno. Adaptado de [70].

Em 2000, Lapa *et. al.* [71] implementam um sistema de fluxo multicomutado (Figura 1.30), para detecção fluorimétrica de isoniazida em formulações farmacêuticas e com aplicação em ensaios de dissolução de comprimidos, através de uma técnica de diluição por remoção da zona de amostra mais concentrada.

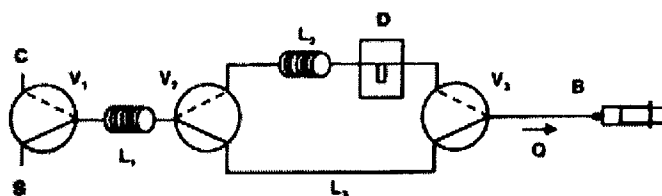


Figura 1.30

Montagem de fluxo para a determinação de isoniazida. V_1 – válvula pneumática; V_2 e V_3 – válvulas solenóides de 3 vias; D – detector; B – bureta automática; L_1 e L_2 – reatores; L_3 – canal de limpeza; S – amostra; C – transportador. Adaptado de [71].

Um outro aproveitamento da flexibilidade e versatilidade características da multicomutação concretizou-se em 1997, quando se desenvolveu um sistema analítico que visou a compensação dos efeitos Schlieren frequentemente associados a determinações espectrofotométricas. A montagem analítica (Figura 1.31) desenvolvida por Lapa *et. al.* [72] recorria à amostragem binária para a preparação em linha da solução transportadora, o que originava um perfil de gradientes de concentração idêntico à da zona de amostra, e deste modo, as soluções em fluxo apresentavam índices de refração equivalentes. Com esta metodologia foi possível realizar a determinação espectrofotométrica de pindolol por complexação com Ferro (III), com um ritmo de amostragem de 30 amostras por hora.

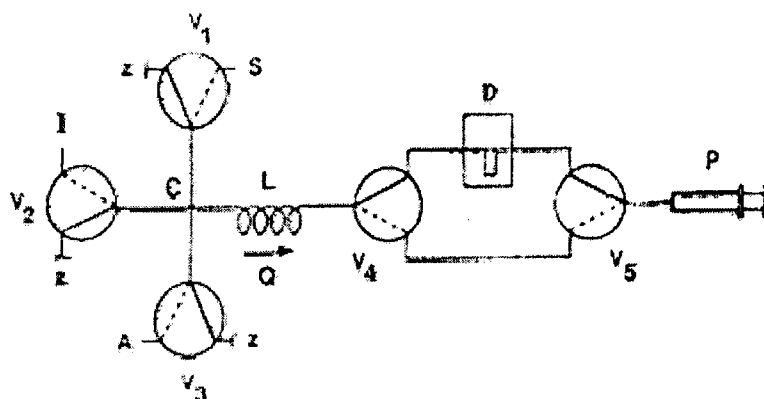


Figura 1.31

Montagem de fluxo para a determinação de pindolol. V₁ a V₅ – válvulas solenóides de 3 vias; D – detector; P – bureta automática; R – reactor; S – amostra; C – confluência; z – canal de fluxo obstruído. Adaptado de [72].

A elevada versatilidade e capacidade de controlo do fluxo conferida pela multicomutação, suscitou o interesse por alguns investigadores no sentido de acoplar a metodologia a outras técnicas de detecção, dado que as metodologias apresentadas anteriormente exploram essencialmente a detecção por espectrofotometria em UV/VIS. Sendo que concentrações em linha constituem factores limitadores do ritmo de amostragem, o recurso à multicomutação permite ultrapassar tal facto. O trabalho de Miranda *et. al.* [73] envolve fenómenos de adsorção e eluição em linha através de três colunas de troca-iónica, geridas por uma válvula solenóide de quatro vias, o que possibilitou um ritmo de 90 amostras por hora, na determinação de cádmio, níquel e chumbo por ICP-AES (Figura 1.32).

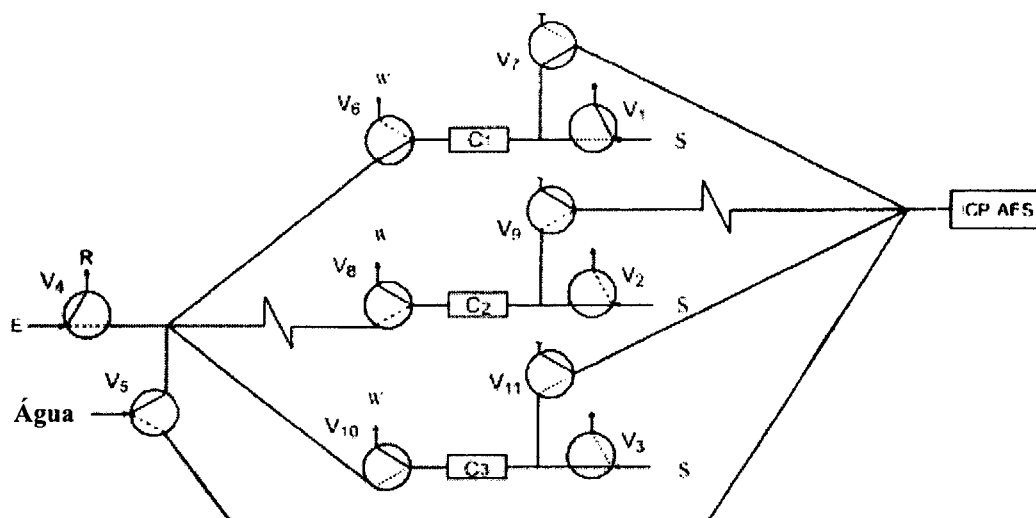


Figura 1.32

Montagem de fluxo para a determinação de cádmio, níquel e chumbo. V_1 a V_{11} – válvulas solenóides de 3 vias; C1 a C3 – colunas de resinas; S – amostra; E – eluente; W – dreno. Adaptado de [73].

A espectrometria por absorção atômica com atomização eletrotérmica foi a eleita por Silva *et. al.* em 1998 [74]. Neste trabalho (Figura 1.33) realizava-se as etapas de separação e pré-concentração em linha, para a determinação de cádmio, chumbo e níquel em águas minerais. A multicomutação proporcionou um manuseamento muito simplificado e versátil da amostra e reagentes, o que por sua vez permitiu uma eficiente etapa de pré-concentração e atomização da amostra.

Também envolvendo etapas de separação e pré-concentração em linha, foi desenvolvido um sistema de fluxo multicomutado (Figura 1.34) acoplado a um sistema em plasma induzido com detecção por espectrometria de massa (ICP-MS), para a determinação de cobre, cádmio, chumbo, bismuto e selênio (IV) em água do mar, por Pozebon *et. al.* [75].

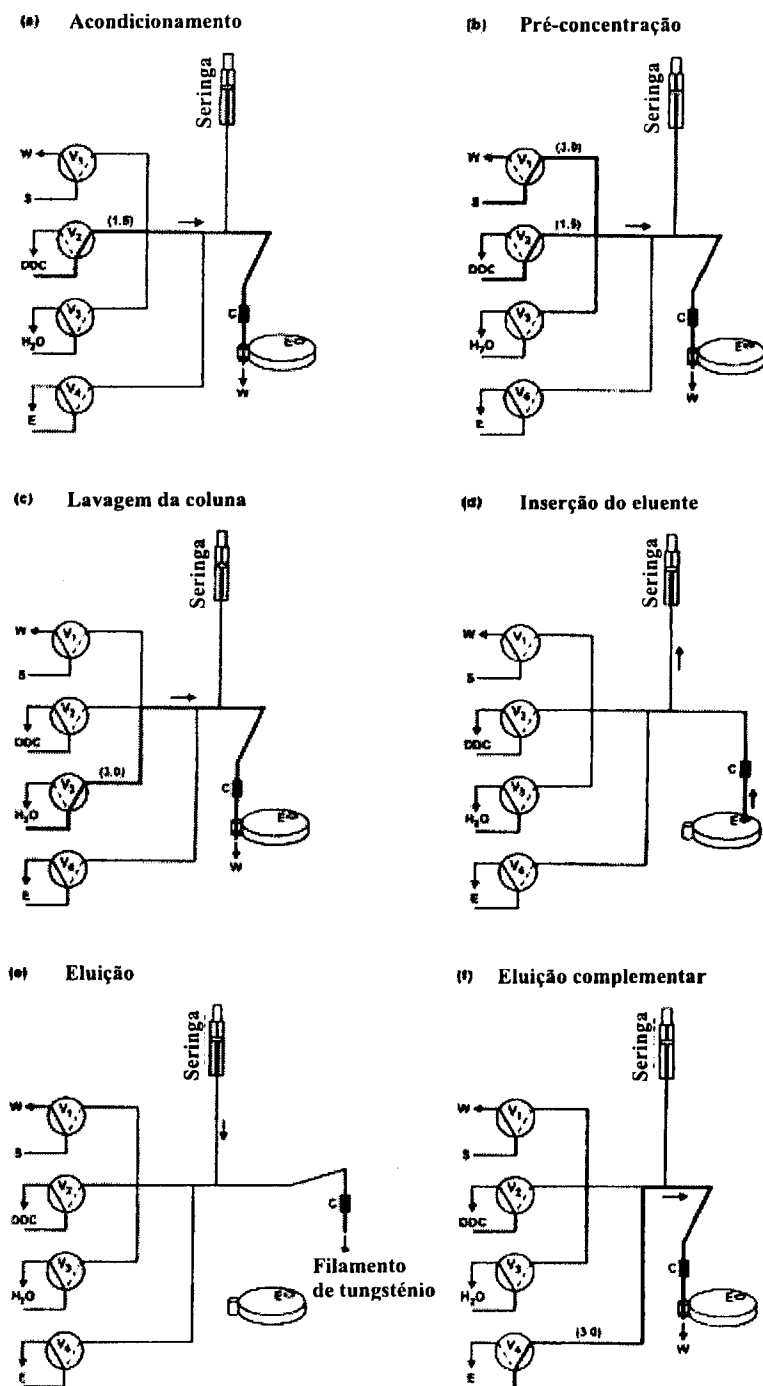


Figura 1.33

Montagem de fluxo e sequência de funcionamento do sistema para a separação e pré-concentração de chumbo, cádmio e níquel. V_1 a V_4 – válvulas solenóides de 3 vias; S – amostra; DDC – reagente; W – dreno; E – eluente; x, y, z – confluências. Adaptado de [74].

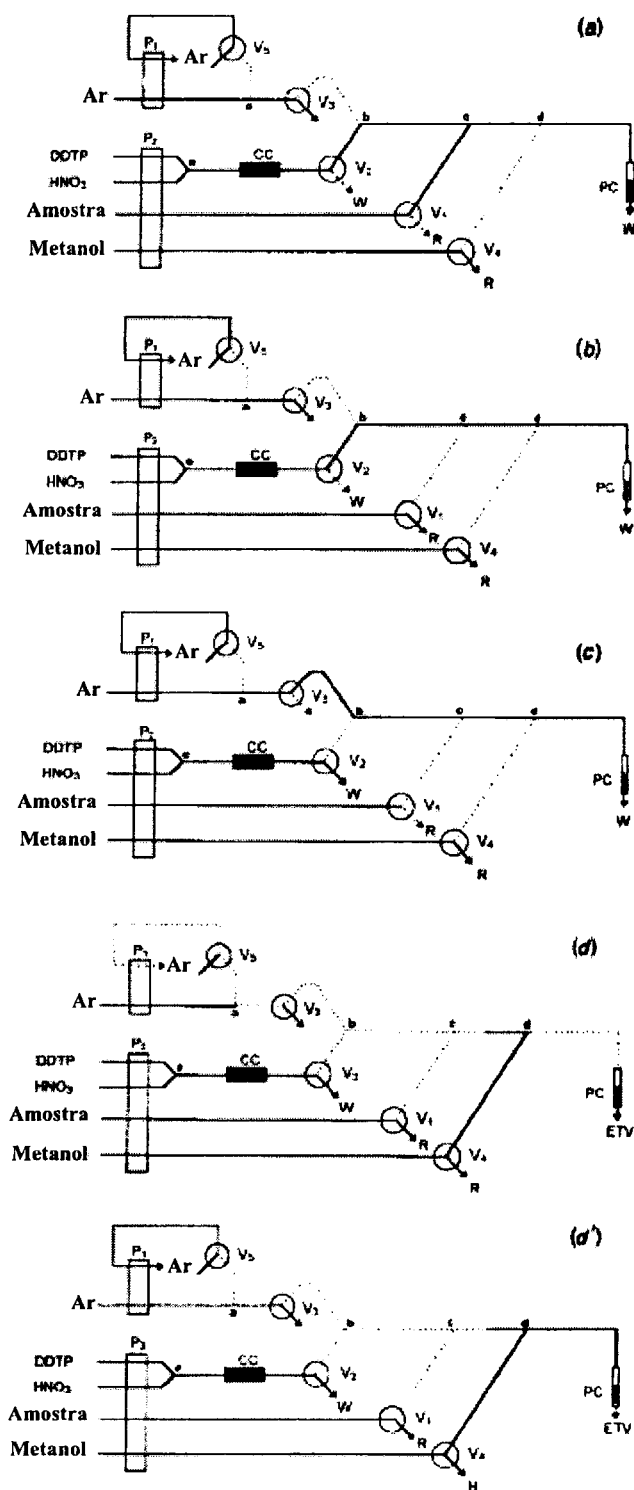


Figura 1.34

Montagem de fluxo para a determinação de cobre, cádmio, chumbo, bismuto e selênio. V₁ a V₅ – válvulas solenóides de 3 vias; P₁ e P₂ – bombas peristálticas; PC – coluna de pré-concentração e separação; CC – coluna de purificação; W – dreno; a, b, c, d, e – confluências. Adaptado de [75].

Em 2000 é proposto um sistema de fluxo multicomutado com detecção por quimioluminescência (Figura 1.35) para a determinação de fenóis em águas [76]. A determinação consistia na oxidação dos fenóis por permanganato em meio ácido, após concentração em linha numa minicoluna com resina não iónica XAD-4. Atingiu-se um limite de detecção de 5 ng l^{-1} , e um ritmo de 12 amostras por hora. Desde então, outros trabalhos de multicomutação envolvendo detecção por quimioluminescência têm sido desenvolvidos.

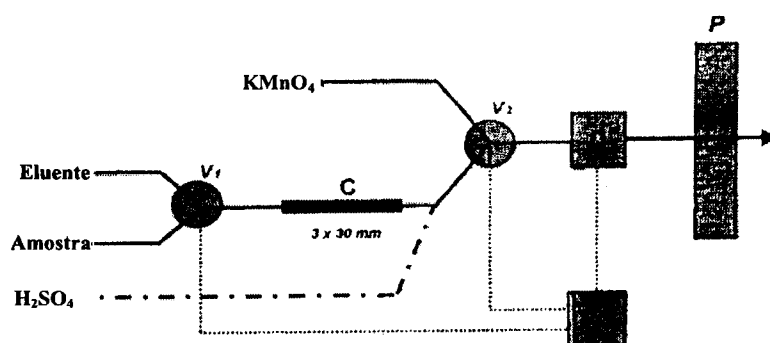


Figura 1.35

Montagem de fluxo para a determinação de fenóis. V₁ e V₂ – válvulas solenóides de 3 vias; P – bomba peristáltica; D – detector; PC – microcomputador; C – coluna de pré-concentração. Adaptado de [76].

O recurso à multicomutação permitiu o desenvolvimento de um processo para a determinação directa de alumínio, cobre e zinco em amostras sólidas de ligas metálicas, através da electro-dissolução em linha das ligas e à detecção por espectrometria de absorção atómica em chama (Figura 1.36) [77].

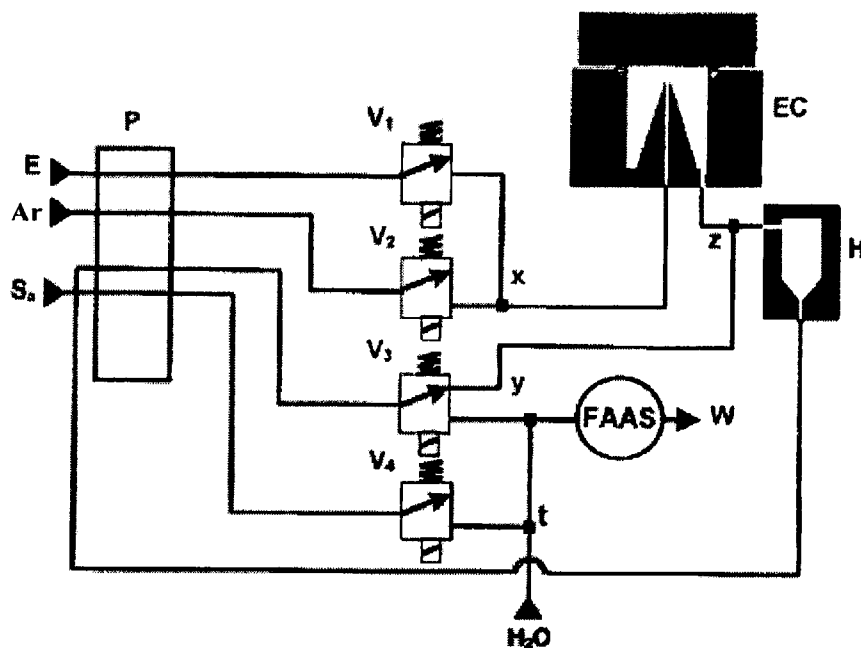


Figura 1.36

Montagem de fluxo para a determinação directa de alumínio, cobre e zinco. PP – bomba peristáltica; V_1 a V_4 – válvulas solenóides; x, y, z, t – confluências; H – câmara de homogeneização; W – dreno; FAAS – detector. Adaptado de [77].

Outra técnica de detecção acoplada a sistemas de fluxo multicomutado foi a espectrofluorimetria. Lapa *et. al.*, além do trabalho publicado em 2000 já referido anteriormente [71], desenvolveu outro sistema multicomutado (Figura 1.37) para a determinação fluorimétrica de ácido fólico após fotodegradação [78]. O sistema estava programado para optar pelo tempo de amostragem mais adequado à concentração da amostra, e tal controlo por computador também possibilitou que as determinações analíticas fossem efectuadas num intervalo alargado de concentrações, através da selecção de diferentes volumes de amostra, relacionados directamente com os tempos de amostragem.

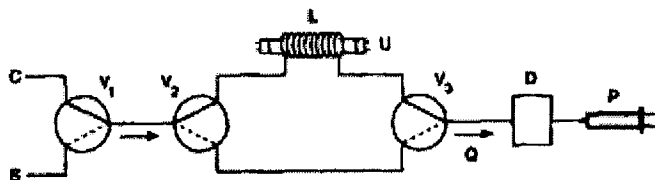


Figura 1.37

Montagem de fluxo para a determinação de ácido fólico. V_1 a V_3 – válvulas solenóides de 3 vias; U – lâmpada de UV; D – detector; B – bureta automática; L – reactor; S – amostra; C – transportador. Adaptado de [78].

Entretanto, em 1998, Lapa *et. al.* [79] desenvolve um sistema de fluxo multicomutado com recirculação contínua de amostra numa configuração circular aberta (Figura 1.38), onde se salientaram as vantajosas características da multicomutação: elevada capacidade de direccionalidade de fluxo e eficaz capacidade de manipulação da zona de amostra. Deste modo, um programado accionamento das válvulas permitiu que a zona de amostra fosse recirculada, possibilitando a sua multidetecção ou a sua diluição, até enquadramento na zona de resposta linear. A diluição, além de ocorrer por fenómenos de dispersão, também era induzida por remoção das fracções terminais da zona de amostra. Paralelamente, conseguia-se uma renovação do reagente cromogénico e das interfaces de reacção, o que resultava num aumento da velocidade de reacção.

Em 2001, as potencialidades da multicomutação em determinações sequenciais são expandidas por associação com detectores multi-canal, como evidencia o trabalho de Rocha *et. al.* [80], em que se realiza a terminação sequencial de ferro, cobre, zinco e níquel, por espectrofotometria (Figura 1.39).

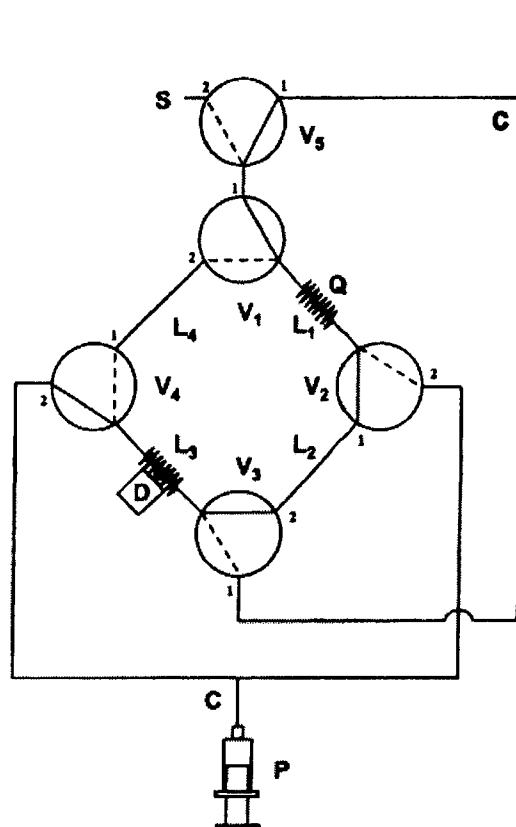


Figura 1.38

Montagem de fluxo com configuração circular. V_1 a V_5 – válvulas solenóides de 3 vias; D – detector; P – bureta automática; L_1 a L_4 – reatores; S – amostra; I – reagente; C – confluências. Adaptado de [79].

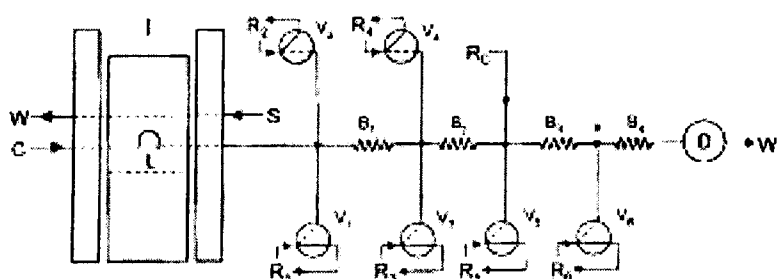


Figura 1.39

Montagem de fluxo para a determinação de ferro, cobre, zinco e níquel. I – injetor-comutador; V_1 a V_6 – válvulas solenóides de 3 vias; B_1 a B_4 – reatores; D – detector; L – alça de amostragem; C – transportador; S – amostra; W – dreno. Adaptado de [80].

Também em 2001, Rocha *et. al.* [81] publica um trabalho que envolve a adição intermitente de diferentes reagentes cromogêneos selectivos para a determinação de ferro, cobre, zinco, cálcio e magnésio em formulações multi-vitamínicas (Figura 1.40). As determinações sequenciais são também facilmente implementadas pela multicomutação através da possibilidade conferida pela metodologia de realizar diferentes tarefas.

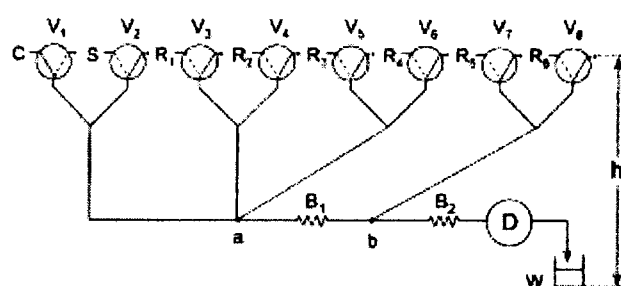


Figura 1.40

Montagem de fluxo para a determinação de ferro, cobre, zinco, cálcio e magnésio. C – transportador; S – amostra; Ri – reagentes; V₁ a V₈ – válvulas solenóides de 3 vias; B₁ e B₂ – reagentes; D – detector; h – diferença de altura. Adaptado de [81].

Em 2000, Rocha *et. al.* [82] desenvolvem um sistema de fluxo para a determinação de azoto em águas (Figura 1.41). Neste trabalho, a determinação de amónia era efectuada por paragem da zona de amostra num reactor para maior desenvolvimento da reacção, enquanto que outra zona de amostra era processada para a determinação de nitritos e nitratos. Deste modo, foi conseguido um ritmo de amostragem de 60 h⁻¹, com um tempo de residência de 120 segundos para a amónia, o que era suficiente para atingir 95% de conversão.

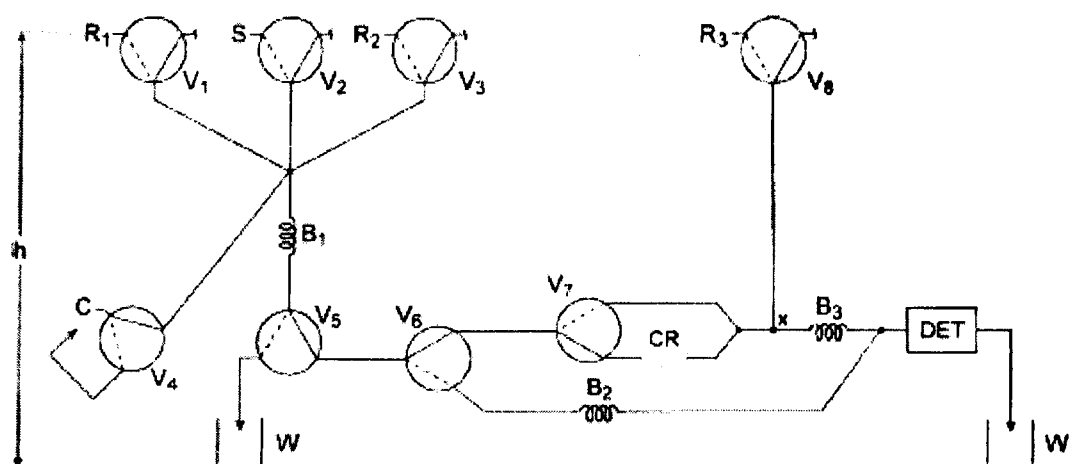


Figura 1.41

Montagem de fluxo para a determinação de nitritos e nitratos. V_1 a V_8 – válvulas solenóides de 3 vias; S – amostra; R_1 a R_3 – reagentes; C – transportador; B_1 a B_3 – reatores; C_R – coluna, DET – detector; W – dreno; h – diferença de altura. Adaptado de [82].

Outro trabalho equivalente é realizado em 2001 [83] em que é inserido sequencialmente diversos reagentes cromogéneos no fluxo de amostra, que se comportava como transportador. Este sistema (Figura 1.42) possibilitava ainda uma etapa de pré-concentração em linha, em simultâneo com determinações directas, através da colocação de mini-colunas com resina de troca-aniónica num canal alternativo.

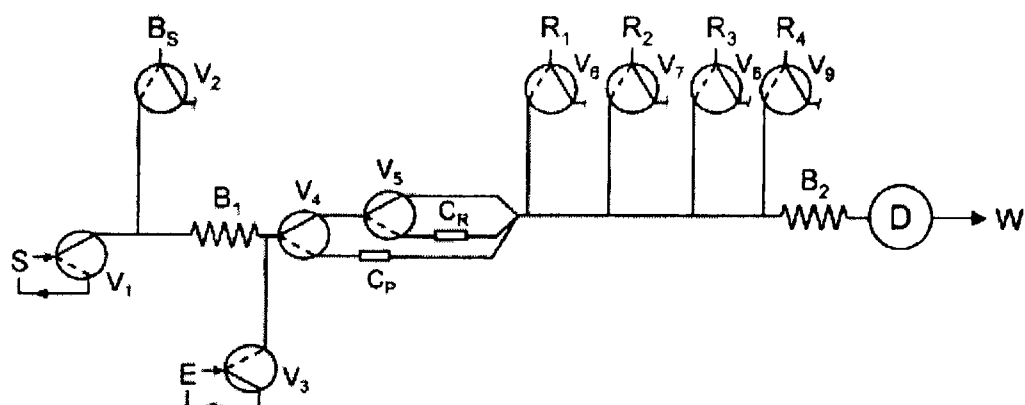


Figura 1.42

Montagem de fluxo para a determinação de aniões. S – amostra; B_S – solução tampão; E – eluente; R_i – reagentes; C_P e C_R – colunas; V₁ a V₉ – válvulas solenóides de 3 vias; B₁ e B₂ – reagentores; D – detector; W – dreno. Adaptado de [83].

1.3.1.4. Multiseringa

Recentemente surgiu uma metodologia em fluxo, denominada análise por injeção em fluxo baseada em multiseringa, como resultado de uma tentativa de reunir todas as vantagens das técnicas de fluxo descritas anteriormente. Cerdà *et. al.*, em 1999 [84], descrevem um sistema de análise em fluxo baseado no uso de uma multiseringa (Figura 1.43).

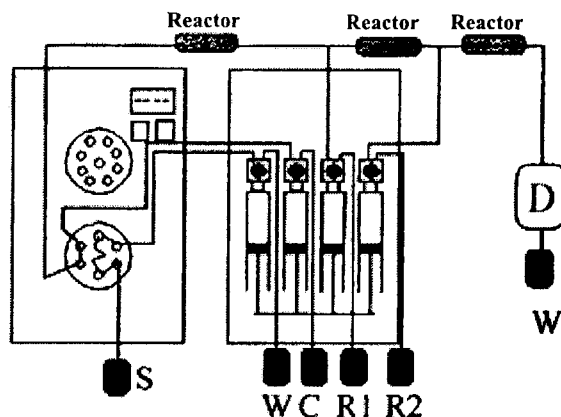


Figura 1.43

Sistema de fluxo por multiseringa. S – amostra; C – transportador; R₁ e R₂ – reagentes; W – dreno. Adaptado de [84].

O centro vital em que assenta esta metodologia é o elemento propulsor que é uma multiseringa automática, produzida pela empresa Crison. O pistão de uma multiseringa possibilita o movimento simultâneo dos êmbolos de quatro seringas, que podem ter diferentes capacidades. As seringas estão ligadas a um veio comum, que se movimenta por estar interligada a um motor multi-passo. O motor multi-passo é controlado por computador, e pode totalizar nalguns modelos de multiseringas um total de 40000 passos, o que significa, que na utilização de uma seringa de 1 ml, cada passo do motor corresponde a um débito de 0,025 μ L. À saída de cada seringa está incorporada uma válvula solenóide de três vias e na extremidade oposta encontra-se um êmbolo que proporciona o enchimento ou esvaziamento das seringas. Sintetizando, este equipamento propulsor permite atingir os ritmos de amostragem de FIA, manter uma robustez de SIA, e a versatilidade e economia de reagentes da multicomutação [85].

As válvulas solenóides substituem as válvulas normalmente incorporadas nas buretas de pistão automáticas, e permitem mudanças de estado ON/OFF com frequências elevadas, na ordem de 35 ms. As frequências elevadas de comutação possibilitam que sejam realizadas sem paragem do movimento dos êmbolos.

Comparando a análise por fluxo com multiseringa com a análise por injeção em fluxo, conclui-se que é possível obter consumos de reagentes mais baixos, porque em multiseringa os reagentes podem retornar ao reservatório quando não são necessários, enquanto que em FIA verifica-se um movimento contínuo de reagentes para o sistema e efluente. Além disso, a utilização das buretas de pistão automáticas permitiu ultrapassar um dos principais problemas de FIA que se prende com o uso de tubos poliméricos de impulsão nas bombas peristálticas, que são incompatíveis com ácidos e bases concentrados, ou solventes orgânicos. Os tubos usados na montagem analítica e as extremidades dos pistões são constituídas por PTFE. Também o facto de se usar bombas de pistão como equipamento propulsor, em vez de bombas peristálticas, confere a estes sistemas alguma robustez no transporte das soluções, tornando-o mais homogéneo e resistente a alterações inerentes às bombas peristálticas, como seja o seu movimento pulsado e o facto dos tubos de impulsão se alterarem após tempo de exposição à fricção dos rolamentos.

Em multiseringa o uso de uma seringa do bloco multiseringa como reservatório de amostra para introdução directa da amostra no sistema de fluxo, aumentaria o ciclo analítico de um modo substancial em tempo, porque implicaria a realização de vários passos de lavagem entre amostras consecutivas, de modo a evitar a contaminação entre amostras consecutivas por resíduos das anteriores (efeito de sobreposição de zonas; "carry-over" em inglês). Desta maneira, e porque é essencial que se transfira com precisão um determinado volume de amostra para o sistema de forma reprodutível, foram adoptadas estratégias alternativas:

recorrendo ao volume interno de uma alça de injeção, ou à relação tempo vs. caudal durante a fase de amostragem.

1.3.1.5. Lab-on-valve

A metodologia designada por Ruzicka de “Lab-on-valve” (LOV), proposta em 2000 [86], surgiu como uma evolução microminiaturizada de SIA. Considerando que o objectivo principal da microminiaturização de ensaios baseados em reacções químicas é a diminuição da utilização da massa consumida e resíduos originados, então apenas o volume do canal de processamento da amostra nas montagens analíticas de fluxo necessita de ser diminuído.

Os sistemas LOV e os sistemas SIA são operados com base no mesmo princípio. O centro principal do sistema é uma válvula multiposição, controlada por computador, cuja porta central está ligada, através de uma alça de armazenamento, a uma seringa automática de elevada precisão, que é utilizada para o transporte de soluções para a alça de armazenamento, para a sua mistura e para o transporte da zona de reacção para o detector.

Nos sistemas LOV, a miniaturização é conseguida através da utilização de um componente monobloco (Figura 1.44) que é montado sobre a válvula multiposição de uma montagem SIA (Figura 1.45).

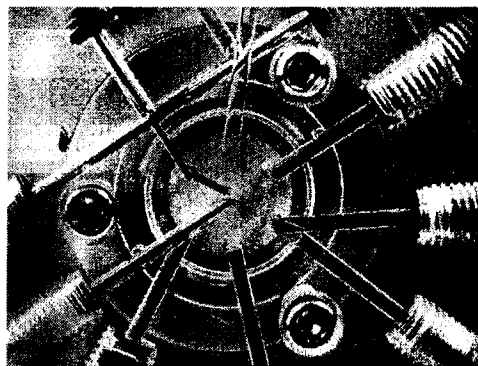


Figura 1.44

Fotografia de uma Unidade Central de Processamento da Amostra. Adaptado de [87].

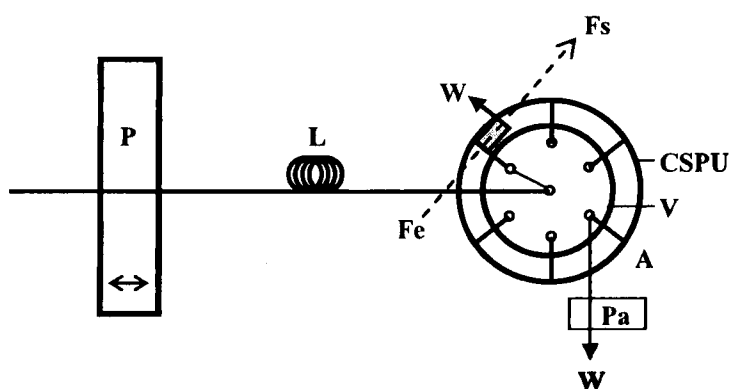


Figura 1.45

Montagem de fluxo LOV. P – unidade de propulsão; Pa – unidade de propulsão auxiliar; L – alça de armazenamento; V – válvula multiposição; CSPU – unidade central de processamento da amostra; A – amostra; Fe – feixe de entrada; Fs – feixe de saída; W – dreno.

Este componente, designado por Unidade Central de Processamento da Amostra (CSPU, do inglês "Central Sample Processing Unit"), foi engenhosamente idealizado e desenvolvido de modo a integrar uma porta de injeção de amostra, canais de acesso para reagentes e uma célula de fluxo que possibilita o acoplamento de diversos sistemas de detecção espectroscópicos, como por exemplo, absorvência, reflectância e fluorescência. Deste modo, o percurso analítico da amostra desde a injeção até à célula de fluxo integrada, possibilita a diluição da amostra, a adição de reagentes, a mistura, incubação, separação e detecção, por qualquer sequência, num regime de fluxo em modo de aspiração, paragem e propulsão, embora a CSPU seja caracteristicamente de dimensões reduzidas. A miniaturização é conseguida através de uma CSPU que engloba canais de processamento de amostra e uma célula de fluxo polivalente. As características mais evidentes deste equipamento são: i) grande proximidade entre a porta de injeção e a célula de fluxo; ii) célula de fluxo polivalente; iii) flexibilidade do processamento de amostra, devido à reversão de fluxo na alça de armazenamento e pelo acesso aleatório providenciado pela válvula multiposição.

Com os sistemas LOV, os microensaios tornam-se possíveis porque os elementos chave, tais como as portas de reagentes e amostras, reactores de mistura, colunas de reacção, e detectores de fluxo, estão centralizados e os percursos do fluxo são minimizados. Qualquer método de injeção sequencial pré-existente pode ser rapidamente adaptado a uma configuração LOV, com redução drástica do consumo de reagentes e da geração de resíduos. Esta é uma característica importante quando estão disponíveis pequenas quantidades de amostra e reagente, como por exemplo, nos bioensaios. A instrumentação compacta e as montagens simples são aspectos importantes quando o objectivo é a monitorização dos processos em linha. O LOV, com canais de diâmetro considerável e com percursos de fluxo curtos, é também perfeito para a manipulação de fluidos com

matéria suspensa, podendo ser um veículo óptimo para a “Bead-Injection” (BI) [86]. As configurações em modo LOV servem-se dos mesmos materiais e hardware desenvolvidos para as técnicas de fluxo, sendo por isso facilmente implementadas. Estas características têm sido demonstradas nos últimos anos, através de aplicações em estudos de interacções de bioligandos [88], em associação com o conceito BI [89], na monitorização de processos de fermentação em linha [90, 91] e na separação de aniões em associação com a electroforese capilar [92].

As vantagens que os sistemas LOV trazem à Análise Química em fluxo são a inerente compactação dos equipamentos utilizados, o controlo informático de todas as etapas do procedimento experimental, e ainda, a integração de todos os componentes da montagem numa estrutura rígida o que melhora a reprodutibilidade das operações de processamento das amostras.

1.3.1.6. Multi-impulsão

1.3.1.6.1. Conceitos gerais

Os sistemas de fluxo que exploram o conceito de multi-impulsão foram recentemente propostos como uma nova estratégia para a manipulação de soluções de amostra e de reagentes, e para a automatização analítica [93].

Em multi-impulsão, ao contrário das metodologias de fluxo previamente propostas, e mais concretamente a análise por injeção em fluxo [25], a análise por injeção sequencial [38] ou a multicomutação [43], as etapas sucessivas de

um procedimento típico em fluxo, como a inserção de amostra, adição de reagentes e propulsão das soluções, são efectuadas pelo mesmo componente da montagem e não por dispositivos activos distintos e individuais.

Os sistemas de fluxo baseados no conceito de multi-impulsão (Figura 1.46) são baseados na utilização de dispositivos solenóides responsáveis pela impulsão de volumes impostos pelos dispositivos (como por exemplo, 3, 8, 25 e 50 μL) por cada activação (pulsos). Estes dispositivos (micro-bombas), possibilitam a montagem de sistemas analíticos automatizados e facilmente controlados por computador, visto que todas as operações fundamentais envolvidas numa análise química em fluxo, incluindo a inserção de amostra, a adição de reagentes, a mistura das soluções e o transporte da zona de reacção podem ser efectuadas por esses mesmos componentes.

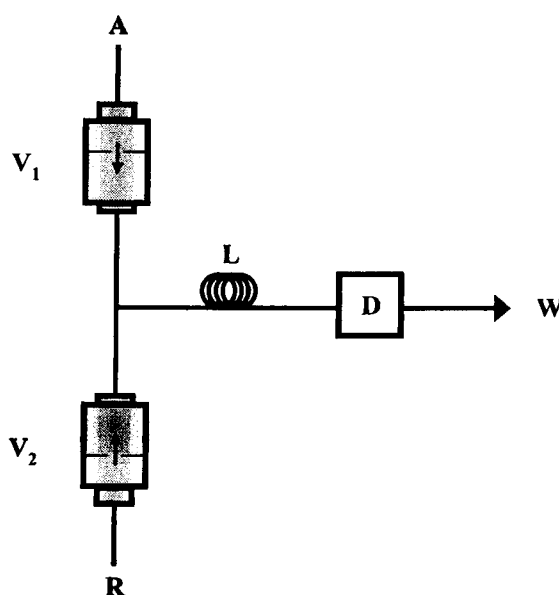


Figura 1.46

Montagem de fluxo de multi-impulsão convencional. V_1 e V_2 – micro-bombas; A – amostra; R – reagente; L – reactor; D – detector; W – dreno.

As micro-bombas funcionam simultaneamente como unidades propulsoras de líquidos, de inserção de amostra, e elementos comutadores, simplificando muito a configuração e controlo dos sistemas de fluxo através da redução do número de elementos constituintes de um sistema, e minimizando a complexidade do seu controlo ou também a probabilidade de ocorrência de falhas de funcionamento.

As micro-bombas podem debitar com reprodutibilidade, distintos volumes de solução com diferentes frequências de actuação, assegurando a obtenção de fluxos com caudais médios estáveis.

No entanto, nos sistemas de fluxo baseados no conceito de multi-impulsão, em vez de um fluxo laminar, é produzido um fluxo pulsado que pode ser visto como uma cadeia contínua de segmentos muito pequenos, sendo que cada um desses segmentos corresponde a um determinado volume de solução resultante de cada activação das micro-bombas, conferindo a estes sistemas características hidrodinâmicas diferentes dos outros sistemas de fluxo.

Ao contrário do típico fluxo laminar associado com os sistemas de fluxo contínuo, cada pulso das micro-bombas origina um movimento caótico das soluções em todas as direcções dando origem a uma mistura amostra/reagente muito rápida e melhorada, com baixa dispersão axial, o que consequentemente contribui para o desenvolvimento da reacção e, um aumento da resposta analítica. O fluxo pulsado é a característica dominante dos sistemas baseados no conceito de multi-impulsão, originando uma rápida e íntima mistura de reagentes.

Neste sentido, o volume do pulso, que é determinado pelas características estruturais das micro-bombas (que podem ser como já referido, de 3, 8, 25 e 50 μL), é um parâmetro de grande importância em relação à eficácia de homogeneização da zona de reacção, porque o fluxo originado pelo funcionamento das micro-bombas é constituído por segmentos de volumes correspondentes aos volumes internos das micro-bombas. Quanto menor for o

volume interno das micro-bombas, também é menor o volume de cada segmento de solução introduzida no sistema.

As micro-bombas conferem elevada versatilidade aos sistemas de fluxo desenvolvidos, o que possibilita a utilização de diferentes procedimentos para a manipulação das amostras incluindo desde variações no volume introduzido que é dependente do número de pulsos, até a diferentes estratégias de amostragem como por exemplo, amostragem binária e confluência de zonas, sem necessidade de reconfiguração da montagem analítica.

Sendo as micro-bombas responsáveis pela introdução individual de amostra e reagentes, um sistema de fluxo baseado no conceito de multi-impulsão possibilita um efectivo e preciso controlo do volume introduzido de amostra e dos volumes das restantes soluções, sejam estes definidos com base numa inserção temporizada ou com base numa contagem de pulsos das micro-bombas, assim como, o transporte da zona de reacção para detecção, ou para outra fase analítica, é também facilmente controlável através de instruções inseridas no computador.

No trabalho citado anteriormente [93], em que os elementos activos do sistema de fluxo desenvolvido foram micro-bombas, capazes de debitar volumes de pulso entre 3 e 25 μL , os resultados obtidos demonstraram que o volume do pulso e a frequência dos pulsos desempenham um papel decisivo no desenvolvimento da reacção, afectando de igual modo o perfil do sinal analítico.

O fluxo pulsado característico dos sistemas de fluxo baseados no conceito de multi-impulsão, e o facto das micro-bombas possuírem um controlo individualizado e serem responsáveis pela distinta introdução de amostra e reagentes no fluxo, proporciona algumas vantagens nas determinações analíticas, nomeadamente quando se utiliza um sistema de detecção de quimioluminescência, por exemplo.

A quimioluminescência é usualmente gerada por reacções muito rápidas, e consequentemente, este fenómeno convém que seja registado quando a reacção química responsável pela emissão de luz é iniciada em frente ao detector de luz, mais concretamente na célula de medição, implicando alguns requisitos quando se pretende implementar este sistema de detecção numa análise em fluxo, como por exemplo, um controlo preciso sobre o processo de mistura da amostra e reagentes, e também sobre o caudal.

A combinação do fluxo pulsado, com a simplicidade das montagens analíticas e o controlo automático individualizado das micro-bombas, confere à multi-impulsão os meios necessários para desenvolver um sistema de fluxo caracterizado por um desenvolvimento rápido da reacção, baixo consumo de reagentes e uma variedade de intervenções sobre a zona de amostra sem implicar alterações físicas na montagem. Estas vantagens podem ser aproveitadas para o desenvolvimento de sistemas de análise em fluxo com detecção por quimioluminescência, providenciando os meios para colmatar algumas dificuldades quando se realizam análises com aquele sistema de detecção.

1.3.1.6.2. Evolução da Multi-Impulsão

Em 1980, Taylor *et al.* [94], desenvolveram um sistema analítico que denominaram “fluxo acelerado por pulsos” (do inglês, “pulsed-accelerated-flow”), que envolvia a inserção de volumes pequenos de soluções (pulsos) com uma frequência constante, através do uso de uma seringa acoplada a um computador. Este sistema serviu unicamente para avaliar a cinética de reacções químicas rápidas [95-97].

No Japão, em 1994, Korenaga *et. al.* [98] realizaram um estudo detalhado das características físicas de uma mistura de duas soluções provenientes de dois canais separados, por intermédio de uma comparação entre a utilização de uma bomba peristáltica para fornecimento desses dois canais e a utilização de dois dispositivos de impulsão por pulsos com débitos entre 0,01 e 5,0 mL. Similarmente, esses dispositivos solenóides de impulsão foram usados para a determinação de alguns parâmetros de interesse ambiental, num sistema de injeção em fluxo, em 1996, por Weeks *et. al.* [99].

A influência do fluxo pulsado em sistemas de micro-fluxo foi avaliada em 1999, por Linden *et. al.* [100], através de um comparativo com fluxo contínuo e fluxo com paragem. Verificou-se que a partir de uma frequência de 1 Hz para um fluxo pulsado não havia diferenças na dispersão da amostra em relação ao fluxo contínuo.

O trabalho de revisão de Karlberg *et. al.* [101], em 2002, sobre o uso do fluxo pulsado na análise em fluxo, também referenciou os trabalhos que envolveram o uso de micro-bombas para impulsão de soluções em micro-canais gravados num bloco de plástico, ou em tubos capilares onde ocorressem processos extractivos [102-106]. O aproveitamento do fluxo pulsado para a detecção quimioluminométrica também foi salientado [107-109].

Em 2002, Santos *et. al.* [93] propuseram uma nova estratégia para a análise em fluxo que envolveu a utilização de múltiplas micro-bombas (Figura 1.47). O trabalho explorou a selecção de diferentes volumes de amostra, estratégias de amostragem, caudais e manuseamento da zona de reacção, através do controlo preciso de cada pulso de cada bomba. Esses estudos realizaram-se por intermédio da determinação espectrofotométrica de crómio (VI) em águas, por reacção com 1,5-difenilcarbazida.

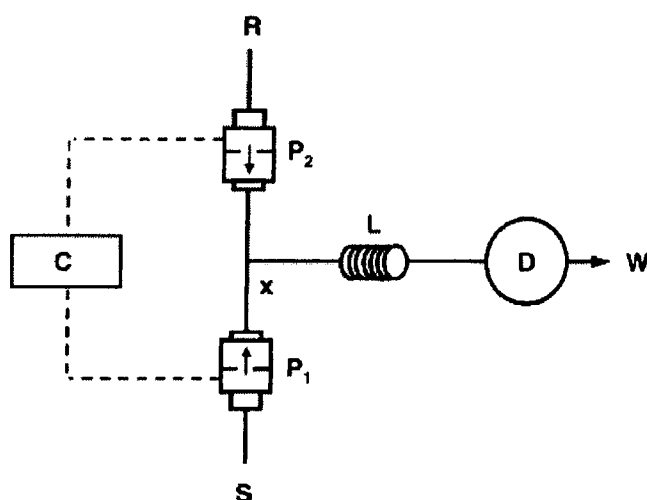


Figura 1.47

Montagem de fluxo de multi-impulsão. P₁ e P₂ – micro-bombas; S – amostra; R – reagente; L – reactor; D – detector; W – dreno; x – confluência; C – interface de controlo. Adaptado de [93].

Ainda no mesmo ano, Zagatto *et. al.* [110] desenvolveram um sistema de fluxo baseado no conceito de multi-impulsão para a determinação espectrofotométrica de ácido fítico em extractos de plantas, por reacção com salicilato de ferro (III), e envolvendo extracções em colunas de troca-iónica (Figura 1.48). O ritmo de amostragem foi de 150 determinações por hora.

Lima *et. al.* [111] em 2003, exploraram o fluxo pulsado inerente aos sistemas de fluxo multi-impulsão, e que assegura óptimas condições de mistura, facilitando a homogeneização da zona de amostra, na determinação da bromexina em formulações farmacêuticas (Figura 1.49).

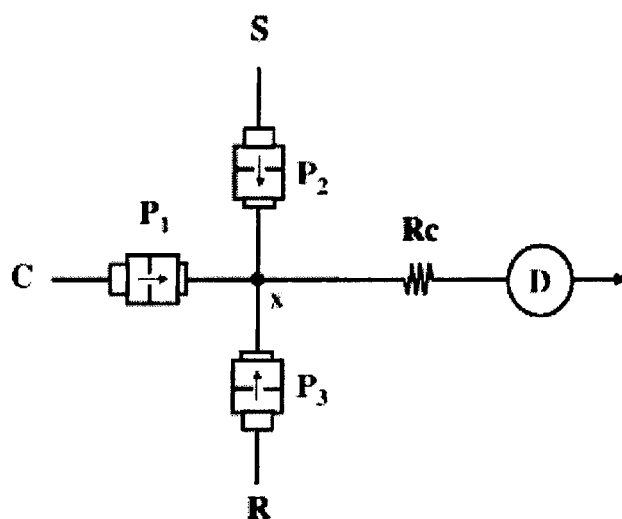


Figura 1.48

Montagem de fluxo de multi-impulsão para a determinação de ácido fítico. P₁ a P₃ – microbombas; S – amostra; R – reagente; C – transportador; Rc – reator; D – detector; x – confluência. Adaptado de [110].

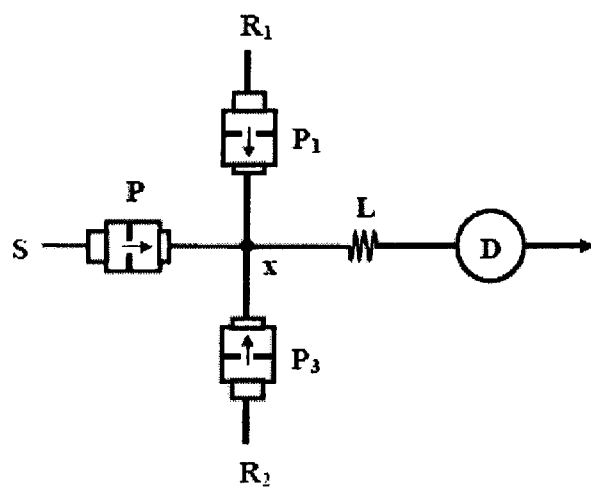


Figura 1.49

Montagem de fluxo de multi-impulsão para a determinação de bromexina. P₁ a P₃ – microbombas; S – amostra; R₁ e R₂ – reagentes; C – transportador; L – reator; D – detector; x – confluência. Adaptado de [111].

Também em 2003, Santos *et. al.* [112] desenvolveram outro sistema de fluxo explorando o conceito de multi-impulsão para a determinação espectrofotométrica de dipirona em preparações farmacêuticas, com um ritmo de amostragem de 50 determinações por hora (Figura 1.50).

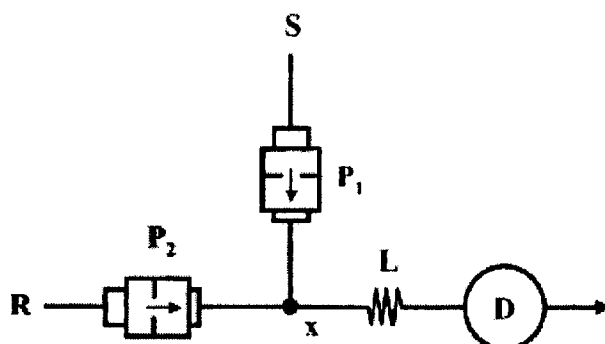


Figura 1.50

Montagem de fluxo de multi-impulsão para a determinação de dipirona. P₁ e P₂ – micro-bombas; S – amostra; R – reagente; L – reactor; D – detector; x – confluência. Adaptado de [112].

Em 2004, Lima *et. al.* [113] publicaram um artigo de revisão dos sistemas de fluxo de multi-impulsão. Neste trabalho foi salientado o controlo individualizado de cada bomba, o que consequentemente possibilita uma inserção de amostra e reagentes caracteristicamente versátil e selectiva.

Carneiro *et. al.* [114], em 2005, desenvolveram um trabalho que envolvia a determinação espectrofotométrica de glucose e frutose em xaropes, por intermédio de um sistema de análise em fluxo baseado no conceito de multi-impulsão (Figura 1.51). Para efectuar as determinações, cápsulas contendo xarope eram inseridas directamente num vaso acoplado ao sistema, onde eram dissolvidas por um

processo de dissolução em linha, e depois as amostras dissolvidas eram sujeitas a processos de diluição também em linha, e por fim ocorria a determinação dos açúcares redutores. Para tal, realizou-se a oxidação dos açúcares com excesso de periodato, e quantificação do periodato excedente após a sua conversão a complexos de triiodeto pela adição de iodeto. A discriminação na quantificação dos açúcares foi conseguida pela sua diferente cinética de oxidação. O ritmo de amostragem foi de 50 determinações por hora.

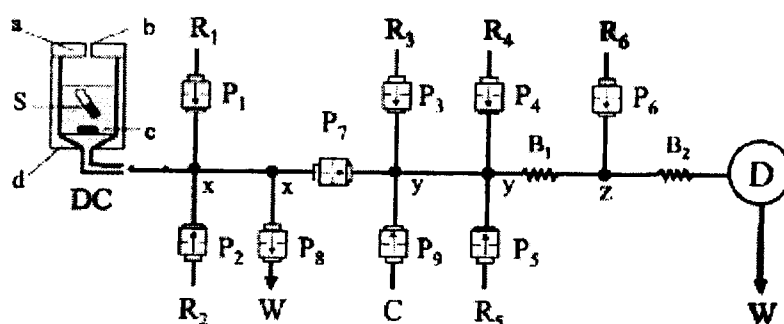


Figura 1.51

Montagem de fluxo de multi-impulsão para a determinação de glucose e frutose. P₁ a P₆ – microbombas; C – transportador da amostra; S – amostra; R₁ a R₆ – reagentes; B₁ e B₂ – reactores; D – detector; DC – câmara de dissolução; x, y, z – confluências. Adaptado de [114].

Também em 2005, Morales-Rubio *et. al.* [115], desenvolveram um método para a determinação espectrofotométrica de surfactantes aniônicos em água, baseado na substituição do laranja de metilo pelos surfactantes aniônicos, na formação do par-iônico com o ião cetil-piridina, a pH 5,0, através de um sistema de fluxo que explorava o conceito de multi-impulsão (Figura 1.52). Neste trabalho foi obtido um ritmo de 60 determinações por hora.

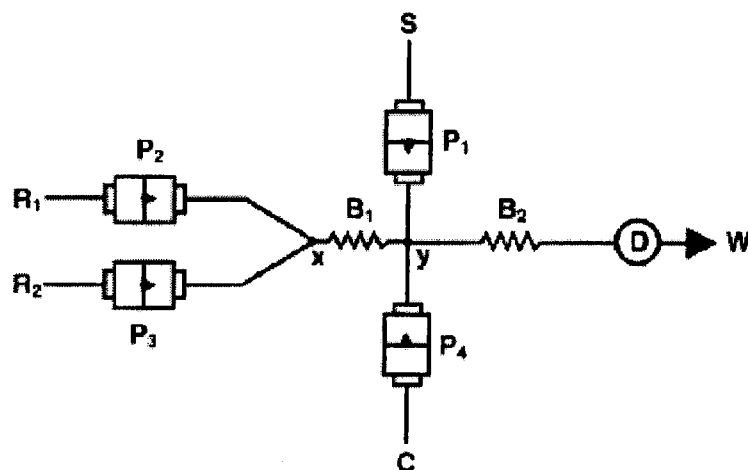


Figura 1.52

Montagem de fluxo de multi-impulsão para a determinação de surfactantes aniônicos. P₁ a P₄ – micro-bombas; R₁ e R₂ – reagentes; S – amostra; C – transportador; B₁ e B₂ – reactivos; D – detector; W – dreno; x, y – confluências. Adaptado de [115].

Santos *et. al.* [116], em 2005, exploraram o fluxo pulsado para a determinação quimioluminométrica de metformina em formulações farmacêuticas (Figura 1.53). O fluxo pulsado assegurou uma eficiente mistura amostra/reagente, e uma mais rápida e eficiente homogeneização da zona de reacção, e consequentemente, possibilitou a obtenção de um sinal analítico melhor. Este trabalho possibilitou efectuar 95 determinações por hora.

Ainda em 2005, Santos *et. al.* [117], realizaram um trabalho de análise em fluxo por multi-impulsão para a determinação de ambroxol em formulações farmacêuticas, através de um método espectrofotométrico, por reacção com p-dimetilaminobenzaldeído (Figura 1.54). O ritmo de amostragem obtido foi de 60 determinações por hora.

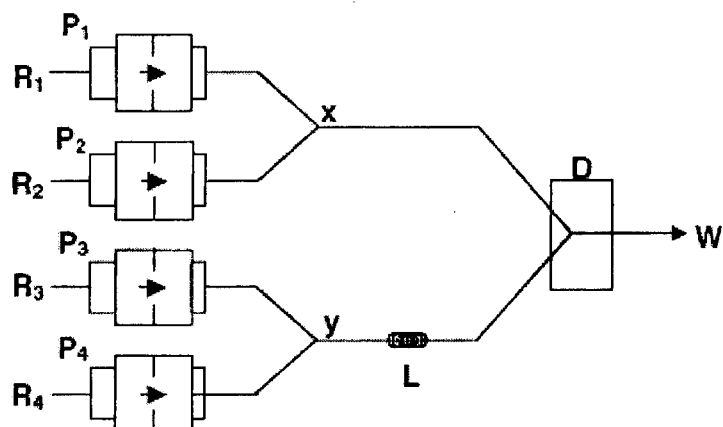


Figura 1.53

Montagem de fluxo de multi-impulsão para a determinação de metformina. P_1 a P_4 – micro-bombas; R_1 a R_4 – reagentes; L – reactor; D – detector; W – dreno; x , y – confluências. Adaptado de [116].

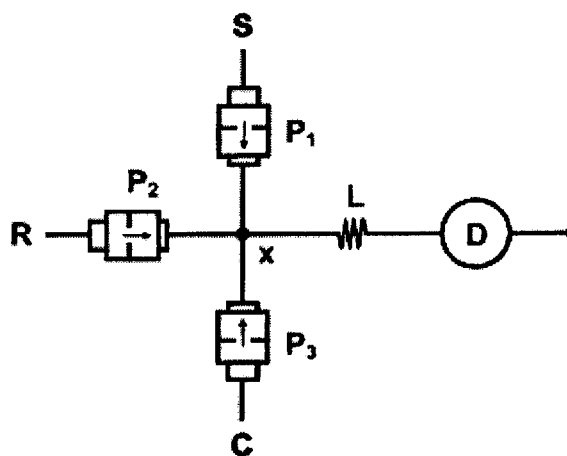


Figura 1.54

Montagem de fluxo de multi-impulsão para a determinação de ambroxol. P_1 a P_3 – micro-bombas; R – reagente; S – amostra; C – transportador; L – reactor; D – detector; W – dreno; x – confluência. Adaptado de [117].

1.4 Metodologias analíticas automáticas para a análise de produtos farmacêuticos

O crescimento contínuo no desenvolvimento de novos fármacos dos diversos grupos terapêuticos e na investigação dos efeitos originados quando aplicados em tratamentos, motivou a procura de metodologias mais eficientes e, sobretudo, com uma maior componente de automatização. Deste modo, a análise de fármacos, quer na forma de formulações farmacêuticas, quer como matéria-prima para a sua produção, e a sua determinação, conjuntamente com a dos seus metabolitos, em amostras biológicas (soro, plasma, urina e outros fluidos), constitui grande parte da actividade desenvolvida pelos laboratórios farmacêuticos e clínicos.

Em termos de análise farmacêutica, a FIA é sem dúvida a metodologia mais divulgada e mais utilizada nos trabalhos científicos publicados, devido à sua antiguidade que lhe confere um conhecimento e aceitação superiores aos das outras metodologias. Mas, além da antiguidade, existe outro factor que justifica o grau de divulgação científica de FIA, e que é o requisito de conhecimentos, e respectivo equipamento, informático e electrónico, de modo a possibilitar a utilização das outras metodologias de análise em fluxo.

A multicomutação tem um campo de aplicação por enquanto bastante limitado, embora devido ao seu potencial analítico, as perspectivas futuras sejam muito positivas. Por isso, foi realizada a sua avaliação em determinações farmacêuticas. A multi-impulsão, como metodologia de fluxo mais recente, e por isso, com um inferior número de aplicações publicadas, possibilita um manuseamento diferente das soluções, e esta característica deve ser explorada de modo a fornecer indicações da sua utilização frequente em determinações farmacêuticas.

Neste trabalho pretendeu avaliar-se o potencial das metodologias de fluxo baseadas em multicomutação e multi-impulsão na análise de produtos farmacêuticos, de maneira a que pudessem constituir alternativas aos procedimentos já utilizados. Com as metodologias desenvolvidas procurou-se também que possibilitassem diferentes tipos de manuseamento da amostra, que funcionassem como estratégias analíticas inovadoras, e que pudessem ser aplicadas a distintas situações analíticas, envolvendo diminutas alterações ao nível de configuração física das montagens e de programação de controlo dos sistemas.

1.5 Referências bibliográficas

- 1 M. de la Guardia, J. Braz. Chem. Soc., 10, 429 (1999)
- 2 K. Grudpan, Talanta, 64, 1084 (2004)
- 3 M. de la Guardia, J. Ruzicka, Analyst, 120, 17N (1995)
- 4 W. Wardencki, J. Curylo, J. Namiesnik, Pol. J. Environ. Stud., 14, 389 (2005)
- 5 F. R. P. Rocha, J. A. Nóbrega, O. Fatibello Fº., Green Chem., 3, 216 (2001)
- 6 B. F. Reis, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta, 392, 265 (1999)
- 7 M. D. Luque de Castro, Pure Appl. Chem., 74, 2293 (2002)
- 8 G. D. Christian, Anal. Chem., 67, A532 (1995)
- 9 B. F. Reis, Quim. Nova, 19, 51 (1996)
- 10 J. Ruzicka, E. H. Hansen, Anal. Chim. Acta, 78, 145 (1975)
- 11 C. E. Hammer, "Drug Development", CRC Press, Boca Raton (1986)
- 12 J. T. Carstensen, "Drug Stability", Marcel Dekker Inc., New York, USA (1990)
- 13 C. A. Johnson, J. Pharm. Biomed. Anal., 4, 689 (1986)
- 14 D. Schirmer, "Modern Methods of Pharmaceutical Analysis", CRC, Florida, USA (1982)
- 15 A. H. Beckett, J. B. Stenlake, "Practical Pharmaceutical Chemistry". The Athlone Press, London, UK (1988)
- 16 Remington, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1990)

- 17 P. MacLaurin, K. J. Parker, A. Townshend, P. J. Warsfold, N. W. Barnett, M. Crane, *Anal. Chim. Acta*, 238, 171 (1990)
 - 18 P. MacLaurin, P. J. Warsfold, A. Townshend, N. W. Barnett, M. Crane, *Analyst*, 116, 701 (1991)
 - 19 Z. L. Fang, Q. Fang, X. Z. Liu, H. W. Chen, C. L. Liu, *Trends Anal. Chem.*, 18, 261 (1999)
 - 20 B. F. Rocks, *Anal. Proc.*, 26, 321 (1989)
 - 21 E. H. Hansen, *Talanta*, 64, 1076 (2004)
 - 22 J. Namiesnik, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 30, 221 (2000)
 - 23 J. M. Calatayud, "Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals", Taylor & Francis, London, UK (1996)
 - 24 H. M. Kingston, M. L. Kingston, *Pure & Appl. Chem.*, 66, 609 (1994)
 - 25 J. Ruzicka, E. H. Hansen, "Flow Injection Analysis", 2 ed., John Wiley and Sons, New York (1988)
 - 26 W. E. Linden, *Pure Appl. Chem.*, 66, 2493 (1994)
 - 27 L.T. Skeggs, *Am. J. Clin. Pathol.*, 28, 311 (1957)
 - 28 J. P. Kutter (ED.), Special issue: miniaturization in analytical chemistry, *Talanta*, 56, 221 (2002)
 - 29 <http://www.flowinjection.com>
 - 30 J. Ruzicka, H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, 78, 145 (1975)
 - 31 H. Bergamim F., E. A. G. Zagatto, F. J. Krug, B. F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 101, 17 (1978)
 - 32 F. J. Krug, H. Bergamim F., E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 179, 103 (1986)
 - 33 B. F. Reis, H. Bergamim F., *Quim. Nova*, 16, 570 (1993)
 - 34 W. J. Hurst, "Automation in the laboratory", VHC Publishers Inc., New York (1995)
-

- 35 E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, 308, 3 (1995)
 - 36 G. D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta*, 261, 11 (1992)
 - 37 J. Alonso, J. Bartrolí, M. Del Valle, M. Escalada, R. Barber, *Anal. Chim. Acta*, 199, 191 (1990)
 - 38 J. Ruzicka, G. D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, 237, 329 (1990)
 - 39 P.J. Baxter, G.D. Christian, *Acc. Chem. Res.*, 29, 515 (1996)
 - 40 J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Anal. Chem.*, 72, 212A (2000)
 - 41 G. D. Christian, *Analyst*, 119, 2309 (1994)
 - 42 J. L. M. Santos, "Sistemas de fluxo multicomutado aplicados à análise de produtos farmacêuticos", Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, 2000
 - 43 B. F. Reis, M. F. Giné, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. S. Lapa, *Anal. Chim. Acta*, 293, 129 (1994)
 - 44 S. D. Rothwell, A. A. Woolf, *Talanta*, 32, 431 (1985)
 - 45 D. J. Malcolm-Lawes, G. A. Milligan, R. Newton, *J. Autom. Chem.*, 9, 179 (1987)
 - 46 D. J. Malcolm-Lawes, C. Pasquini, *J. Autom. Chem.*, 10, 25 (1988)
 - 47 C. Riley, L. H. Aslett, B. F. Rocks, R. A. Sherwood, J. D. Watson, J. Morgon, *Clin. Chem.*, 29, 332 (1983)
 - 48 C. Pasquini, L. C. de Faria, *J. Autom. Chem.*, 13, 143 (1991)
 - 49 B. F. Reis, M. F. Giné, F. J. Krug, H. Bergamin F., *J. Anal. At. Spectrom.*, 7, 865 (1992)
 - 50 H. Hara, N. Ishio, K. Takahashi, *Anal. Chim. Acta*, 281, 45 (1993)
 - 51 P. B. Martelli, B. F. Reis, E. A. M. Kronka, H. Bergamin F., M. Korn, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, A. N. Araújo, *Anal. Chim. Acta*, 308, 397 (1995)
-

- 52 A. N. Araújo, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 310, 447 (1995)
- 53 C. C. Oliveira, R. P. Sartini, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 332, 173 (1996)
- 54 E. A. M. Kronka, B. F. Reis, M. Korn, H. Bergamin F., *Anal. Chim. Acta*, 334, 287 (1996)
- 55 J. A. Vieira, B. F. Reis, E. A. M. Kronka, A. P. S. Paim, M. F. Giné, *Anal. Chim. Acta*, 366, 251 (1998)
- 56 M. Korn, L. F. B. P. Gouveia, E. Oliveira, B. F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 313, 177 (1995)
- 57 P. B. Martelli, B. F. Reis, M. Korn, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, 387, 165 (1999)
- 58 A. P. S. Paim, B. F. Reis, *Anal. Sci.*, 16, 487 (2000)
- 59 R. S. Honorato, M. C. U. Araújo, G. Veras, E. A. G. Zagatto, R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, *Anal. Sci.*, 15, 665 (1999)
- 60 C. M. N. V. Almeida, R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, E. A. G. Zagatto, M. C. U. Araújo, *Anal. Chim. Acta*, 407, 213 (2000)
- 61 C. M. N. V. Almeida, R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, M. C. U. Araújo, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, *Analyst*, 125, 333 (2000)
- 62 A. P. S. Paim, C. M. N. V. Almeida, B. F. Reis, R. A. S. Lapa, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28, 1221 (2002)
- 63 X. D. Wang, T. J. Cardwell, R. W. Cattrall, R. P. Dyson, G. E. Jenkins, *Anal. Chim. Acta*, 368, 105 (1998)
- 64 E. Kronka, B. F. Reis, J. A. Vieira, T. Blanco, A. P. Gervásio, *Quim. Nova*, 20, 372 (1997)
- 65 C. A. Tumang, G. C. Luca, R. N. Fernandes, B. F. Reis, F. J. Krug, *Anal. Chim. Acta*, 374, 53 (1998)

- 66 R. N. Fernandes, B. F. Reis, *Talanta*, 58, 729 (2002)
- 67 R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, J. L. M. Santos, *Anal. Chim. Acta*, 407, 225 (2000)
- 68 M. F. Giné, A. P. Packer, T. Blanco, B. F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 323, 47 (1996)
- 69 L. F. Gouveia, J. L. F. C. Lima, J. A. G. Morais, *Anal. Chim. Acta*, 366, 271 (1998)
- 70 F. R. P. Rocha, P. B. Martelli, R. M. Frizzarin, B. F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 366, 45 (1998)
- 71 R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, J. L. M. Santos, *Anal. Chim. Acta*, 419, 17 (2000)
- 72 R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 366, 209 (1998)
- 73 C. E. S. Miranda, B. F. Reis, N. Baccan, A. P. Packer, M. F. Giné, *Anal. Chim. Acta*, 453, 301 (2002)
- 74 M. M. Silva, M. A. Z. Arruda, F. J. Krug, P. V. Oliveira, Z. F. Queiroz, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 368, 255 (1998)
- 75 D. Pozebon, V. L. Dressler, A. J. Curtius, *J. Anal. At. Spectrom*, 13, 363 (1998)
- 76 J. Michalowski, P. Halaburda, A. Kojlo, *Anal. Lett.*, 33, 1373 (2000)
- 77 C. A. Giacomozzi, R. R. U. Queiróz, I. G. Souza, J. A. G. Neto, *J. Autom. Methods Manage. Chem.*, 21, 17 (1999)
- 78 R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 351, 223 (1997)
- 79 R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, *Anal. Chim. Acta*, 377, 103 (1998)

- 80 F. R. P. Rocha, B. F. Reis, J. J. R. Rohwedder, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 370, 22 (2001)
 - 81 F. R. P. Rocha, P. B. Martelli, B. F. Reis, *Talanta*, 55, 861 (2001)
 - 82 F. R. P. Rocha, B. F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 409, 227 (2000)
 - 83 F. R. P. Rocha, P. B. Martelli, B. F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 438, 11 (2001)
 - 84 V. Cerda, J. M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, *Talanta*, 50, 695 (1999)
 - 85 M. Miró, V. Cerda, J. M. Estela, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 21, 199 (2002)
 - 86 J. Ruzicka, *Analyst*, 125, 1053 (2000)
 - 87 CD-ROM "Sequential Injection for Biomelecular Assays", FIALab Instruments, Bellevue, USA
 - 88 A. D. Carrol, L. Scampavia, J. Ruzicka, *Analyst*, 127, 1228 (2002)
 - 89 C. M. Schulz, L. Scampavia, J. Ruzicka, *Analyst*, 127, 1583 (2002), C. M. Schulz, J. Ruzicka, *Analyst*, 127, 1293 (2002)
 - 90 C. H. Wu, L. Scampavia, J. Ruzicka, B. Zamost, *Analyst*, 126, 291 (2001)
 - 91 C. H. Wu, L. Scampavia, J. Ruzicka, *Analyst*, 126, 1947 (2002)
 - 92 C. H. Wu, L. Scampavia, J. Ruzicka, *Analyst*, 127, 898 (2002)
 - 93 R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 466, 125 (2002)
 - 94 G. D. Owens, R. W. Taylor, T. Y. Ridley, D. W. Margerum, *Anal. Chem.*, 52, 130 (1980)
 - 95 S. A. Jacobs, M. T. Nemeth, G. W. Kramer, T. Y. Ridley, D. W. Margerum, *Anal. Chem.*, 56, 1058 (1984)
 - 96 M. T. Nemeth, K. D. Fogelman, T. Y. Ridley, D. W. Margerum, *Anal. Chem.*, 59, 283 (1987)
-

- 97 C. P. Bowers, K. D. Fogelman, J. C. Nagy, T. Y. Ridley, Y. L. Wang, S. W. Evetts, D. W. Margerum, *Anal. Chem.*, 69, 431 (1997)
 - 98 T. Korenaga, X. Zhou, T. Moriwake, H. Muraki, T. Naito, S. Sanuki, *Anal. Chem.*, 66, 73 (1994)
 - 99 D. A. Weeks, and K. S. Johnson, *Anal. Chem.*, 68, 2717 (1996)
 - 100 E. B. van Akker, M. Bos, W. E. van der Linden, *Anal. Chim. Acta*, 378, 111 (1999)
 - 101 P. S. Francis, S. W. Lewis, K. F. Lim, K. Carlsson, Bo Karlberg, *Talanta*, 58, 1029 (2002)
 - 102 K. Carlsson, H. S. Jacobsen, A. L. Jensen, T. Stenstrøm, Bo Karlberg, *Anal. Chim. Acta*, 354, 35 (1997)
 - 103 K. Carlsson, L. Moberg, Bo Karlberg, *Water Res.*, 33, 375 (1999)
 - 104 K. Carlsson, Bo Karlberg, *Anal. Chim. Acta*, 423, 137 (2000)
 - 105 K. Carlsson, Bo Karlberg, *Anal. Chim. Acta*, 415, 1 (2000)
 - 106 K. Carlsson, Bo Karlberg, *Anal. Chim. Acta*, 434, 149 (2001)
 - 107 X. D. Wang, T. J. Cardwell, R. W. Cattrall, G. E. Jenkins, *Anal. Commun.*, 35, 97 (1998)
 - 108 S. W. Lewis, P. S. Francis, K. F. Lim, G. E. Jenkins, X. D. Wang, *Analyst*, 125, 1869 (2000)
 - 109 S. W. Lewis, P. S. Francis, K. F. Lim, G. E. Jenkins, *Anal. Chim. Acta*, 461, 131 (2002)
 - 110 J. M. T. Carneiro, E. A. G. Zagatto, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, 474, 161 (2002)
 - 111 A. C. B. Dias, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 499, 107 (2003)
 - 112 J. L. F. C. Lima, S. M. O. Sá, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32, 1011 (2003)
-

- 113 J. L. F. C. Lima, J. L. M. Santos, A. C. B. Dias, M. F. T. Ribeiro, E. A. G. Zagatto, *Talanta*, 64, 1091 (2004)
- 114 J. M. T. Carneiro, A. C. B. Dias, E. A. G. Zagatto, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, 531, 279 (2005)
- 115 A. F. Lavorante, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, B. F. Reis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 381, 1305 (2005)
- 116 K. L. Marques, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382, 452 (2005)
- 117 J. L. M. Santos, A. Clausse, J. L. F. C. Lima, M. L. M. F. S. Saraiva, A. O. S. Rangel, *Anal. Sci.*, 21, 1 (2005)

CAPÍTULO

2

PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão abordados os procedimentos gerais utilizados na preparação das soluções, e também serão referidos os equipamentos usados, sendo dada uma especial ênfase às suas características e modo de funcionamento. Serão igualmente discutidos os aspectos fundamentais que condicionam a sua utilização.

2.1. Introdução

Em virtude de nos trabalhos apresentados ao longo desta dissertação existirem aspectos experimentais comuns, eles serão apresentados conjuntamente neste capítulo de forma a evitar repetições desnecessárias nos restantes. Nesses realçam-se apenas os aspectos específicos relacionados com os conceitos apresentados.

Assim, aqui será descrito em primeiro lugar o procedimento geral de preparação de reagentes e soluções. Descreve-se, em seguida, o equipamento usado nas montagens dos sistemas de fluxo desenvolvidos, bem como a sua interligação e os parâmetros de controlo, nomeadamente tempos de amostragem, frequências de passo e tempos de pulso. Apresenta-se, por último, os procedimentos de avaliação dos resultados obtidos nos diversos trabalhos, usados como critério de comparação com os resultados obtidos pelas metodologias de referência.

Serão feitas referências especiais às válvulas de inserção utilizadas, dado o papel preponderante que desempenham nas montagens desenvolvidas, determinando e caracterizando o desempenho dos sistemas de fluxo implementados.

2.2. Reagentes e soluções

A água utilizada na preparação das soluções foi água bidesionizada com uma condutividade inferior a $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Os reagentes utilizados para a preparação das soluções foram de qualidade p.a. ou semelhante, sem qualquer processo de tratamento ou purificação adicional. De igual modo, os fármacos, na sua forma pura, usados na preparação das soluções

padrão foram, sempre que possível, seleccionados de acordo com as características exigidas pela Farmacopeia Portuguesa VI [1].

2.3. Equipamento e instrumentação

A água bidesionizada utilizada na preparação das soluções foi obtida por passagem sequencial através de duas colunas com resinas, da marca Millipore, adaptadas num sistema de ultra-purificação da água, da marca Milli-Q, modelo RG.

Para a medição automática de volumes rigorosos recorreu-se a pipetas da marca Gilson, de volume regulável, modelos P100, P200, P1000 e P5000, verificando periodicamente as suas condições de funcionamento de acordo com o procedimento especificado pelo fabricante.

Nos métodos de referência que envolviam determinações espectrofotométricas, com o objectivo de avaliar comparativamente os resultados obtidos pelas metodologias desenvolvidas, foi utilizado um espectrofotómetro UV/VIS de feixe duplo, da marca Perkin-Helmer Instruments, modelo Lambda 45. Nos métodos de referência, quando foi necessário efectuar titulações potenciométricas, utilizou-se um titulador automático desenvolvido no laboratório de Química-Física, o qual era constituído por uma bureta automática Crison, modelo Micro BU 2031, um decimilivoltímetro de alta impedância (com uma sensibilidade de $\pm 0,1$ mV) da marca Crison, modelo 2002, um agitador Crison, modelo Micro ST 2039, um eléctrodo de pH Ingold, referência 10/402 e um eléctrodo de dupla junção Orion, referência 900200. A unidade de controlo do titulador automático foi um microcomputador Hyundai Super 16, equipado com uma placa de aquisição e controlo analógico-digital Advantech, modelo PCL-720.

As titulações efectuadas com detecção visual do ponto de equivalência por intermédio de um indicador foram realizadas pelo método tradicional, com o recurso a buretas de vidro.

Os sistemas de fluxo desenvolvidos no âmbito desta dissertação foram montados com base em equipamentos e componentes comuns entre todas as montagens analíticas de fluxo. A descrição dos equipamentos e componentes das montagens analíticas desenvolvidas encontra-se referida em seguida, agrupada de acordo com o conceito de fluxo explorado, ou seja, multicomutação e multi-impulsão.

2.3.1. Montagens de fluxo baseadas no conceito de multicomutação

2.3.1.1. Sistemas de propulsão e transporte

O conceito de multicomutação permite, tal como foi referido anteriormente, que um sistema de análise em fluxo seja operado com base em redes de fluxo através duma selecção de percursos analíticos. Esta característica possibilita a inserção, selecção e transporte, quer de reagentes quer de amostras, num mesmo canal de fluxo, por intermédio da colocação do sistema propulsor após o detector.

Nesta perspectiva, a escolha do sistema propulsor da montagem de fluxo e a opção entre efectuar aspiração ou impulsão das soluções, ficou dependente dos seguintes factores: necessidade da obtenção de um caudal constante, sendo este um aspecto decisivo no sentido de assegurar uma adequada reprodutibilidade em termos de amostragem temporizada da amostra e transporte da zona de reacção; simplificação da montagem analítica; e, ainda, a facilidade de operação e controlo. Tendo em atenção os aspectos referidos, conclui-se que uma bureta automática,

baseada no deslocamento contínuo e robusto de um êmbolo, reúne uma série de características que confere vantagens na sua utilização, em detrimento do uso muito generalizado das bombas peristálticas, que implicavam a aplicação de diversas estratégias para compensar efeitos negativos de irreprodutibilidade no fluxo, como por exemplo, o fluxo latejado originado pelo movimento dos rolamentos.

No entanto, quando se considera como factor decisivo da escolha o posicionamento do sistema propulsor na montagem, a bomba peristáltica apresenta-se com mais vantagens quando se opta por impulsão, uma vez que permite transportar simultaneamente mais do que uma solução, ao passo que com a utilização de buretas automáticas seriam necessárias, para o mesmo efeito, uma bureta por cada solução impulsão. Em modo de aspiração uma bureta automática torna-se a melhor opção, principalmente quando utilizada num sistema de fluxo baseado no conceito de multicomutação, visto que é suficiente um único canal de propulsão das soluções. Por estes motivos optou-se pela utilização de uma bureta automática nos sistemas multicomutados, em modo de aspiração.

Nesta dissertação utilizaram-se buretas automáticas da marca Crison, modelos micro BU 2030 ou 2031, operadas por um motor de passo (capacidade de execução de 2500 passos), e que possuíam incorporadas válvulas automáticas para esvaziamento das seringas. O sistema Crison possuía ainda um controlador interno, com comandos próprios, e em que através de um microcomputador interligado pela porta série se efectuava o controlo de deslocação do êmbolo, assim como da selecção do canal aberto da válvula incorporada na bureta automática. A transmissão da informação de controlo foi efectuada através do protocolo série, padrão RS-232C.

As seringas utilizadas nas buretas automáticas eram da marca Hamilton, modelos 1010, 1005 e 1002, correspondendo a capacidades de 10, 5 e 2,5 mL, respectivamente.

O volume de solução debitado por passo dependia da capacidade da seringa acoplada. Como o curso completo do embolo de aspiração era de 2500 passos, cada passo correspondia a volumes de cerca de 4 μL no caso da capacidade da seringa ser de 10 mL, 2 μL no caso da capacidade ser 5 mL, e 1 μL para seringas com capacidade de 2,5 mL.

A ligação à porta série do microcomputador foi efectuada por intermédio de uma ficha DB25 e a ligação à bureta automática através duma ficha DIN3. As definições de protocolo utilizadas para a transmissão da informação foram: i) velocidade de transmissão: 2400 *bit* por segundo (*baud*); ii) controlo de paridade na recepção: par; iii) sincronização: 1 *bit* inicial (*start bit*) e 2 *bit* no final (*stop bit*); iv) carácter: 7 *bit*.

As instruções de controlo da bureta automática eram enviadas sob a forma de sequências lineares de caracteres (*strings*) com o seguinte formato: i) identificação do dispositivo (número do dispositivo de 0 a 9) no conjunto de dispositivos; ii) posicionamento da válvula integrada, responsável pela entrada/saída das soluções. O formato utilizado era “I” (*Input*) para entrada e “O” (*Output*) para saída; iii) sentido de movimentação do motor passo-a-passo. A informação é transmitida sob a forma de “D” (*Dispense*) para despejar e de “P” (*Pick-up*) para encher; iv) número de passos a percorrer pelo motor (num máximo de 2500) no sentido definido.

Desta forma, através de linhas de programação em linguagem BASIC, as instruções de controlo da bureta automática foram integradas nas rotinas de controlo dos restantes dispositivos do sistema multicomutado, e eram enviadas pela porta de comunicação série. Essas linhas de programação eram do tipo:

(...)

OPEN "COM:BAUD,PARIDADE,CARACTER,STOPBIT" FOR OUTPUT AS#N
PRINT #N, "00D1"

(...)

O sistema de tubagens para o transporte das soluções, incluindo os reactores, eram de constituição em *teflon* (PTFE) da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0.8 mm, interligados por ligadores de fabrico próprio. A geometria dos reactores adoptada foi o entrelaçamento da tubagem sobre uma rede plástica. As confluências utilizadas foram de construção laboratorial e fabricadas em *perspex*, com diferentes configurações [2].

2.3.1.2. Unidades de comutação: válvulas solenóides

Nos sistemas multicomutados, os dispositivos de inserção são os dispositivos fulcrais de todo o conceito. Os dispositivos utilizados foram válvulas solenóides, responsáveis pela inserção das diferentes soluções.

As válvulas solenóides utilizadas eram da marca NResearch. Nas montagens analíticas desenvolvidas aplicaram-se dois modelos diferentes quanto ao número de portas: modelo 161 T031, de 3 vias (uma entrada/duas saídas ou uma saída/duas entradas), e o modelo 161 T011, de duas vias (uma entrada/uma saída) originalmente fechada.

Estes dispositivos (Figura 2.1) possuíam reduzidas dimensões, com cerca de 1,9 cm de diâmetro e 2,92 cm de altura, com uma forma cilíndrica. As válvulas apresentavam um baixo consumo de energia (alimentação a 12 V/0,8 A), eram compactas, tinham reduzidos volumes mortos e reduzido volume interno (o

volume interno de porta a porta é de cerca de 27 μL , de acordo com informação do fabricante), pressão máxima de funcionamento de 30 psi, curto tempo de resposta (5 a 20 ms para activação), elevada resistência química (constituição em PTFE), baixo custo e eram susceptíveis de automatização.

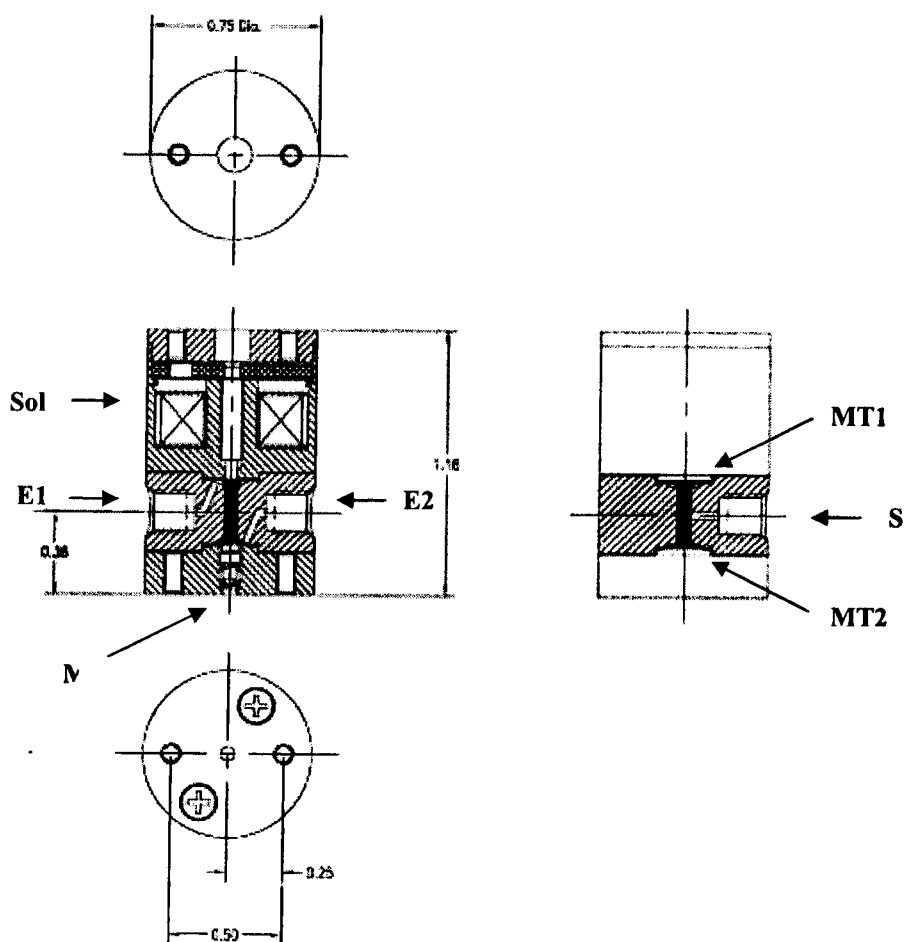


Figura 2.1

Diagrama representativo do corte de uma válvula solenóide. Sol – solenóide; E1 – entrada 1; E2 – entrada 2; S – saída; M – mola; MT1, MT2 – membranas de *teflon*.

A selecção do percurso das soluções nas válvulas solenóides era condicionada pelo sentido de pressão exercida sobre duas membranas de *teflon*, no caso das válvulas de 3 vias, colocadas opostamente como a imagem num espelho. O accionamento do núcleo do solenóide impulsionava as membranas de *teflon* (Figura 2.1; MT1 e MT2) num sentido, estabelecendo um dos percursos; após o desligar da válvula, uma mola helicoidal recolocava as membranas de *teflon* na sua posição inicial estabelecendo o percurso alternativo. No caso das válvulas de duas vias, uma mola exercia pressão sobre uma membrana de *teflon* (única nestes dispositivos) obstruindo o percurso (nas válvulas normalmente fechadas), e quando a válvula era accionada, o núcleo do solenóide pressionava a membrana no sentido contrário, provocando a abertura da válvula.

A inserção das soluções de amostras foi efectuada por comutação das válvulas solenóides para a posição correspondente à abertura do canal de entrada da solução de amostra, permanecendo a válvula nesta posição por um tempo predefinido (tempo de amostragem). Nos sistemas de fluxo desenvolvidos baseados no conceito de multicomutação, os volumes de solução introduzidos no sistema eram definidos pelo tempo de amostragem e pelo caudal utilizado, isto é, durante o tempo de amostragem ocorria a entrada no sistema de um determinado volume de solução, que dependia do caudal definido.

2.3.1.3. Sistema de detecção

O sistema de detecção utilizado para as determinações analíticas nos sistemas de multicomutação foi um detector espectrofotométrico. Em todas as montagens analíticas, e para a determinação de clomipramina, trimipramina e isoniazida, em formulações farmacêuticas, foi usado um espectrofotómetro Jenway, modelo

6100, equipado com uma célula de fluxo da marca Hellma, com um volume interno de 18 μL e um percurso óptico de 1 cm. Também foi utilizada uma célula de fluxo com um volume interno de 8 μL e um percurso óptico de 1 cm, da mesma marca.

2.3.1.4. Sistema de controlo

2.3.1.4.1. Aparelhagem

Como unidade central de aquisição e processamento de dados, e de controlo do equipamento constituinte dos sistemas de fluxo de multicomutação desenvolvidos, foram utilizados microcomputadores.

Para a determinação de clomipramina utilizou-se um microcomputador com um microprocessador Intel 486DX a 66 MHz, e para a determinação de trimipramina, de isoniazida e de pirazinamida recorreu-se a um Pentium I a 200 MHz, embora a frequência de funcionamento dos microprocessadores utilizados não tenha qualquer efeito limitativo na execução dos programas de controlo desenvolvidos.

O controlo dos diversos componentes dos sistemas de fluxo desenvolvidos, foi efectuado através de uma placa de interfaceamento da marca Advantech, modelo PC-LabCard PCL-818L, que possibilitava a comunicação entre o microcomputador e os sistemas de inserção, propulsão e detecção. Esta placa de controlo e aquisição possuía um conversor analógico-digital com uma resolução de 12 bits, 16 entradas e 16 saídas digitais compatíveis com TTL (Transistor-transistor logic), 16 entradas absolutas analógicas ou oito diferenciais e uma saída analógica, sinais de relógio e “triggers” programáveis.

As válvulas solenóides requerem uma diferença de potencial de 12 V e uma intensidade de corrente de aproximadamente 100 mA para serem activadas, o que não pode ser providenciado através da placa de interface PCL-818L. Para ultrapassar este obstáculo foi desenvolvido um circuito de potência, com base num circuito integrado ULN 2003 [3].

2.3.1.4.2. Programas informáticos

Os programas para controlo do sistema analítico, ou seja, para a activação e desactivação das válvulas solenóides, e ainda controlo do equipamento propulsor, foi desenvolvido em BASIC, uma linguagem simples de alto nível, implementada em ambiente DOS. Esses programas, desenvolvidos especificamente para aplicação nos trabalhos produzidos, entravam em consideração com diversos aspectos, como por exemplo, o objectivo do trabalho, a sua funcionalidade e versatilidade desejada. A linguagem de programação BASIC permitiu que facilmente se realizassem alterações nas linhas de programação, durante o tempo de desenvolvimento e testes dos sistemas de fluxo. Para a aquisição de dados, recorreu-se à inclusão de uma rotina de aquisição pré-elaborada, sendo apenas necessário proceder a alterações menores, com o intuito de adaptação ao trabalho em curso.

As rotinas de controlo e aquisição foram desenvolvidas através de instruções de acesso à memória. Deste modo, as linhas de programação para comutação das válvulas solenóides foram do tipo:

(...)

PORT%=&H300

OUT PORT% +11, 3

(...)

Nestas instruções, procede-se ao envio de um valor binário (“3”, no exemplo acima) correspondente às saídas digitais a activar (saídas digitais 0 e 1, para o valor binário “3”), para o endereço de memória *PORT% +11*. Este endereço corresponde ao endereço base “&H300” da placa (definido em conformidade com as configurações da placa de aquisição e controlo) e, corresponde às saídas digitais 0-7.

2.3.2. Montagens de fluxo baseadas no conceito de multi-impulsão

2.3.2.1. Sistemas de propulsão, inserção e transporte

Uma montagem analítica de um sistema de fluxo baseado no conceito de multi-impulsão envolve um determinado número de micro-bombas, correspondente ao número de soluções de que depende a determinação analítica. O desenvolvimento destes sistemas de fluxo não requer a utilização de outros componentes activos a não ser, unicamente, as micro-bombas.

Para a montagem dos sistemas analíticos utilizou-se micro-bombas da marca Bio-Chem Valve Inc., que debitavam 8 µL, embora também existam no mercado estes dispositivos com débitos de 25 e 50 µL. Por débito de 8 µL, indica-se que por cada pulso (actuação) da micro-bomba ocorria a dispensa de um volume de

solução de 8 μL , com uma precisão de $\pm 2\%$, de acordo com informações do fabricante. A frequência de pulso pode ser ajustada até um máximo de 250 pulsos (também por informação do fabricante) por minuto para as micro-bombas de 8 μL , permitindo atingir caudais de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. Para as micro-bombas de 25 e 50 μL , a frequência de pulso pode ir até 150 actuações por minuto, o que corresponde respectivamente, a caudais máximos de $3,75$ e $7,50 \text{ mL min}^{-1}$.

As micro-bombas (Figura 2.2), de forma cilíndrica e com reduzidas dimensões (com cerca de 5 cm de altura e 1,8 cm de diâmetro), são dispositivos com diafragmas, cuja posição depende da activação de um solenóide. Os diafragmas estão normalmente fechados através de uma mola interna. O solenóide é activado através da aplicação de uma voltagem, o que provoca a abertura do diafragma e a entrada do líquido para uma câmara interna. Quando se cessa a aplicação da voltagem, o solenóide é desactivado e a mola interna repõe os diafragmas em posição de fecho. A acção da mola sobre os diafragmas provoca simultaneamente a impulsão do líquido contido na câmara interna para o exterior.

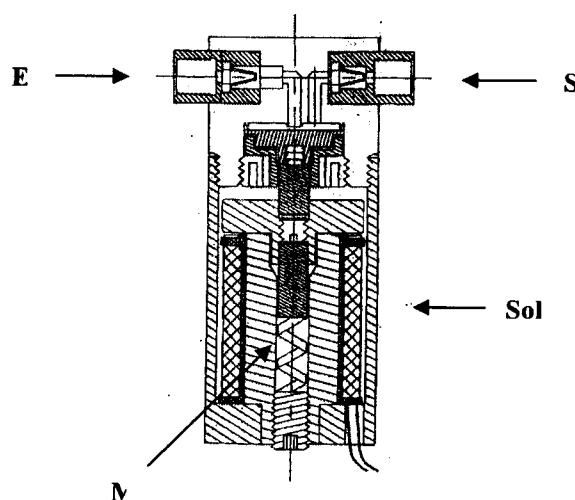


Figura 2.2

Diagrama representativo do corte de uma micro-bomba. Sol – solenóide; E – entrada 1; S – saída; M – mola.

2.3.2.2. Sistema de detecção

O detector utilizado no sistema de fluxo por multi-impulsão foi um detector de quimioluminescência, construído no laboratório de Química-Física e adaptado à análise em fluxo. Para tal, utilizou-se um fotomultiplicador da marca Hamamatsu, modelo H5784-04, acoplado a uma célula de fluxo construída especialmente para se adaptar ao fotosensor. Este detector de quimioluminescência foi aplicado à determinação de pirazinamida em formulações farmacêuticas, e uma descrição mais pormenorizada do sistema de detecção será apresentada no capítulo experimental respectivo.

2.3.2.3. Sistemas de controlo

2.3.2.3.1. Aparelhagem

O controlo dos dispositivos da montagem analítica foi realizado a partir de um microcomputador com um microprocessador Pentium III a 450 Mhz.

À semelhança do controlo dos dispositivos dos sistemas de multicomutação desenvolvidos, as micro-bombas e os restantes componentes da montagem analítica foram controlados através do envio de sinais TTL derivados da utilização de uma placa de interfaceamento da marca Advantech, modelo PC-LabCard PCL-818L, e de uma unidade de potência baseada num circuito CoolDrive da marca NResearch Inc.

2.3.2.3.2. Programas informáticos

Como o funcionamento das micro-bombas está dependente da activação e desactivação de um solenóide, à semelhança dos programas utilizados para o controlo das válvulas solenóides de comutação, desenvolveram-se programas recorrendo a instruções em BASIC, implementado em ambiente DOS. Tal como para as restantes montagens analíticas, também se considerou como factores decisivos para a programação o objectivo do trabalho e versatilidade.

Uma diferença em relação aos sistemas de fluxo por multicomutação é que no sistema de fluxo por multi-impulsão, a frequência de pulso das micro-bombas influenciava directamente o caudal, sendo importante considerar este aspecto na programação, o que será explicado com mais detalhe no capítulo 6.

As linhas de programação para activação e desactivação das micro-bombas foram iguais às de controlo das válvulas solenóides de comutação, dado que ambos os dispositivos são activados por sinais lógicos TTL, como já referido.

2.4. Optimização e avaliação das montagens de fluxo

Todas as optimizações dos sistemas analíticos desenvolvidos foram efectuadas tendo como objectivo a maximização do sinal analítico obtido em cada determinação. Para tal, o método utilizado foi o de análise univariada, que consiste em variar o valor de um parâmetro apenas, enquanto se mantém os valores dos restantes parâmetros inalterados. Deste modo, avaliou-se as condições mais adequadas para cada parâmetro determinador do desempenho da montagem analítica. No entanto, a optimização do sistema dependia de diversos factores,

como por exemplo, o ritmo de amostragem e a sensibilidade, implicando a necessidade de atingir um compromisso entre estes factores, de modo a maximizar a eficiência do sistema analítico.

As determinações analíticas das amostras farmacêuticas foram efectuadas através de curvas de calibração para a espécie a determinar, recorrendo à inserção de conjuntos de soluções padrão, com concentrações definidas. Com o intuito de realizar com a maior brevidade possível a análise dos resultados, e portanto, chegar ao resultado analítico, desenvolveram-se folhas de cálculo (Microsoft Excel 2000), de modo a relacionar o sinal analítico com a concentração da solução em análise, e realizar o tratamento estatístico dos valores obtidos, por regressão linear, obtendo-se equações que traduziam as relações verificadas, e o respectivo coeficiente de correlação.

As concentrações das espécies a determinar foram obtidas por relacionamento com a intensidade dos sinais analíticos, ou seja, através da medição da altura em centímetros dos sinais providenciados pelos detectores. O sinal relativo à concentração de um analito foi calculado através da média de um conjunto de leituras correspondentes a inserções consecutivas da mesma amostra. A concentração final de cada uma das espécies analisadas foi calculada por interpolação gráfica da intensidade de sinal obtida, na recta de calibração estabelecida para cada metodologia.

2.5. Preparação de padrões e amostras

Os trabalhos referidos nesta dissertação envolveram a análise de formulações farmacêuticas disponíveis em Portugal.

As soluções padrão de fármaco puro foram obtidas através da solubilização em solvente adequado, de quantidades rigorosamente medidas de substância.

Para as determinações analíticas dos fármacos nas formulações farmacêuticas comerciais, pelos métodos de referência, respeitou-se os procedimentos descritos nas farmacopeias [1, 4] para a sua preparação, quando disponíveis, isto é, nas situações em que não era referido em farmacopeia o procedimento a executar na preparação de amostras de formas farmacêuticas para analisar, recorreu-se ao procedimento descrito no respectivo ensaio de doseamento da substância pura, mas adaptado para doseamento da substância em formulações farmacêuticas.

Genericamente, a conduta seguida para efectuar determinações analíticas na forma farmacêutica comprimidos foi: pesagem de um determinado número de comprimidos, seguido da sua pulverização em almofariz de porcelana; após a pulverização recolhia-se uma toma de pó, rigorosamente pesada; por último, procedia-se à sua solubilização. A preparação das soluções do fármaco a determinar dependia se as soluções se destinavam a ensaios pelo método de referência ou se pela metodologia desenvolvida. Uma descrição mais detalhada será abordada em cada capítulo experimental, respectivo à determinação do fármaco em análise.

2.6. Métodos de referência

Com a finalidade de avaliar a exactidão dos resultados obtidos com os sistemas analíticos desenvolvidos, estabeleceu-se uma estratégia de comparação com os resultados obtidos pela execução dos métodos de referência descritos em Farmacopeias, para o fármaco em estudo analítico e em respeito à forma farmacêutica que o veiculava. As Farmacopeias abordadas foram a Portuguesa [1]

e Europeia [4]. As metodologias de referência serão analisadas especificamente em cada um dos capítulos respectivos.

2.7. Procedimentos de avaliação das metodologias analíticas desenvolvidas

O desenvolvimento de novas metodologias analíticas tem como objectivos básicos principais permitir a determinação de uma nova espécie (analito), melhorar a exactidão, a precisão ou o limite de quantificação de métodos preexistentes, permitir ou aumentar o grau de automatização e reduzir os custos laboratoriais (nomeadamente em termos de consumo de reagentes e envolvimento de pessoal). O processo de desenvolvimento de novas metodologias inclui obrigatoriamente a verificação experimental do seu desempenho, no qual se inclui, particularmente, a avaliação da precisão (nas suas diferentes expressões) e da exactidão analítica obtida. Uma vez que se trata de um aspecto comum a trabalhos a seguir descritos, referem-se aqui os conceitos e os métodos de análise estatística adoptados:

- (i) *Repetibilidade* (ou precisão “*within-batch/within-run*”): variação observada nos resultados da análise repetida da mesma amostra num curto espaço de tempo e obtidos por referência à mesma função de calibração.
- (ii) A *precisão* foi sempre avaliada através do cálculo do coeficiente de variação (CV), calculado do seguinte modo: $CV = (\sigma/\mu) \times 100$, sendo σ e μ , respectivamente, o desvio padrão e o valor médio do conjunto de resultados em análise.
- (iii) A *exactidão* (erro sistemático) mede a concordância entre o resultado obtido e o valor verdadeiro. A avaliação da exactidão das metodologias analíticas desenvolvidas foi sempre feita através do cálculo do desvio relativo percentual (DR%), o qual consiste em calcular o valor percentual representativo do resultado

obtido pela metodologia proposta, considerando o resultado obtido com a metodologia de referência como 100%.

(iv) O *limite de detecção* (LD) foi um outro parâmetro caracterizador das metodologias analíticas apresentado ao longo desta dissertação. O limite de detecção de uma operação analítica é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser detectada nas não necessariamente com exactidão. Em todos os casos recorreu-se à seguinte expressão de cálculo: $LD = \frac{3 \times S_{y/x}}{b}$ [5]. Nesta equação, a

expressão $S_{y/x}$ representa o desvio padrão dos valores de y numa regressão linear, calculado por $\sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{(n-2)}}$, e b representa o declive da recta de regressão linear obtida numa calibração.

2.8. Referências bibliográficas

- 1 Farmacopeia Portuguesa VII, Ed. Oficial, Lisboa, 1342 (2002)
- 2 S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, A. A. S. C. Machado, J. L. F. C. Lima, J. M. Paulís, Quím. Anal., 6, 278 (1987)
- 3 Lapa R. A. S., Lima J. L. F. C., Reis B. F., Santos J. L. M., Zagatto E. A. G., Anal. Chim. Acta, 351, 223 (1997)
- 4 European Pharmacopoeia, Council of Europe, Strasbourg, Fourth Ed., 2078 (2002)
- 5 Miller J. N., Miller J. C., Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry”, 4^a ed., Prentice Hall, Great Britain (2000)

CAPÍTULO

3

DETERMINAÇÃO

ESPECTROFOTOMÉTRICA DE

CLOMIPRAMINA NUM SISTEMA DE

FLUXO MULTICOMUTADO

A clomipramina é um fármaco utilizado no tratamento dos estados de perturbação obsessivo-compulsivos e em depressões. Neste capítulo refere-se um procedimento analítico para a determinação de clomipramina em formulações farmacêuticas, baseado num sistema de fluxo multicomutado. Para a determinação utilizou-se um método baseado na oxidação da clomipramina por monovanadato de amónio, em meio ácido, cujo produto da reacção era um composto com máximo de absorção no comprimento de onda de 620 nm. O desenvolvimento da reacção foi favorecido através da utilização da estratégia de inserção por amostragem binária. O controlo do volume de amostra inserido no sistema, baseado na utilização de uma amostragem temporizada, permitiu controlar o nível de dispersão da amostra, sem necessidade de efectuar alterações na configuração física da montagem analítica.

3.1. Introdução

O fármaco cloridrato de clomipramina, ou cloridrato de 3-cloro-5-[3-(dimetilamino)propil]-10,11-dihidro-5H-dibenzo[b,f]azepina (Figura 3.1), é um fármaco derivado das dibenzoazepinas que pertence à classe farmacológica dos compostos antidepressivos tricíclicos, e que são normalmente utilizados no tratamento dos estados de perturbação obsessivo-compulsivos em situações de fobia e pânico, assim como, em depressões e outros distúrbios emocionais. As obsessões e compulsões provocam um acentuado esgotamento, e interferem significativamente com o funcionamento ocupacional e social dos indivíduos. Este fármaco ainda exibe efeitos sedativos ligeiros, o que pode ser útil no alívio da componente de ansiedade que acompanha frequentemente a depressão.

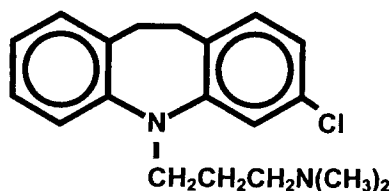


Figura 3.1

Estrutura química do Cloridrato de Clomipramina.

O cloridrato de clomipramina é um pó cristalino branco ou ligeiramente amarelado [1]. É facilmente solúvel em água, metanol, e no cloreto de metileno, solúvel no álcool e praticamente insolúvel no éter etílico e hexano [1]. Adicionalmente, este fármaco foi o primeiro aprovado pela FDA ("Food and Drug

Administration”) para uso veterinário no tratamento de ansiedade de separação ou outras formas, micção inapropriada e agressão dominante.

A clomipramina, pertencendo à classe farmacológica dos tricíclicos, inibe a recaptação de noradrenalina e serotonina nas terminações nervosas centrais, aumentando deste modo a concentração das monoaminas transmissoras nos locais de recepção. A inibição da recaptação ocorre pelo bloqueio das bombas de transporte de membrana nos neurónios, e o seu efeito incide essencialmente sobre a recaptação da serotonina [2].

O fármaco clomipramina possui propriedades anti-colinérgicas que são responsáveis por alguns dos seus efeitos adversos. Também baixa o limite de disparo das convulsões, potencia o efeito da noradrenalina e outras drogas actuadoras no Sistema Nervoso Central e possui um efeito interferente na condução cardíaca. Alguns dos efeitos adversos observados com mais ocorrência e associados às propriedades anti-colinérgicas da clomipramina foram perturbações gastro-intestinais, incluindo boca seca, obstipação intestinal, náuseas, e anorexia; perturbações a nível do Sistema Nervoso, incluindo sonolência, tremores, tonturas e nervosismo; perturbações genito-urinárias incluindo alterações na libido, falha ejaculatória, impotência e distúrbio na micção; e outras perturbações, como fadiga, suores, ganho de peso e alterações a nível da visão. Embora a lista de efeitos adversos apresentados anteriormente seja relativamente extensa, a adversidade do fármaco pode assumir efeitos mais específicos podendo ser categorizados de acordo com o sistema biológico que afectam no organismo [2]. Em seguida, apresenta-se uma lista resumida de alguns desses efeitos: (i) - Neurológicos: efeitos extrapiramidais como a ataxia, dor de cabeça, delírios, desordens no discurso, fraqueza muscular, hipertonia muscular, convulsões e zumbidos nos ouvidos; (ii) - Comportamentais: sonolência, fadiga, desorientação, ansiedade, agitação, perturbação do sono, insónias, ocorrência de pesadelos, distúrbios na concentração, alucinações visuais, falhas de memória,

agressividade, episódios maníacos, etc; (iii) - Cardiovasculares: hipotensão, palpitações, arritmias e perturbações na condução eléctrica cardíaca; em pacientes com desordens cardiovasculares foi registado a ocorrência de fibrilação, enfarte do miocárdio e ataques cardíacos; (iv) - Hematológicos: agranulocitose, trombocitopenia e leucopenia; (v) - Gastrointestinais: vômitos, dores abdominais, diarreias, alterações no gosto, icterícia obstrutiva e hepatite com ou sem icterícia; (vi) - Endócrinos: perda de peso, galactorreia nas mulheres, síndrome de secreção inapropriada da hormona antidiurética, alterações nos níveis sanguíneos de açúcar, aumento dos níveis de prolactina e irregularidade na menstruação.

Em virtude da probabilidade de elevada sensibilidade das crianças em relação aos adultos para casos de sobredosagem com antidepressivos tricíclicos, e dado que um maior número de fatalidades em crianças tem sido reportado, devem ser feitos esforços para evitar potenciais sobredosagens, especialmente neste grupo de menor idade [3]. As sobredosagens podem ter origem em erros de formulação, pelo que é de grande importância o desenvolvimento de novas metodologias de análise em formulações farmacêuticas. Os primeiros sinais e sintomas de sobredosagem com antidepressivos tricíclicos assumem normalmente a forma de graves reacções anti-colinérgicas, que se estabelecem passado cerca de 30 minutos a 2 horas após a ingestão da droga. Os sintomas podem abranger sonolência, entorpecimento ou insensibilidade, ataxia, vômitos, cianose, agitação, delírios, transpiração severa, reflexos hiperactivos, rigidez muscular e convulsões. Casos de depressão respiratória podem acontecer, assim como hipotensão ou hipertensão inicial. No entanto, é mais observado situações de hipotensão progressiva que podem levar eventualmente a ataques. Perturbações cardiovasculares são frequentemente presentes, incluindo taquicardia, arritmias cardíacas, e falhas na condução eléctrica cardíaca.

A relevância terapêutica e farmacológica da clomipramina estimulou o desenvolvimento de diversos métodos para a sua determinação, tanto em fluidos biológicos corporais como em formulações farmacêuticas.

No que se refere à utilização de métodos cromatográficos para determinação da clomipramina, estes encontram-se amplamente divulgados em relação a outros métodos de quantificação, essencialmente no que diz respeito à análise de amostras biológicas e por força da importância que a monitorização dos níveis de clomipramina tem em bioquímica clínica. Diversos métodos cromatográficos foram utilizados para determinação da clomipramina, dos quais se destacam cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC) com detecção por espectrofotometria na região do ultravioleta, em amostras biológicas [4-17], HPLC com detecção por quimioluminescência [18], cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa [19-21], cromatografia gasosa com detector de nitrogénio/fósforo [22-24], cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama [25-27], cromatografia líquida com detecção electroquímica [28], e cromatografia líquida com detecção por espectrofotometria na região do ultravioleta [29]. Foi também realizado um trabalho de quantificação recorrendo a electroforese capilar com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta [30].

Várias metodologias com detecção colorimétrica na região do visível, recorrendo a diversas reacções de desenvolvimento de cor, foram também usadas para a determinação de clomipramina. Em 1994, Arioiz e Ersoy realizaram a determinação de clomipramina por reacção com 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona [31], e em 2000, surgem dois trabalhos, um por reacção da clomipramina (e também outros compostos tricíclicos) com dihidroclorato de p-fenilenediamina diazotada em ácido sulfúrico [32], e o outro por reacção com ferro (III), e subsequente reacção com cianeto de ferro em ácido acético [33].

Através de quimioluminescência electrogerada, realizou-se um trabalho de determinação de diversos antidepressivos tricíclicos, entre os quais a clomipramina, em 1999, por reacção dos grupos amina terciários com tris(2,2'-bipiridil)ruténio(II) [34].

Em 1978, também se realizou um trabalho de determinação de clomipramina, em plasma biológico, através de um procedimento específico por radioimunoensaio [35].

Em 1993, surgiu a primeira metodologia em fluxo, desenvolvida por Elgendy *et al.* [36], para a determinação de clomipramina, entre outros fármacos actuadores no Sistema Nervoso Central, com um sistema de detecção na região do ultravioleta.

As dibenzoazepinas possuem estruturas reaccionais típicas conferidas pela presença de átomos de azoto quimicamente activos, que prontamente se envolvem em reacções químicas que podem ser usadas para avaliação analítica. Em experiências relatadas na literatura científica foi demonstrado que a clomipramina reagia com oxidantes fortes em meio ácido originando produtos de oxidação corados, sendo a estabilidade dos produtos e a cinética da reacção afectadas pela natureza e concentração do ácido. Esta reacção química sendo implementada num sistema de análise de multicomutação, possibilita uma metodologia rápida e simples para a determinação de clomipramina em preparações farmacêuticas, podendo inclusivamente a metodologia ser explorada para análises de rotina, quando combinada com todas as potencialidades analíticas conferidas pelos sistemas de análise multicomutados [37].

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de análise em fluxo que permite uma mistura em linha de soluções, mais eficiente e, deste modo, uma homogeneização mais rápida da zona de reacção, para a determinação espectrofotométrica da clomipramina.

É de vincar que o trabalho descrito no presente capítulo originou a publicação de um artigo científico em 2002 [38], e que posteriormente à sua publicação surgiu uma outra publicação referente à determinação de clomipramina em formulações farmacêuticas recorrendo também à multicomutação, mas neste caso acoplado a detecção por quimioluminescência. Nesse trabalho, Marques *et. al.* [39] explorou um efeito potenciador da clomipramina na reacção de quimioluminescência de oxidação do sulfito por cério (IV) em meio acidulado com ácido sulfúrico.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Reagentes

Diariamente preparou-se uma solução de clomipramina 500 mg L^{-1} por dissolução de 25 mg em 50 mL de ácido sulfúrico $5,0 \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução foi conservada no frigorífico, excepto nas situações da sua utilização para a preparação de soluções padrão. Os padrões para análise foram preparados através de diluições da solução mais concentrada, preparada igualmente com solução de ácido sulfúrico 5 mol L^{-1} .

A solução de monovanadato de amónio com concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada através da dissolução de 0,585 g do sólido em solução $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico e completando o volume para 50 ml com o mesmo ácido.

As soluções das formulações farmacêuticas comercialmente disponíveis (comprimidos de Anafranil 10 e 25 mg, comprimidos de libertação prolongada de Anafranil 75 mg e injectáveis de Anafranil 25 mg/2 mL), para análise pela metodologia desenvolvida, foram preparadas através da dissolução da quantidade

necessária de comprimidos pulverizados ou por diluição do volume necessário de injectável, em ácido sulfúrico 5,0 mol L⁻¹ e completando o volume para 100 mL. As soluções de amostra para análise pela metodologia desenvolvida não foram sujeitas a qualquer tratamento prévio, em virtude de o processo de filtração ser em linha, no sistema de fluxo.

3.2.2. Equipamento

As medições espectrofotométricas foram realizadas com um espectrofotómetro da marca Jenway (UK) modelo 6100, configurado para um comprimento de onda de 620 nm, e equipado com uma célula de fluxo da marca Hellma, com volume interno de 18 µL.

A montagem envolveu o uso de duas válvulas solenóides NResearch de 3 vias (161 T031). Os tubos de transporte das soluções foram de PTFE, da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm, e todos os ligadores e as confluências foram de construção laboratorial [40]. Para as filtrações em linha das soluções de amostra utilizou-se um filtro Schleicher & Schuell FM 013/0. A aspiração das soluções foi realizada através de uma bureta automática Crison Micro BU 2030, equipada com uma seringa de 5 mL e controlada por um microcomputador através do protocolo série (RS-232C).

3.2.3. Montagem de fluxo multicomutado

O sistema de fluxo (Figura 3.2) desenvolvido incorporava duas válvulas solenóides de comutação de 3 vias, V_1 e V_2 . A válvula V_1 era responsável pela inserção de amostra e reagentes, e a válvula V_2 era usada para direccionar o transporte das soluções para um percurso, de entre dois percursos analíticos distintos (L_1 e L_2), para permitir a execução de uma etapa de substituição de soluções e lavagem sem interferir com o canal de amostragem.

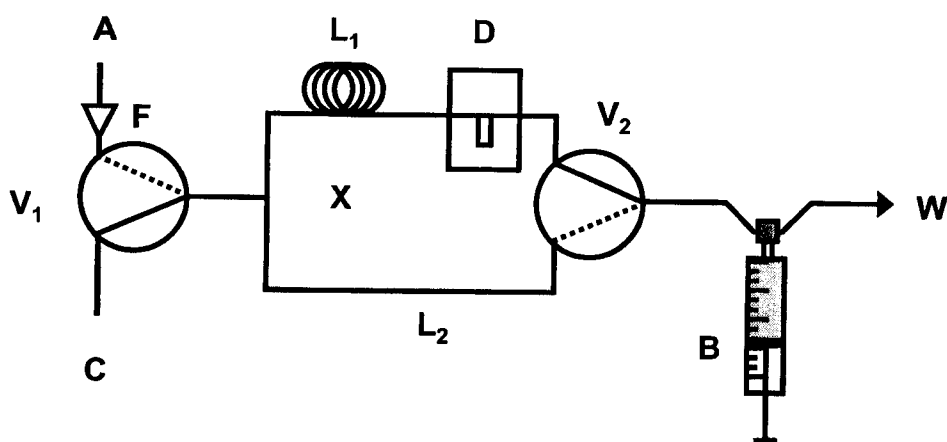


Figura 3.2

Diagrama do sistema de fluxo para a determinação do cloridrato de clomipramina.

V_1 e V_2 – válvulas solenóides de 3 vias: linhas contínuas dentro dos símbolos das válvulas correspondem à posição 1 e linhas tracejadas à posição 2; D – Detector; B – Bureta automática; A – Solução de amostra; C – Solução de reagente/transportador (vanadato); L_1 – reactor (1 metros); L_2 – Canal alternativo, para limpeza; F – Filtro; X – Ponto de confluência; W – Resíduos.

A solução transportadora, utilizada igualmente como reagente, era inserida através de V_1 na posição 1, e era utilizada para estabelecer a linha de base do registo das determinações. Também a solução de amostra era introduzida no sistema através da válvula V_1 , por intermédio de um tempo predefinido de actuação do solenóide colocando a válvula na posição 2 e que, dependendo do caudal, estabelecia o volume de amostra e possibilitava um controlo efectivo sobre a dispersão da amostra, como se refere seguidamente. Pelo recurso à amostragem binária [41], a amostra não era inserida no sistema como um único volume mas sim dividida em vários segmentos de reduzido volume alternados com reduzidos volumes de reagente. Como os volumes de solução introduzidos no sistema eram definidos pelo tempo de amostragem, porque durante o tempo de amostragem ocorria a entrada no sistema de um determinado volume de solução, que dependia do caudal definido, então o número e tempos de cada ciclo de intercalações definiam o tempo de amostragem final, e portanto, o volume de amostra. Inicialmente, V_1 e V_2 eram colocadas na posição 1, e assim a solução transportadora fluía pelo detector. Em seguida, a válvula V_1 era accionada alternativamente entre as posições 1 e 2, de acordo com os tempos de intercalação predefinidos, permitindo a intercalação de alíquotas de reduzido volume de amostra e reagente, o que favorecia a homogeneização dos volumes de amostra com os de reagente, e consequentemente, o desenvolvimento da reacção. Ulteriormente, a válvula V_1 era comutada para a posição 1 e a zona de amostra transportada através do reactor L_1 em direcção ao detector (Figura 3.2, D). Após a detecção da amostra, as válvulas V_1 e V_2 eram accionadas para a posição 2 para possibilitar a troca das soluções e preparação do sistema para nova determinação. Através da activação dos solenóides das válvulas V_1 e V_2 para a posição 2, o transporte das soluções inseridas em V_1 era direccionado pelo canal alternativo L_2 da montagem, evitando deste modo, a passagem do líquido pelo reactor L_1 e pelo detector. Como o canal L_2 era de reduzidas dimensões, o tempo para análise entre amostras era reduzido

visto que a etapa para troca de solução de amostra se realizava mais rapidamente, até porque a velocidade de aspiração da bureta automática era programada para valores superiores em relação aos valores de caudal estabelecidos para as análises. Ao contrário das outras etapas, em que a actuação da bureta era efectuada através da programação do intervalo de tempo de execução entre cada passo, na etapa de troca de soluções, as instruções programadas eram as correspondentes à deslocação directa do embolo da seringa entre as posições extremas, de acordo com as instruções do fabricante, de modo a rentabilizar a velocidade máxima de aspiração da bureta. Nesta situação não ocorria programação de caudal, dado que a velocidade de deslocação do embolo era a máxima permitida pela bureta. Não se realizaram ensaios de medição dos caudais originados por este modo de actuação da bureta, porque esse procedimento de aspiração era apenas utilizado na etapa de troca de soluções, para diminuir o intervalo de tempo gasto nesta fase, e portanto, de modo a aumentar o ritmo de amostragem.

Visto que as soluções de amostra foram obtidas por dissolução das formulações farmacêuticas, sem outro tratamento, e tendo em consideração que muitos dos excipientes eram muito pouco solúveis em água bidesionizada, realizava-se um processo de filtração em linha, isto é, submetia-se as soluções de amostra a um processo de filtração antes da sua inserção no sistema através da colocação de um filtro (Figura 3.2, F) antes de V_1 , adaptado para filtrações em fluxo. Este filtro, da marca Schleicher & Schuell, era constituído pelos componentes a seguir esquematizados na Figura 3.3.

Considerando a estrutura e dimensões interiores do filtro, era de considerar a existência de um volume interno, que poderia influenciar a fase de amostragem e o ritmo de amostragem. Em relação à fase de amostragem, o facto de o sistema possuir um equipamento de propulsão robusto como a bureta automática, capaz de proporcionar um caudal constante, e também devido ao controlo automático das

válvulas solenóides, que permitiam ou impossibilitavam eficazmente o acesso ao canal de amostragem, o volume interno do filtro não afectava esta fase.

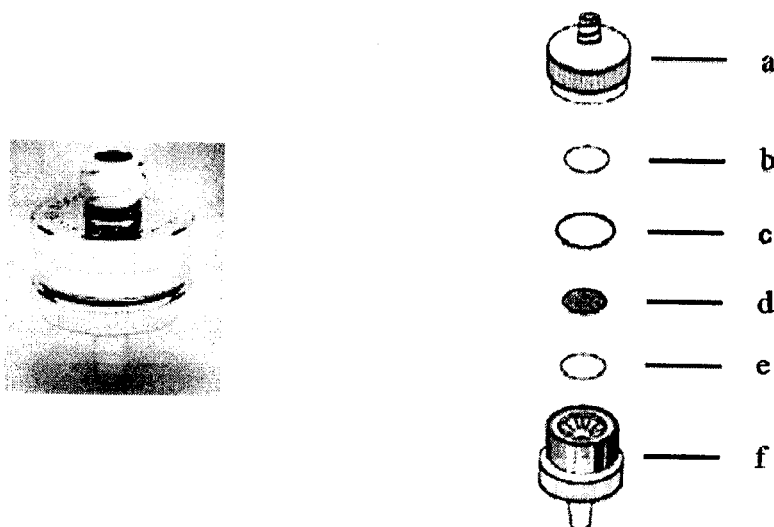


Figura 3.3

Figura e esquema do filtro Schleicher & Schuell FM 013/0 (Adaptado de "Filtration Catalog Schleicher & Schuell 2002/2003").

a – parte superior; b – rede metálica; c – “o-ring” em silicone; d – filtro em papel; e – rede metálica; f – parte inferior.

Adicionalmente, a realização de uma etapa de lavagem após a substituição de uma solução, garantia que não ocorria contaminação entre soluções. Podia constituir um problema na fase de substituição de soluções, porque a existência de um volume interno no filtro implicava que a fase de lavagem após troca de soluções fosse obrigatoriamente realizada mais exaustivamente para evitar contaminação de soluções, o que poderia limitar o ritmo de amostragem. No entanto, o facto da fase de substituição das soluções e lavagem se realizar através do funcionamento

da bureta na sua velocidade máxima, possibilitava que a existência do volume morto do filtro não afectasse de modo significativo as determinações, por diminuição do ritmo de amostragem. As condições descritas de funcionamento da bureta na fase de lavagem possibilitavam a realização desta fase de um modo eficaz de modo a prevenir contaminação de soluções, sem grande comprometimento do ritmo de amostragem.

O mesmo procedimento analítico foi utilizado para obter uma curva de calibração analítica, o que envolveu a análise de um conjunto de soluções padrão de cloridrato de clomipramina, preparadas por dissolução e diluições da mesma substância.

3.2.4. Método de referência

A precisão e exactidão da metodologia descrita neste capítulo foram avaliadas através da determinação de clomipramina em formulações farmacêuticas, de acordo com a Farmacopeia Britânica [42] por espectrofotometria na região do ultravioleta a 252 nm. As formulações farmacêuticas analisadas foram Anafranil 10 mg, Anafranil 25 mg, Anafranil 75 mg e Anafranil 25 mg/2 mL (injectável). Este procedimento envolvia duas diluições consecutivas da amostra e uma filtração.

As soluções de amostra das formulações sólidas foram preparadas através da selecção de uma toma, rigorosamente pesada, após a trituração de um determinado número de unidades (20 a 30 comprimidos), e por sua vez correspondente a aproximadamente 50 mg de fármaco. A toma rigorosamente pesada foi sujeita a agitação por uma hora, em 200 mL de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. Em seguida, diluiu-se a solução anterior para 250 mL e filtrou-se. Uma segunda diluição foi

realizada através da diluição de 15 mL de filtrado para 100 mL com ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. A absorvência a 252 nm para a solução resultante foi registrada. O branco utilizado foi a solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. O conteúdo em clomipramina foi calculado através de uma relação indicada na farmacopeia, em que se considera o valor 226 para a absorvência específica de uma solução a 1 por cento massa/volume na espessura de 1 centímetro (1%, 1 cm) no comprimento de onda 252 nm.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Ensaios preliminares por procedimentos discretos

Uma análise da literatura revelou que as dibenzoazepinas, grupo de substâncias farmacêuticas ao qual pertence a clomipramina, reagem com haletos ou complexos metálicos com tiocianato (por exemplo, Fe(III), Ti(IV), Nb(V), Cr(III), Zn(II)), e com substâncias orgânicas (por exemplo, ácido pícrico, violeta de pirocatecol, cromazurol S) para formar compostos corados [43]. Adicionalmente, foram encontradas referências a ensaios de avaliação do efeito exercido por oxidantes fortes em soluções de dibenzoazepinas. Esse efeito traduzia-se na formação de compostos de cor azul quando se utilizava oxidantes como sulfato de cério, dicromato de potássio, iodato de potássio, persulfato de amônio ou vanadato de amônio. De acordo com Renfroe *et. al.* [44] o mecanismo de oxidação das dibenzoazepinas envolvia a formação de compostos diméricos com coloração azul intensa. O mecanismo de reação encontra-se esquematizado na Figura 3.4.

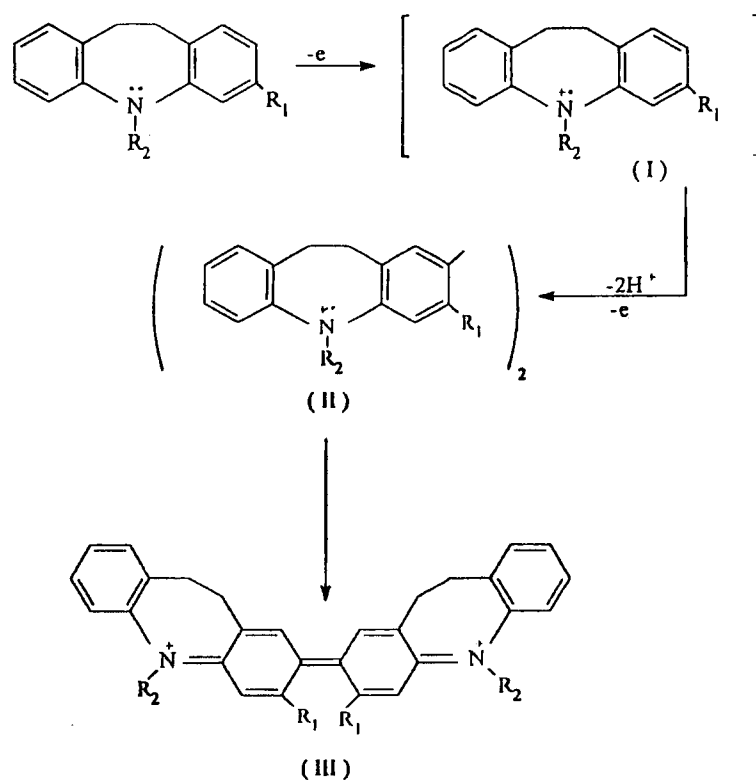


Figura 3.4

Mecanismo de oxidação das dibenzoazepinas (adaptado de [45]).

De acordo com W. Misiuk *et. al.* [45], muitas das substâncias propostas para a determinação espectrofotométrica de dibenzoazepinas não são satisfatórias, para aplicação em sistemas de fluxo contínuo: algumas requerem aquecimento, longos tempos para desenvolvimento de cor ou execução muito demorada. Por exemplo, usando dicromato de potássio em meio acidulado com ácido sulfúrico requer aquecimento a 50°C por 25 minutos [46]; a oxidação por iões de ferro (III) em meio ácido com ácido acético necessita de temperaturas elevadas na ordem de 75°C [47].

Em face desta situação, o monovanadato de amónio foi seleccionado como o oxidante a usar porque produzia rapidamente produtos de oxidação, sendo adicionalmente estáveis, e a literatura refere que os produtos formados eram mais

estáveis a temperatura ambiente que os compostos formados com iões de ferro (III), dicromato de potássio ou iodato [45]. Este reagente não apresenta propriedades carcinogénicas e é um composto químico estável em condições normais de uso e armazenamento. Adicionalmente, este reagente é de fácil acesso e, tal como foi comprovado posteriormente, a sua reactividade com a clomipramina ocorre à temperatura ambiente e não requer tempos de reacção longos.

Deste modo, realizaram-se ensaios preliminares por procedimentos discretos para avaliar a reacção de oxidação da clomipramina com vanadato de amónio. Um primeiro ensaio consistiu no estudo do meio ácido, necessário para ocorrer a reacção de oxidação. A partir dos primeiros resultados foi evidente que a velocidade de reacção era afectada pelo tipo e concentração do ácido utilizado (Figura 3.5).

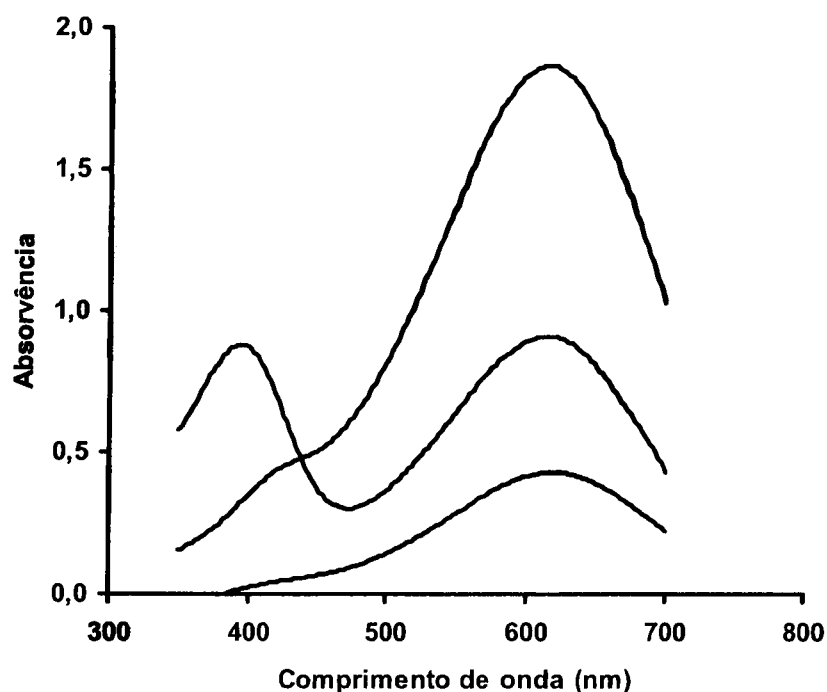
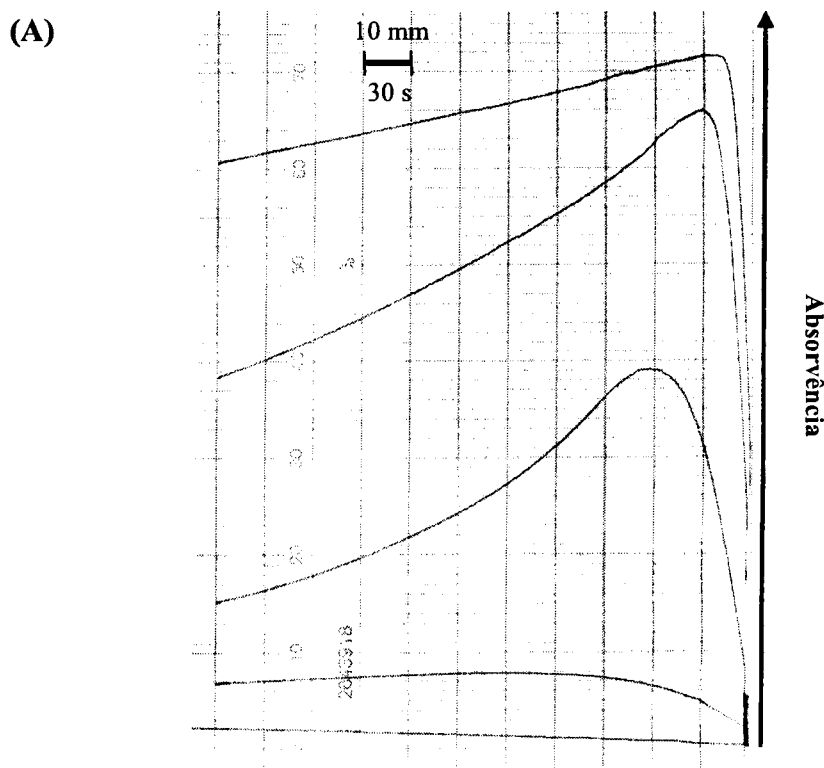


Figura 3.5

Espectros de absorção dos produtos de oxidação da clomipramina obtidos em soluções aciduladas com 5,0 mol L⁻¹ de: (a) H₂SO₄; (b) HCl; (c) HNO₃.

A influência da concentração de ácido na reacção de oxidação da clomipramina foi avaliada através da análise de uma solução de clomipramina 10 mg L^{-1} , em meios acidulados com ácido nítrico, sulfúrico e clorídrico, num intervalo de concentrações de $2,0$ a $6,0 \text{ mol L}^{-1}$. Os diversos ensaios foram realizados em cuvetes de 1 cm de percurso óptico, através da mistura de volumes apropriados de solução de vanadato de amónio e solução de clomipramina, de modo a obter as concentrações a ensaiar para cada substância, isto é, $1,25 \times 10^{-3} \text{ M}$ de vanadato de amónio, e 10 mg L^{-1} de clomipramina. A solução de oxidante para cada ensaio foi preparada na solução de ácido a testar, e as soluções de clomipramina foram preparadas em água bidesionizada. Para cada ensaio foi acompanhado o desenvolvimento da reacção ao longo do tempo, através do registo em papel do sinal analítico obtido com o espectrofotómetro (Figura 3.6(A)).

Os resultados estão representados graficamente na Figura 3.6(B), e correspondem aos máximos de absorção, em unidades de absorvência, obtidos para cada ensaio.



(B)

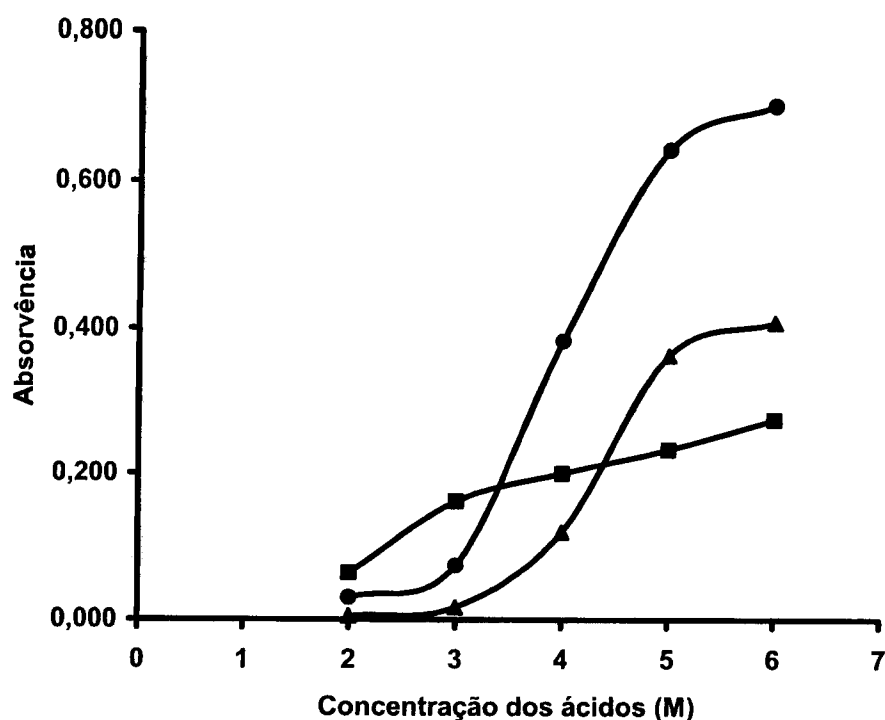


Figura 3.6

(A) – Registo obtido para a influência na absorvência de diferentes concentrações de ácido sulfúrico. Velocidade de registo: 20 mm min⁻¹.

(B) - Avaliação da influência da natureza e concentração de ácidos na reacção de oxidação da clomipramina por vanadato de amónio. [Vanadato de amónio] = $1,25 \times 10^{-3}$ M; [Clomipramina] = 10 mg L⁻¹; ● – H₂SO₄; ▲ – HCl; ■ – HNO₃.

Os valores apresentados na Figura 3.6 permitem concluir que para o ácido clorídrico e ácido sulfúrico o sinal analítico aumentou ligeiramente com a concentração dos ácidos de 2,0 a 3,0 mol L⁻¹, e verificou-se um aumento acentuado entre 3,0 e 5,0 mol L⁻¹. De 5,0 a 6,0 mol L⁻¹ o sinal analítico apresentava indícios de estabilização. Para o ácido nítrico o sinal analítico exibia um aumento contínuo mas discreto ao longo do intervalo de concentrações

estudadas. Adicionalmente, observou-se que para concentrações de ácido inferiores a $3,3 \text{ mol L}^{-1}$ o sinal analítico obtido quando a solução de clomipramina era acidulada com ácido nítrico era superior ao obtido para a mesma concentração de clomipramina quando acidulada com ácido sulfúrico ou clorídrico, mas esta situação alterou-se para concentrações mais elevadas de ácido, onde os outros ácidos originavam valores de absorvência superiores, indicando uma maior extensão de reacção com ácido sulfúrico e clorídrico. Verificou-se também um rápido desenvolvimento da reacção em ácido nítrico acompanhado de uma menor estabilidade dos produtos de oxidação, em concentrações de ácido superiores a $3,3 \text{ mol L}^{-1}$, porque verificou-se visualmente, que para concentrações de ácido nítrico $5,0$ ou $6,0 \text{ mol L}^{-1}$, a coloração azul desaparecia tão rapidamente quanto o seu aparecimento. Deste modo, com o aumento da concentração de ácido, o correspondente aumento na extensão da reacção em meios acidulados com ácido sulfúrico ou clorídrico garantia que o desenvolvimento de cor fosse maximizado. Quando se realizou a oxidação da clomipramina com o reagente vanadato de amónio acidulado com solução de ácido sulfúrico $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ obteve-se o sinal analítico mais elevado.

Tendo em consideração que a diferença de sinal analítico obtido com as soluções de ácido sulfúrico $5,0$ e $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ não foi significativo de modo a comprometer a sensibilidade das determinações, e que as soluções de ácido sulfúrico têm elevada viscosidade, o que poderia constituir um inconveniente quando as soluções são aspiradas (ver comentários apresentados no Capítulo 2), seleccionou-se para realizar as experiências seguintes a solução $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico para acidular os meios de reacção.

O método utilizado para aferir a influência da natureza e concentração do ácido, usado para acidular a solução de vanadato de amónio para a oxidação da clomipramina, foi também aplicado para realizar um estudo do sinal analítico resultante da oxidação do fármaco em função da concentração de oxidante usada.

Estes ensaios foram realizados com uma solução de clomipramina 10 mg L^{-1} , e com o meio reaccional acidulado com ácido sulfúrico $5,0 \text{ mol L}^{-1}$. As diversas concentrações do reagente vanadato de amónio foram preparadas no meio ácido referido. A avaliação do sinal analítico foi efectuada como descrita no último ensaio, e os resultados obtidos encontram-se representados em gráfico na Figura 3.7.

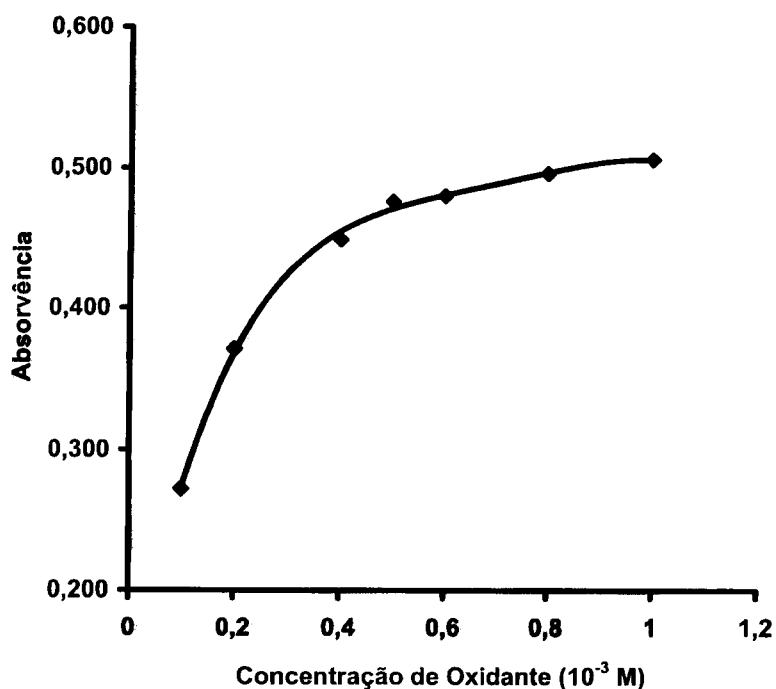


Figura 3.7

Avaliação da influência da concentração do oxidante vanadato de amónio na reacção de oxidação da clomipramina. $[\text{Clomipramina}] = 10 \text{ mg mL}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 5,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Pelos resultados representados na Figura 3.7 observa-se um aumento acentuado do sinal analítico resultante da oxidação da clomipramina com vanadato de amónio com concentrações do reagente até aproximadamente $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ocorrendo após este valor uma estabilização da resposta analítica. Este facto indica uma saturação do reagente (oxidante vanadato de amónio) consumido na reacção a partir do valor de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, para as condições químicas estabelecidas no início do ensaio.

3.3.2. Desenvolvimento e optimização do sistema de fluxo

Um aspecto de grande importância, para a implementação em fluxo do método espectrofotométrico seleccionado para a determinação de clomipramina em formulações farmacêuticas, foi a estratégia adoptada para a inserção das amostras no fluxo. Através da introdução de volumes crescentes de uma solução de clomipramina com uma concentração de 10 mg L^{-1} verificou-se que a utilização da técnica de amostragem binária, que como já referido consiste na intercalação de pequenas alíquotas de solução de clomipramina com pequenas alíquotas de solução de vanadato (originando uma cadeia contínua de interfaces amostra/reagente) aumentou de um modo significativo a intensidade de sinal, relativamente ao sinal obtido aquando da inserção de volumes únicos de amostra. O aumento da intensidade de sinal analítico resultante da utilização da estratégia de amostragem binária, deve-se ao maior número de interfaces amostra/reagente, associado a uma menor ocorrência de dispersão nessas interfaces, o que favoreceu a homogeneização da clomipramina com o oxidante vanadato, incrementando o desenvolvimento da reacção. Este procedimento foi muito importante dado que as soluções analisadas foram preparadas numa solução de ácido sulfúrico $5,0 \text{ mol L}^{-1}$

cuja própria natureza a torna muito viscosa, porque em consequência da elevada viscosidade desta solução, uma alíquota da amostra introduzida como um volume único, originava unicamente duas zonas de interface, o que restringiria o desenvolvimento da reacção devido à mistura ineficiente entre amostra e reagente, durante o transporte da zona de reacção para o sistema de detecção. Em alternativa a usar-se longos reactores para promover uma eficiente mistura amostra e reagente, o que resultaria num aumento da dispersão da amostra e portanto diminuição da amplitude do sinal analítico, a exploração da metodologia de amostragem binária promove a formação de múltiplas zonas de interface que se comportam como uma única e homogénea zona de reacção, enquanto o sistema analítico permanece estruturalmente simples e eficiente. A avaliação do desempenho da amostragem binária foi realizada estabelecendo um tempo de amostragem total de 12 segundos (o que para um caudal de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ corresponde a $200 \text{ }\mu\text{L}$ de volume de amostra) e usando distintas sequências de intercalação de maneira a manter constante o valor correspondente a número de ciclos $\times$ tempo de intercalação: 12 ciclos $\times$ 1 s (para amostra e reagente); 6 ciclos $\times$ 2 s; 4 ciclos $\times$ 3 s; 6 ciclos $\times$ 2 s e 1 ciclo $\times$ 12 s. Os resultados confirmaram que a utilização de um tempo de intercalação de 1 s possibilitava a obtenção do mais elevado sinal analítico como consequência de uma mistura melhorada. Deste modo, todos os ensaios realizados posteriormente foram efectuados recorrendo à amostragem binária com tempos de intercalação amostra/reagente de 1 segundo/1 segundo.

A influência no sinal analítico da concentração de vanadato de amónio na análise da clomipramina em fluxo foi avaliada por comparação dos sinais analíticos obtidos com uma solução 20 mg L^{-1} de clomipramina e um intervalo de concentrações de oxidante de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, tendo sido escolhido este intervalo de concentrações de acordo com os resultados obtidos nos ensaios preliminares. Da análise dos resultados representados na Figura 3.8,

conclui-se que de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, o sinal analítico obtido, traduzido em altura de sinal registado, teve um aumento acentuado e depois atingiu a estabilização. Estes resultados foram concordantes com os resultados obtidos nos ensaios preliminares. Deste modo, para os restantes ensaios utilizou-se como oxidante uma solução $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de vanadato de amónio.

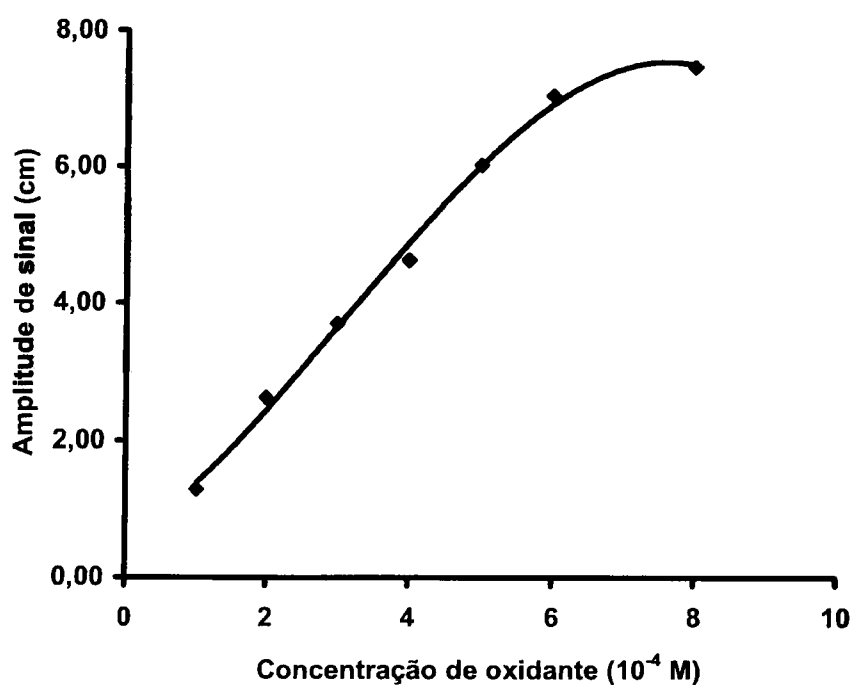


Figura 3.8

Influência no sinal analítico de diferentes concentrações de vanadato de amónio. Volume de amostra = $100 \mu\text{L}$ (Tempo de amostragem = 6 segundos); Caudal = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; Reactor = 1,0 metros.

Visando um estudo da variação do sinal analítico em função da concentração de ácido sulfúrico entre $3,0$ e $6,0 \text{ mol L}^{-1}$, revelou-se um comportamento da resposta analítica semelhante aos resultados obtidos nos ensaios preliminares em estado

estacionário, representado na Figura 3.9. Neste ensaio, efectuou-se a análise da solução de clomipramina com dois tempos de amostragem diferentes, 6 e 12 segundos, embora a optimização dos tempos de amostragem (volumes de amostragem) tivesse sido efectuada posteriormente.

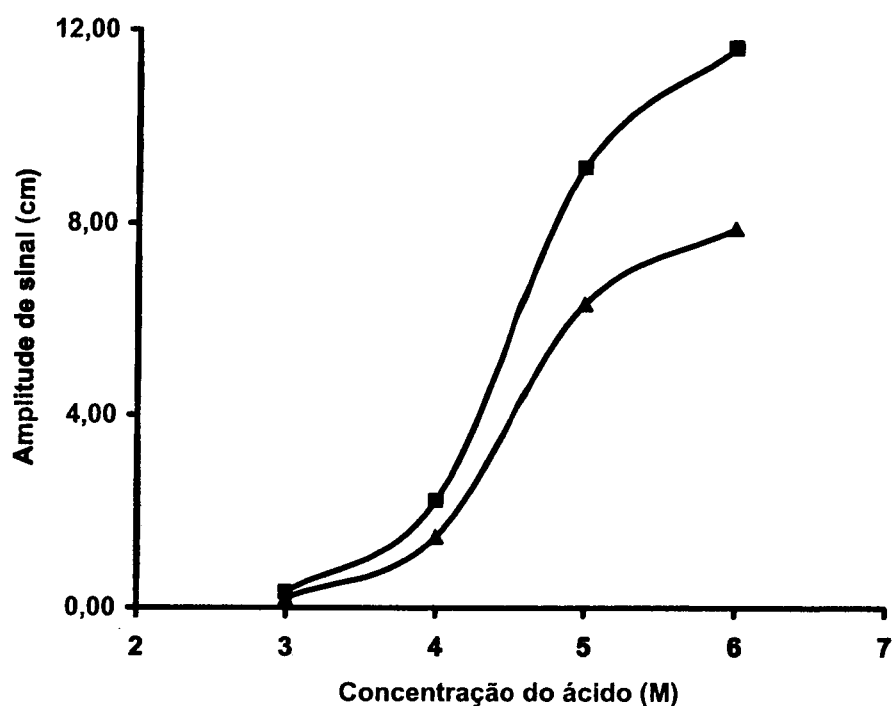


Figura 3.9

Influência no sinal analítico de diferentes concentrações de ácido sulfúrico. Volume de amostra = 100 μ L (Tempo de amostragem = 6 segundos); Caudal = 1,0 mL min^{-1} ; Reactor L_1 = 1,0 metros;

▲ – Tempo de amostragem = 6 s; ■ – Tempo de amostragem = 12 s.

Pela análise dos resultados na Figura 3.9, verifica-se que a diferença de sinal analítico obtido com a acidificação da zona de reacção com ácido sulfúrico a 5,0 mol L^{-1} e a 6,0 mol L^{-1} não é significativa, pelo que a solução de ácido sulfúrico a

utilizar nos ensaios posteriores foi de $5,0 \text{ mol L}^{-1}$. É também para esta concentração que se verifica uma diferença significativa na resposta entre os dois tempos de amostragem, e que não é observada para concentrações de ácido sulfúrico inferiores.

O estudo da influência do comprimento do reactor e do caudal foi executado simultaneamente dado que estes parâmetros determinam o tempo de residência e consequentemente a extensão do desenvolvimento da reacção, afectando deste modo a amplitude do sinal analítico. Uma solução 10 mg L^{-1} de clomipramina foi inserida a diferentes tempos de amostragem e transportada em direcção ao detector com distintos caudais de $0,5$, $1,0$, e $1,5 \text{ ml min}^{-1}$. Os tempos de amostragem, correspondentes a determinados volumes consoante os parâmetros analíticos da montagem, variaram entre 1 segundo e 40 segundos. Ao mesmo tempo o comprimento do percurso analítico foi alterado através da substituição do reactor L_1 , utilizando comprimentos de $0,5$, $1,0$, $1,5$ e $2,0$ metros para cada ensaio de caudal efectuado. Apresenta-se em seguida uma compilação gráfica dos resultados obtidos, representados em três gráficos, correspondendo cada, a um determinado caudal ensaiado (Figura 3.10).

Observou-se que para um caudal de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ (Figura 3.10(A)) o sinal analítico mais elevado foi obtido com montagens em que se utilizava um reactor com $1,0$ metros de comprimento. O aumento do comprimento do reactor resultou na diminuição do sinal analítico, o que pode ser explicado pelo aumento da dispersão da amostra que se predomina ao facto de o tempo de reacção ser maior. Um reactor de $0,5$ metros originou um sinal analítico semelhante ao obtido usando $1,0$ metros de reactor, mas apenas para valores de volume de amostra inferiores a $40 \text{ }\mu\text{L}$. Com o aumento do volume de amostra para valores superiores a $40 \text{ }\mu\text{L}$ a altura de sinal obtida com a utilização de um reactor de $0,5$ metros diminuiu e aproximou-se do valor obtido com $2,0$ metros de reactor.

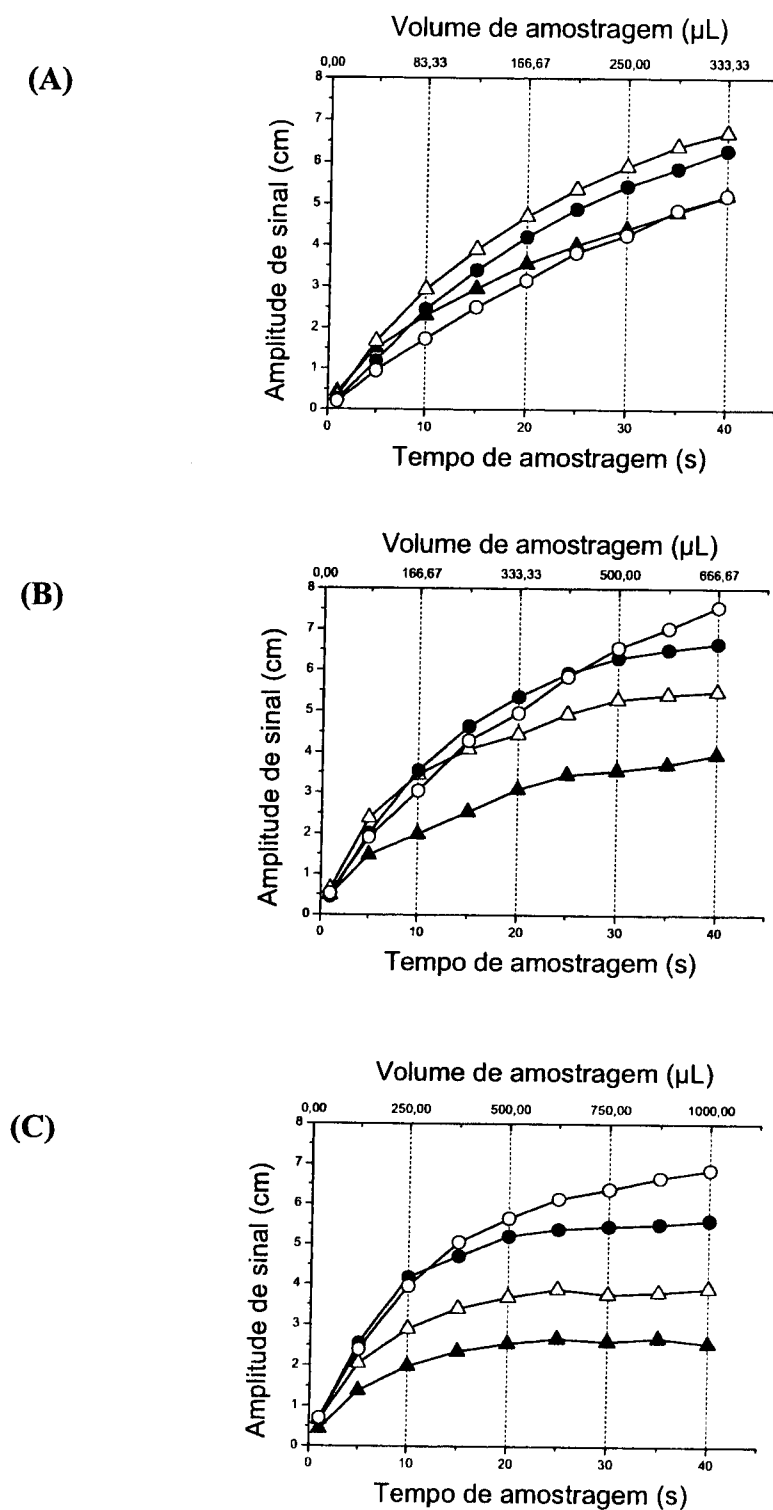


Figura 3.10

Avaliação da influência no sinal analítico de diversos comprimentos de reactor e caudais, em função da variação do tempo de amostragem. ▲ – reactor = 0,5 m; Δ – reactor = 1,0 m; ● – reactor = 1,5 m; ○ – reactor = 2,0 m.

(A) – Caudal 0,5 mL min⁻¹; (B) – 1,0 mL min⁻¹; (C) – 1,5 mL min⁻¹.

Estes resultados confirmam que elevados valores de dispersão de amostra (com 2,0 metros de reactor), e baixos tempos de reacção ou mistura ineficiente entre amostra e reagente (com 0,5 metros de reactor), resulta em sinais analíticos acentuadamente inferiores.

Para o ensaio referente a um caudal de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ (Figura 3.10(B)), observa-se que para volumes de amostra inferiores a $166 \mu\text{L}$, e com um reactor de 1,0 metros de comprimento, o sinal analítico obtido foi semelhante ao obtido com o uso de um reactor de 1,5 metros. Mas, comparando com o sinal obtido aquando da utilização de um reactor com 2,0 metros de comprimento verifica-se que com 1,0 metros de reactor o sinal é superior. No entanto, para volumes de amostra superiores verifica-se que a altura de sinal analítico aumenta com o aumento do comprimento do reactor. Este último comportamento também se observa quando se utiliza um caudal de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ (Figura 3.10(C)). Neste caso, a dispersão foi suficiente para garantir uma adequada mistura amostra/reagente, ao mesmo tempo que o crescente tempo de reacção providenciou um extenso desenvolvimento de cor. De facto, reactores de reduzido comprimento resultaram em inferiores tempos de residência, ou seja, quando a zona de amostra chegou ao detector a reacção não apresentava suficiente desenvolvimento.

Considerando que para um reactor de 1,0 metros a variação na altura de sinal tanto para um caudal de 0,5 como de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ não era significativo, e considerando como objectivo um compromisso entre sensibilidade e ritmo de amostragem, foi seleccionado um caudal de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ para as experiências seguintes.

O estudo relativo à influência que o volume de amostra exerce no sinal analítico foi efectuado com base no tempo de amostragem, isto é, para um determinado caudal o tempo de amostragem estabelecia o volume de amostra inserido no sistema de fluxo. De acordo com Ruzicka [48] a dispersão de uma zona de amostra num sistema de fluxo é inversamente proporcional ao volume de amostra introduzido, e inclusivamente, para segmentos de amostra muito grandes a porção

central dessa zona pode eventualmente não sofrer fenómenos de dispersão. Sendo assim, no caso do sinal analítico depender da dispersão, se esta é alterada através de alterações no volume de amostra introduzido, ocorrem variações na amplitude do sinal analítico. Verificou-se que controlando o tempo de amostragem era possível manipular a dispersão da amostra, e deste modo, controlar o intervalo de concentrações de clomipramina que apresenta resposta linear em relação ao sinal, o que constitui uma grande vantagem dos sistemas de multicomutação: a variação do volume de amostra com base no tempo ilimitado. Significa isto que o tempo de amostragem pode ser programado entre 0 segundos até tempo infinito, teoricamente, o que se traduz em volumes variáveis de amostra introduzidos no sistema. Se o volume de amostra fosse inserido por intermédio do procedimento de inserção de volumes únicos, então conforme se aumentava o volume de amostra introduzido no sistema, menor seria progressivamente o efeito de dispersão na zona central da zona de amostra. No entanto, recorrendo à amostragem binária há sempre reagente presente no centro da zona de amostra. Por isso, conforme se aumenta o volume de amostra introduzido no sistema, também se aumenta o volume de reagente, mas os efeitos de dispersão axial ocorrem essencialmente nas extremidades da zona de reacção, influenciando menos a zona central em proporção ao volume de amostra introduzido.

Este estudo foi executado através da inserção de uma solução de clomipramina 10 mg L⁻¹ com tempos de amostragem crescentes, utilizando o sistema de amostragem binária já definido: 1 segundo de amostra/1 segundo de reagente. Para um reactor de 1,0 metros e um caudal de 1,0 ml min⁻¹ verificou-se que a altura de sinal aumentou pronunciadamente com o tempo de amostragem até aproximadamente 12 segundos, o que corresponde a 200 µL de volume de amostra. Para valores superiores a 200 µL de amostra o sinal analítico continua a aumentar, mas notoriamente esses aumentos são muito menos significativos, revelando tendência para a estabilização de sinal analítico. Para um tempo de

amostragem de 12 segundos o valor de altura de sinal era quase o dobro do valor obtido com um tempo de amostragem de 6 segundos (100 μL de volume de amostra). Estes resultados (Figura 3.10(B)) confirmam que sem a reconfiguração do sistema analítico era possível realizar a análise com diferentes sensibilidades, o que resultava em zonas de resposta linear distintas. De facto, um tempo de amostragem de 6 segundos possibilitava a análise de amostras num intervalo de concentrações até 50 mg L^{-1} com relação linear entre o sinal analítico e a concentração, enquanto que para um tempo de 12 segundos a zona de resposta linear alterava para um intervalo de concentrações até 40 mg L^{-1} . A possibilidade de realizar determinações em amostras com concentrações muito diversas sem efectuar alterações físicas na configuração do sistema analítico é uma característica vantajosa, e que pode ser particularmente útil quando aplicada em estudos de dissolução de formulações farmacêuticas onde as concentrações das soluções podem ser alteradas entre valores próximos de zero e valores muito elevados.

Com fins de comparação e estabelecendo como prioridade um compromisso entre o ritmo de amostragem e sensibilidade, os tempos de amostragem utilizados para realizar as determinações analíticas foram de 6 e 12 s. Os resultados confirmaram que para uma aplicação corrente uma escolha teria que ser feita: um tempo de amostragem de 6 s aumenta o ritmo de amostragem (22 amostras h^{-1}) mas reduz o sinal analítico entre 30 a 40% enquanto que com um tempo de amostragem de 12 s o sinal analítico é maximizado e deste modo a sensibilidade da determinação, mas afecta acentuadamente o ritmo de amostragem em cerca de 18%, o que equivale a aproximadamente 18 amostras h^{-1} . Deste modo, e devido à versatilidade de manipulação da etapa de amostragem nos sistemas automáticos de fluxo por multicomutação, optou-se por efectuar as determinações em amostras com os dois tempos de amostragem de 6 e 12 segundos.

3.3.3. Análise de formulações farmacêuticas

A aplicação da metodologia em fluxo para a determinação de clomipramina em formulações farmacêuticas obviamente inclui também o estudo da influência de alguns compostos utilizados normalmente como excipientes. Soluções de amostra contendo uma quantidade fixa de clomipramina (20 ou 30 mg L⁻¹) e diferentes concentrações dos excipientes em análise, foram analisadas pelo método desenvolvido. Um composto foi considerado como não interferente quando a variação de sinal analítico era $\pm 3\%$ quando comparado com o sinal analítico obtido na ausência do composto referido. Os resultados demonstraram que os excipientes (glucose, sucrose, galactose, lactose, benzoato de sódio e estearato de magnésio) não interferiram a partir de uma razão molar superior a 100 vezes relativamente à clomipramina.

Após a optimização do sistema com um caudal de 1 ml min⁻¹ e um reactor de 1,0 metros e utilizando sequências de amostragem binária com intercalação de 6 ou 12 ciclos de 1 s de amostra/1 s de monovanadato de amónio, foram obtidos intervalos de resposta linear para concentrações de clomipramina até 50 e 40 mg L⁻¹, respectivamente. Para um tempo de amostragem de 6 s, a curva analítica foi representada por $A = 0,1904 C + 0,0665$ em que A era a altura de pico expressa em cm e C era a concentração de clomipramina expressa em mg L⁻¹, com um coeficiente de correlação de 0,9996 (Figura 3.11), e o limite de detecção associado era de 2,23. Para 10 determinações consecutivas, o desvio padrão relativo foi inferior a 2,0%. Para um tempo de amostragem de 12 s, a equação que relaciona o sinal analítico com a concentração foi $A = 0,2903 C + 0,1496$, com um coeficiente de correlação de 0,9994 (Figura 3.11), e um limite de detecção de 2,29. Para 10 determinações consecutivas, o desvio padrão relativo (em percentagem) foi inferior a 1,3%.

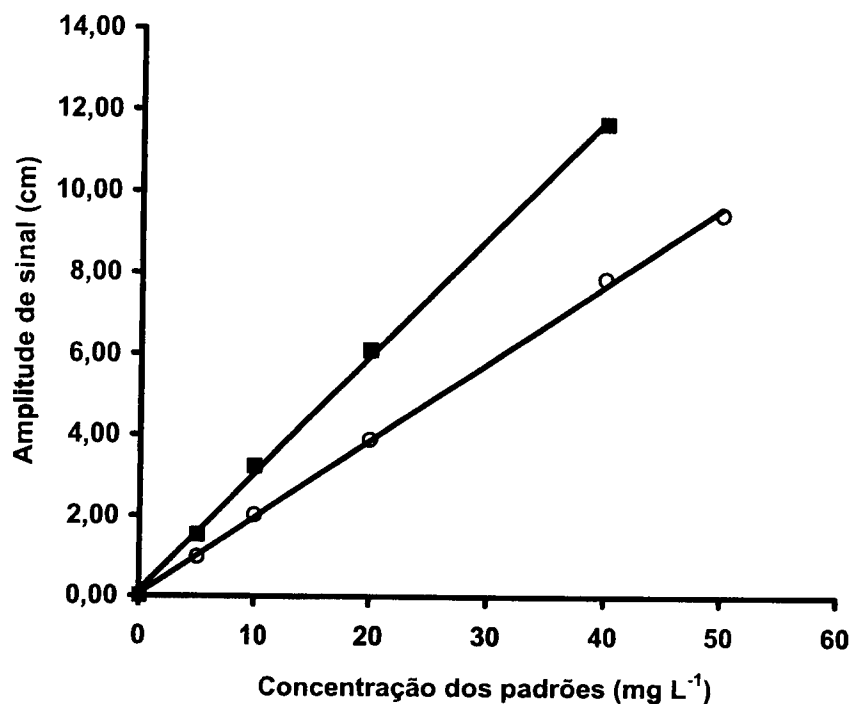


Figura 3.11

Curvas de calibração obtida com soluções padrão de clomipramina com concentrações até 50 ou 40 mg L⁻¹, para os tempos de amostragem 6 s (○) e 12 s (■), respectivamente.

A metodologia desenvolvida foi avaliada na determinação da clomipramina em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos quando comparados com os obtidos pelo método de referência demonstram um desvio relativo entre -1,2% e 2,6%. Os resultados apresentam-se sumariados na Tabela 3.1.

Durante a realização das determinações analíticas não se verificou qualquer desvio da linha de base.

Tabela 3.1

Resultados obtidos para a determinação de clomipramina em preparações farmacêuticas.

Amostra	Concentração declarada (mg/formulação)	Tempo de Amostragem (s)	Concentração encontrada (mg/formulação)		D.R. ^a (%)
			Metodologia desenvolvida ^b	Método de Referência	
Anafranil 10 (comprimidos)	10	6	10.0 ± 0.1	10.1	-1.0
		12	10.2 ± 0.1	10.1	1.0
Anafranil 25 (comprimidos)	25	6	25.4 ± 0.3	25.4	0
		12	25.1 ± 0.3	25.4	-1.2
Anafranil 75 (comprimidos de libertação prolongada)	75	6	74.2 ± 0.3	73.6	0.8
		12	75.5 ± 0.9	73.6	2.6
Anafranil 25 (injectável)	25	6	25.2 ± 0.5	25.5	-1.2
		12	25.7 ± 0.2	25.5	0.8

^a Desvio relativo para a metodologia desenvolvida em relação ao procedimento de referência.

^b Média±desvio padrão

3.4. Conclusões

Os resultados obtidos mostram que a monitorização espectrofotométrica dos produtos de reacção entre a clomipramina e o monovanadato é uma alternativa analítica para a determinação deste fármaco antidepressivo em preparações farmacêuticas. Quando implementado num sistema de fluxo contínuo multicomutado permitiu o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida e facilmente automatizada, que pode ser aplicada vantajosamente em análises de rotina. Esta possibilidade é reforçada pela não interferência de substâncias usadas

geralmente como excipientes. Além disso, não requer qualquer pré-tratamento da amostra (a filtração é realizada em linha), ao contrário do método de referência em que obrigatoriamente se dilui e filtra manualmente, o que pode melhorar notoriamente o tempo necessário para a análise. Apesar da sua simplicidade, a metodologia de fluxo de canal único proposta combina a capacidade de mistura homogênea rápida conferida pela amostragem binária com um controlo efectivo da dispersão, devido à versátil inserção de amostra com base no tempo e baixo consumo de reagentes (na ordem dos microlitros). Ainda para mais, provou ser exacta e versátil porque possibilitou múltiplas manipulações da amostra sem implicar alterações na configuração estrutural do sistema. Estes factos referidos como vantagens dos sistemas de fluxo multicomutados, demonstram a capacidade de adaptação destes sistemas para a análise de amostras de diferentes concentrações, como acontece com os ensaios de dissolução de fármacos em formas farmacêuticas orais sólidas, os quais são actualmente procedimentos correntes fundamentais, e que deste modo poderão ser desejavelmente executados de forma automática.

Por outro lado, devido à sua estrutura modular, o sistema pode ser facilmente modificado para aplicação na determinação de outros compostos. Caso a reacção química envolvida seja diferente da utilizada neste trabalho, e consequentemente também as variáveis químicas e físicas, como por exemplo, concentrações de reagentes, pH do meio e temperatura, este sistema possibilita além da versatilidade na manipulação da zona de amostra, a introdução de outros componentes, como um banho termostaticado, ou a substituição do reactor por outro de comprimento diferente. Também a introdução de mais válvulas solenóides para inserção de diferentes reagentes é facilmente efectuada, resultando numa montagem com maior diversidade de percursos analíticos, e consequentemente, uma maior diversidade de reacções químicas que se podem realizar. A inserção de mais válvulas solenóides no sistema de fluxo não constitui

qualquer aumento na dificuldade de controlo do sistema, visto que, como o controlo de activação e de desactivação das mesmas é efectuado por computador através de programas, apenas é necessário efectuar a introdução adicional dos dados para controlo das válvulas adicionadas. O sistema de detecção acoplado também pode ser facilmente substituído, desde que o equipamento seja adaptado para determinações analíticas em fluxo.

3.5. Referências bibliográficas

- 1 The Merck Index 13thEd.
- 2 The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman's & Gilman's, 10th Ed., McGraw-Hill (2001)
- 3 <http://www.mentalhealth.com>
- 4 J. Godbillon, S. Gauron, J. Chromatogr., 204, 303 (1981)
- 5 P. P. Rop, A. Viala, A. Durand, T. Conquy, J. Chromatogr., 338, 171 (1985)
- 6 M. P. Segatti, G. Nisi, F. Grossi, M. Mangiarotti, C. Lucarelli, J. Chromatogr., 536, 319 (1991)
- 7 A. M. V. Rodriguez, M. I. Arranzpena, J. J. L. Ibor, M. G. Aguilera, R. Vinas, I. Moreno, A. M. V. Morales, J. Pharm. Biomed. Anal., 9, 949 (1991)
- 8 K. K. Nielsen, K. Brosen, Ther. Drug Monit., 15, 122 (1993)
- 9 P. Marescaux, E. Belan, N. Houdret, N. Goudemand, M. Lhermitte, J. Liq. Chromatogr., 17, 2171 (1994)
- 10 S. Joron, H. Robert, Biomed. Chromatogr. 8, 158 (1994)
- 11 F. Coudore, F. Hourcade, C. MolinierManoukian, A. Eschalier, E. Lavarenne, J. Anal. Toxicol., 20, 101 (1996)
- 12 H. Weigmann, S. Hartter, C. Hiemke, J. Chromatogr., B 710, 227 (1998)
- 13 R. Theurillat, W. Thormann, J. Pharm. Biomed. Anal., 18, 751 (1998)
- 14 L. Palego, D. Marazziti, L. Biondi, G. Giannaccini, N. Sarno, A. Armani, A. Lucacchini, G. B. Cassano, L. Dell'Osso, Ther. Drug. Monit., 22, 190 (2000)

- 15 R. Pirola, E. Mundo, L. Bellodi, S. R. Bareggi, *J. Chromatogr.*, B 772, 205 (2002)
- 16 J. J. Berzas, C. Guiberteau, A. M. Contento, V. Rodriguez, *Chromatographia* 56, 545 (2002)
- 17 C. Frahnert, M. L. Rao, K. Grasmader, *J. Chromatogr.*, B 942, 35 (2003)
- 18 H. Yoshida, K. Hidaka, J. Ishida, K. Yoshikuni, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Anal. Chim. Acta.*, 413, 137 (2000)
- 19 D. Alkalay, J. Volk, S. Carlsen, *Biomed. Mass. Spectrom.*, 6, 200 (1979)
- 20 S. J. Gaskell, *PostGrad. Med. J.*, 56, 90 (1980)
- 21 A. Sioufi, F. Pommier, J. P. Dubois, *J. Chromatogr-Biomed.*, 428, 78 (1988)
- 22 R. de la Torre, J. Ortuno, J. A. Pascual, S. Gonzalez, J. Ballesta, *Ther. Drug Monit.*, 20, 340 (1998)
- 23 Z. Chlobowska, E. Chudzikiewicz, P. Koscielniaik, W. Piekoszewski, A. Stolarz, *Chem. Anal.*, 48, 255 (2003)
- 24 M. A. Martinez, C. S. de la Torre, E. Almarza, *J. Anal. Toxicol.*, 27, 353 (2003)
- 25 J. J. B. Nevado, M. J. V. Llerena, A. M. C. Salcedo, E. A. Nuevo, *J. Chromatogr. Sci.*, 38, 200 (2000)
- 26 J. Rodriguez, J. J. Berzas, A. M. Contento, M. P. Cabello, *J. Sep. Sci.*, 26, 915 (2003)
- 27 J. J. Berzas, C. Guiberteau, M. J. Villasenor, V. Rodriguez, *Anal. Chim. Acta*, 519, 219 (2004)
- 28 O. Spreuxvaroquaux, D. Morin, C. Advenier, M. Pays, *J. Chromatogr-Biomed.*, 416, 311 (1987)
- 29 H. Chen, F. Gaul, D. Guo, A. Maycock, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22, 555 (2000)

- 30 H. S. Kou, C. C. Chen, Y. H. Huang, W. K. Ko, H. L. Hu, S. M. Wu, *Anal. Chim. Acta*, 525, 23 (2004)
 - 31 F. Arioz, L. Ersoy, *Pharmazie*, 49, 536 (1994)
 - 32 P. Nagaraja, M. F. Silwadi, A. A. Syed, *Anal. Lett.*, 33, 2913 (2000)
 - 33 P. Nagaraja, M. F. Silwadi, A. A. Syed, *Mikrochim. Acta*, 135, 185 (2000)
 - 34 G. M. Greenway, S. J. L. Dolman, *Analyst*, 124, 759 (1999)
 - 35 G. F. Read, D. Riadfahmy, *Clin. Chem.*, 24, 36 (1978)
 - 36 A. E. Elgendy, M. G. Elbardicy, H. M. Loutfy, M. F. Eltarras, *Spectrosc. Lett.*, 26, 1649 (1993)
 - 37 B. F. Reis, M. F. Gine, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. Lapa, *Anal. Chim. Acta*, 293, 129 (1994)
 - 38 J. L. F. C. Lima, J. A. V. Prior, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 467, 75 (2002)
 - 39 K. L. Marques, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, 518, 31 (2004)
 - 40 S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, A. A. S. C. Machado, J. L. F. C. Lima, J. M. Paulís, *Quim. Anal.*, 6, 278 (1987)
 - 41 B. F. Reis, M. F. Giné, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. Lapa, *Anal. Chim. Acta*, 293, 129 (1994)
 - 42 *British Pharmacopoeia 1998*, Vol. II, The Stationery Office, London, (1998)
 - 43 H.A. Mohamed, H.Y. Hassan, A.I. Mohamed, S.A. Hussein, *Anal. Lett.*, 25, 63 (1992)
 - 44 B. Renfroe, C. Harrington, G.R. Proctor, *Azepines, Part I*, Wiley, New York, (1984)
 - 45 Wieslawa Misiuk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22, 189 (2000)
-

- 46 A. Mohamed Horria, Y. Hassan Hoda, I. Mohamed Abdel-Maboud, A. Hussein Samiha, *Anal. Lett.*, 25, 63 (1992)
- 47 J. Karpinska, B. Starczewska, *Pharmazie*, 54, 41 (1999)
- 48 M. Valcarcel, M. D. L. Castro, "Flow-Injection Analysis: Principles and Applications", Ellis Horwood, Chichester (1987)

CAPÍTULO

4

DETERMINAÇÃO DE TRIMIPRAMINA COM UM SISTEMA AUTOMÁTICO MULTICOMUTADO COM INVERSÃO DE FLUXO

Neste capítulo é proposta uma metodologia analítica baseada no conceito de multicomutação, a qual combina a amostragem binária com a utilização de uma inversão do sentido do fluxo, para a determinação de trimipramina em preparações farmacêuticas. A intercalação de pequenos segmentos de amostra e reagente, favorecendo a mistura das soluções, e a combinação com a estratégia de inversão de sentido do fluxo, de modo a aumentar a interpenetração de zonas, resultou num desenvolvimento rápido da reacção.

4.1. Introdução

Os medicamentos antidepressivos têm demonstrado eficácia no controlo sintomático das perturbações depressivas do humor. Na verdade o seu desenvolvimento a partir da década de 50, do século passado, marcou uma das revoluções terapêuticas na área da saúde mental. Os antidepressivos de um modo geral interferem com a recaptação sináptica de um ou mais neurotransmissores. A noradrenalina e a serotonina são os neurotransmissores mais relevantes no processo.

O fármaco maleato de trimipramina, maleato de 5-(3-dimetilamino-2-metilpropil)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[*b,f*]azepina (Figura 4.1), é um agente antidepressivo tricíclico com actividade sedativa e redutora da ansiedade, e que eficazmente actua no tratamento de estados de insónia primários.

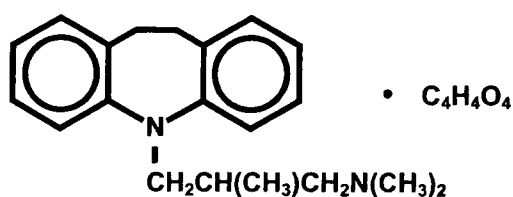


Figura 4.1

Estrutura química de Maleato de Trimipramina.

Quando a depressão surge, pode ocorrer uma diminuição da quantidade dos transmissores noradrenalina e serotonina, libertados das células nervosas no cérebro. Quando estes neurotransmissores são libertados das células nervosas causam efeitos de aumento do humor. Quando são reabsorvidos, não exercem esse efeito.

A trimipramina actua através do bloqueio da recaptação de noradrenalina e serotonina nas células nervosas. Deste modo, o seu mecanismo de actuação é por intermédio de um prolongamento dos efeitos de aumento de humor provocado pela existência dos neurotransmissores nas sinapses nervosas [1]. Devido ao seu perfil farmacológico, a trimipramina tem também utilidade no tratamento de casos psicóticos.

Nas situações de administração desta droga a doentes com qualquer indício de doença cardiovascular, são necessários cuidados especiais devido à possibilidade de interferências a nível da condução cardíaca, ocorrência de arritmias, enfarte do miocárdio e taquicardia. Do mesmo modo que, se deve ter atenção com a sua administração em pacientes com elevada pressão intra-ocular, história de retenção urinária, ou glaucoma, por causa das propriedades anti-colinérgicas do fármaco; nos doentes com hipertiroidismo, ou em tratamento cujo alvo é a tiróide, devido à toxicidade cardiovascular da trimipramina; em doentes medicados com guanetidina ou fármacos semelhantes, porque a trimipramina pode interferir com os efeitos farmacológicos desta droga [1].

Em qualquer paciente em estado avançado de depressão, a possibilidade de cometer suicídio é elevada, pelo que, quando estes doentes não se encontram hospitalizados, a dosagem de trimipramina prescrita deve ser a mais baixa possível.

Consequentemente, a relevância terapêutica e farmacológica da trimipramina, conjuntamente com a sua inerente toxicidade (efeitos adversos dos antidepressivos tricíclicos referidos no Capítulo 3), motivou o desenvolvimento de

diversos métodos para a determinação do fármaco em formulações farmacêuticas como também em amostras biológicas.

Encontra-se referido na literatura diversas metodologias cromatográficas, nomeadamente: cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC) com detecção por espectrofotometria na região do ultravioleta [2-6], HPLC com detecção electroquímica [7-8], HPLC acoplado a um detector de massa [9], cromatografia líquida (CL) com detector de massa [10-11], CL com detecção electroquímica [12], cromatografia gasosa (CG) com detector de nitrogénio/fósforo [13], CG com detector por ionização em chama [14], CG com detector de espectrometria de massa [15-16], cromatografia gás-líquido com detector de nitrogénio/fósforo [17-18]. Em 1993 foi desenvolvido um trabalho para determinação de alguns antidepressivos, de entre os quais a trimipramina, em plasma humano, por Cromatografia Electrocínética Micelar [19]. Para a determinação de trimipramina, e também de outros compostos antidepressivos tricíclicos, em formulações farmacêuticas, Kou *et. al.* desenvolveram em 2004 uma metodologia baseada em electroforese capilar com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta [20].

Na área dos métodos electroquímicos, também foram realizados diversos trabalhos para a determinação de antidepressivos, envolvendo nomeadamente, métodos voltamétricos [21-23].

Em 1999, foi publicado um trabalho para a determinação de diversos antidepressivos tricíclicos, de entre os quais a trimipramina, com detecção por quimioluminescência electrogerada, através da reacção dos grupos amina terciários com tris(2,2'-bipiridil)ruténio(II) [24].

A utilização da espectrofluorimetria para determinação de trimipramina, e também seus metabolitos desmetilados em plasma humano, foi proposta em 1978, por McKim *et. al.* [25].

Em 1986, é proposto um trabalho que envolve medidas condutimétricas, por Nikolic *et. al.* [26], para a determinação de maleato de trimipramina em formulações farmacêuticas, por titulação com ácido silicotungstico e fosfotungstico.

Os métodos colorimétricos com detecção na região do visível também foram utilizados para a determinação de antidepressivos. Destaca-se, em 1998 [27], a determinação da trimipramina por reacção com sulfato de cério (IV) e iodato de potássio, e determinação da absorvência dos produtos de reacção a 620 e a 670 nm, respectivamente. Em 2000, foi proposto um método para a determinação de trimipramina [28], baseado na interacção de dihidroclorato de p-fenilenediamina diazotizada com antidepressivos, em meio ácido, com detecção no comprimento de onda de 565 nm. No mesmo ano, outro trabalho [29], envolveu uma reacção com ferro (III), e subsequente, reacção com cianeto de ferro em ácido acético, originando produtos de reacção com máximo de absorvência no intervalo de comprimentos de onda de 720 a 730 nm.

No entanto, muitos dos métodos referidos requerem longos tempos de análise ou equipamento relativamente muito dispendioso. Por exemplo, o método de referência da Farmacopeia Europeia [30] envolve uma titulação potenciométrica em meio não-aquoso da trimipramina com uma solução 0,1 M de ácido perclórico, em ácido acético glacial.

Na determinação de trimipramina as vantagens associadas às metodologias analíticas automáticas foram muito pouco exploradas, sendo somente possível encontrar uma referência na literatura, relativa à determinação da trimipramina através de uma metodologia de Análise por Injecção em Fluxo (FIA).

Neste capítulo estudou-se a possibilidade de desenvolvimento de um sistema multicomutado para a determinação de trimipramina em formulações farmacêuticas.

Uma das muitas características que pode ser usada para caracterizar, ou estabelecer semelhanças ou diferenças entre técnicas de fluxo contínuo, é a estratégia empregue para efectuar a mistura entre amostra e reagente. De acordo com o que já foi referido no Capítulo 1, enquanto que em FIA [31] a zona de amostra é intercalada normalmente numa corrente de transportador, na qual convergem posteriormente outras correntes, como por exemplo, de reagentes, seguindo-se o transporte da zona de reacção para a detecção, em Análise por Injecção Sequencial (SIA) [32] uma zona de amostra e uma zona de reagente são sequencialmente inseridas e retidas num canal de retenção originando uma zona de reacção que é posteriormente transportada, através da inversão do sentido do fluxo, em direcção ao sistema de detecção, atravessando ainda um reactor para promover adicionalmente o desenvolvimento da reacção. É importante referir que em SIA, o processo de homogeneização das soluções assenta em grande parte na inversão do sentido do fluxo.

Em ambas as metodologias de fluxo, a eficiência dos procedimentos de mistura é de primordial importância para um conveniente desenvolvimento da reacção, e usualmente envolve a dispersão mútua entre amostra e reagente dentro de um reactor de adequadas dimensões, não apenas para melhorar a resposta analítica, mas igualmente a reprodutibilidade dos sinais analíticos.

Os sistemas de fluxo baseados na metodologia de multicomutação [33] fundamentados na utilização de múltiplos dispositivos monocomutadores automáticos (válvulas solenóides) possibilitam a exploração de um procedimento distinto para a inserção de amostra e reagente - amostragem binária. Este procedimento origina múltiplas interfaces de reacção para cada solução de amostra, que se juntam total ou parcialmente durante o transporte para o sistema de detecção acoplado ao sistema. No entanto, embora se consiga uma óptima mistura amostra/reagente, a presença de um reactor é essencial para promover

dispersão adicional da amostra, mesmo sendo um reactor de pequeno comprimento.

No trabalho descrito neste capítulo, através da combinação do potencial de mistura da amostragem binária e da penetração de zonas obtida com inversão do fluxo [34], obteve-se um sistema multicomutado com uma melhor homogeneização de soluções em fluxo, possibilitando inclusive a utilização de soluções muito viscosas. A combinação de amostragem binária com inversão do sentido do fluxo permitiu também a redução significativa do comprimento do reactor ou até a sua supressão aparente, enquanto se assegurava elevada reprodutibilidade, sensibilidade e ritmo de amostragem, e ainda, baixo consumo de reagentes. A utilização da expressão “supressão aparente” está relacionada com o facto de existir sempre, entre um determinado ponto de confluência e o detector, um segmento de tubo para o transporte das soluções entre os referidos pontos. Deste modo, a situação de supressão total do reactor corresponderia à convergência das soluções exactamente no local de detecção da montagem analítica.

Experiências preliminares visando a avaliação da reactividade dos átomos de azoto quimicamente activos da trimipramina revelaram que este composto reage com o oxidante monovanadato de amónio em meio ácido originando produtos de cor azul com o máximo de absorvência a 620 nm. Esta reacção foi, deste modo, utilizada para a implementação de um método automático para a determinação espectrofotométrica na região do visível, da trimipramina em formulações farmacêuticas, através do desenvolvimento de um sistema de fluxo baseado em multicomutação, com capacidades analíticas optimizadas em virtude do procedimento de amostragem binária estar associado com o processo de inversão de direcção do fluxo.

4.2. Parte Experimental

4.2.1. Reagentes

Foi preparada diariamente uma solução 400 mg L^{-1} de trimipramina através da dissolução de 55,78 mg de maleato de trimipramina em 100 mL de uma solução $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico. Esta solução foi conservada no frigorífico, excepto nas situações da sua utilização para a preparação de soluções padrão. As soluções padrão foram preparadas por apropriadas diluições da solução mais concentrada de trimipramina, em solução $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico.

A solução $8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de monovanadato de amónio foi preparada por dissolução de 104,4 mg do composto, numa solução $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico, e completando o volume para 100 mL com a mesma solução de ácido.

As soluções de amostras foram preparadas a partir de formulações farmacêuticas disponíveis comercialmente (comprimidos de Surmontil 25 mg e Surmontil 100 mg), através da dissolução de quantidades apropriadas de comprimidos pulverizados, numa solução $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico. As soluções de amostra analisadas pela metodologia descrita no presente capítulo não foram sujeitadas a qualquer pré-tratamento, incluindo a filtração, porque se verificou que as soluções de amostra não eram turvas e que não ocorria diferença de sinal obtido entre a utilização de soluções de amostra filtradas e não filtradas.

4.2.2. Equipamento

Foi utilizado um espectrofotómetro da marca Jenway (Jenway, UK), modelo 6100, equipado com uma célula de fluxo Hellma com volume interno de 18 μ L, para efectuar as leituras de absorvência no comprimento de onda 620 nm.

A montagem de fluxo incluía quatro válvulas solenóides (NRResearch, USA): duas de três vias (duas entradas e uma saída) e duas de duas vias (uma entrada e uma saída). Tubos de fluxo e reactores eram em PTFE, com 0,8 mm de diâmetro interno, da marca Omnifit. Também se utilizou confluências, conectores e adaptadores construídos no laboratório [35]. Uma bureta automática da marca Crison, modelo BU 2030, equipada com uma seringa de vidro de volume 5,0 mL, foi utilizada para aspirar e impulsionar (fluxo bi-direccionado) as soluções através do sistema. Como dispositivo de potência para alimentação e controlo das válvulas solenóides de comutação usou-se um circuito baseado num integrado ULN 2003 [36]. O controlo do sistema analítico através do computador efectuou-se por intermédio de uma placa de interface PC-LabCard, modelo PCL-818L, da marca Advantech. Todo o controlo do sistema analítico dependia de um único microcomputador Pentium a 200 MHz e de um programa informático. O controlo envolvia o funcionamento sincronizado da bureta automática e a activação dos solenóides das válvulas anteriormente referidas. O programa foi desenvolvido em linguagem BASIC e possibilitava o controlo individualizado das múltiplas válvulas solenóides e o funcionamento da bureta automática, através de simples comandos.

4.2.3. Montagem de fluxo

O sistema de fluxo desenvolvido (Figura 4.2) envolvia quatro válvulas solenóides: duas de duas vias (V_1 e V_2) normalmente fechadas, e duas de três vias (V_3 e V_4). Em virtude da metodologia explorada neste trabalho, envolvendo a inversão do sentido do fluxo, é relevante referir que a bureta automática também tinha uma válvula (VB), mas esta era de constituição diferente das válvulas solenóides. A válvula VB possuía duas vias, sendo a selecção da via aberta determinada pela posição de um mecanismo capaz de rodar 180° . O controlo desta válvula, assim as válvulas solenóides, também podia ser efectuado através do programa informático de controlo desenvolvido.

Nas primeiras experiências, a montagem de fluxo envolvia dois reactores (L_1 e L_2), mas após a optimização, como será discutido adiante, o reactor L_2 foi removido. Um esquema da montagem analítica contendo a representação do reactor L_2 encontra-se na Figura 4.3 (página 4-15).

A bureta automática (B) estava sempre cheia com solução $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico, utilizada como transportador e também para definir a linha de base do registo analítico. O constante enchimento da bureta automática com solução $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico era assegurado pela execução de uma etapa de aspiração para a bureta de solução do ácido referido, entre cada determinação. As soluções de amostra (A) ou de reagente (R) quando aspiradas para inserção no sistema nunca contactavam com a bureta automática, através da utilização de um reactor L_1 suficientemente comprido, para suportar volumes variáveis de amostra. Considerando que o reactor tinha de comprimento 2,0 metros, obtém-se como volume interno do reactor o valor aproximado de 1 mL, o que significa que se poderia aspirar até 1 mL de amostra e reagente, no total.

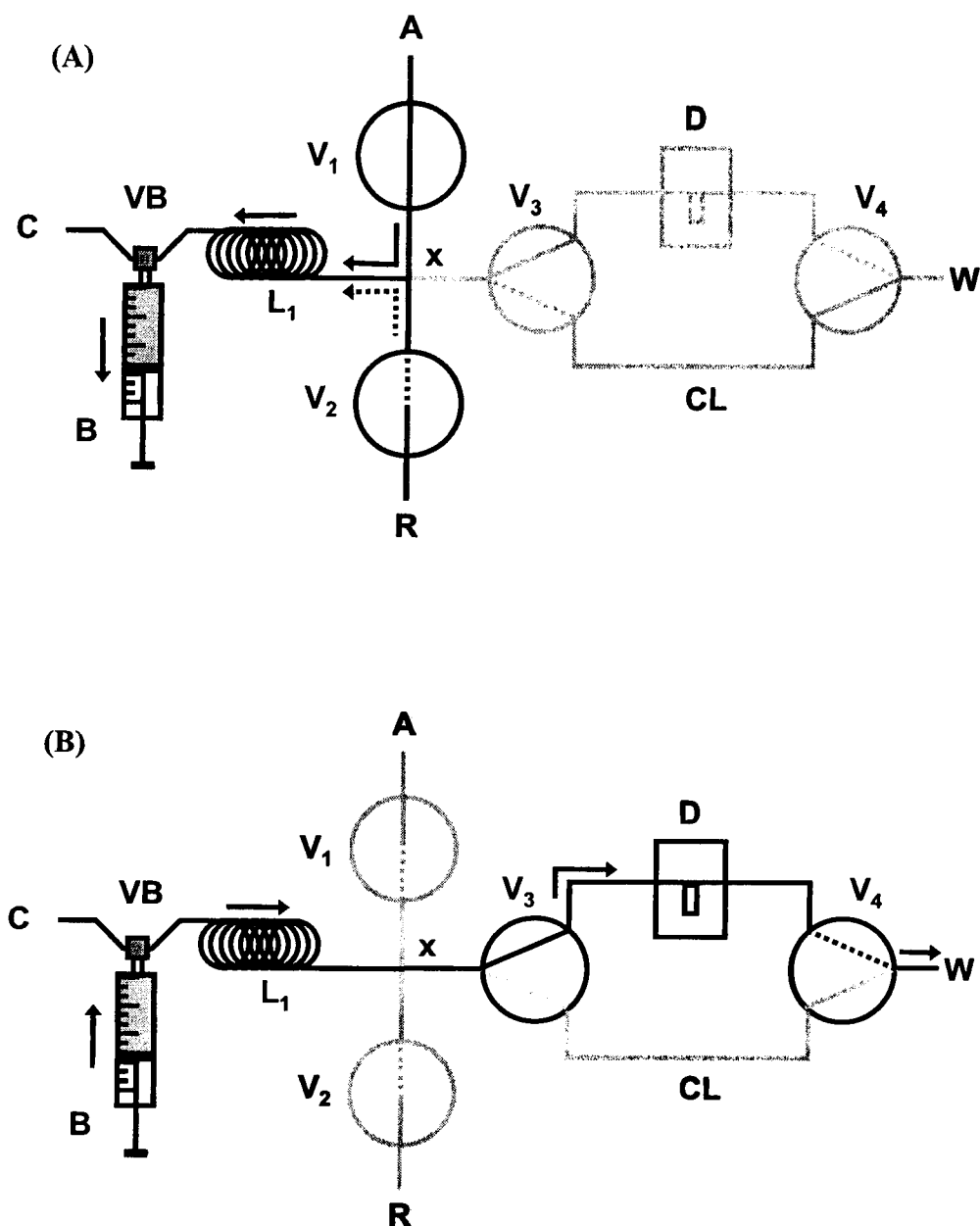


Figura 4.2

Diagrama do sistema de fluxo para a determinação de maleato de trimipramina. (A) – Fase de amostragem; (B) – Fase de transporte para detecção.

V₁ e V₂ – válvulas solenóides de 2 vias; V₃ e V₄ – válvulas solenóides de 3 vias (linhas tracejadas dentro dos símbolos das válvulas correspondem à posição 1 e linhas contínuas à posição 2); C – Solução de transportador (ácido sulfúrico); A – Amostra; R – Reagente (monovanadato de amônio); B – Bureta automática; VB – válvula da bureta automática; L₁ – reator (2,0 metros); X – Ponto de confluência; D – Detector; CL – canal de limpeza; W – Resíduos.

A inserção de amostra e reagente no sistema analítico era definida pelos dados inseridos no programa informático de controlo da montagem. Para além dos dados relativos a outros parâmetros de funcionamento do sistema (por exemplo, caudal), era necessário introduzir os tempos de accionamento das válvulas solenóides de comutação. Eram esses tempos de actuação, das válvulas V_1 e V_2 , que determinavam o volume introduzido de amostra e reagente, consoante o caudal predefinido. A sequência de actuação dessas válvulas determinava a metodologia utilizada para inserção da amostra no sistema de fluxo. Portanto, um ciclo de inserção envolve simultaneamente os tempos e sequência de actuação das válvulas solenóides, e determina a estratégia de introdução de amostra e reagente no sistema.

Estando os canais do sistema de fluxo preenchidos com a solução transportadora, cada ciclo analítico começava com a introdução de solução de amostra. A solução de amostra era inserida por aspiração através de uma sequência alternada de actuação das válvulas V_1 e V_2 , com tempos de actuação predefinidos, para estabelecer a intercalação de muito reduzidas alíquotas de amostra e reagente que desta forma preenchiam parcialmente o reactor L_1 . Deste modo, a solução de amostra não era introduzida como um volume único, mas como uma cadeia de pequenos segmentos de amostra e de reagente. O número e tempos de cada ciclo de inserção definiam o tempo final de amostragem, que dependendo do caudal, determinava o volume total de amostra inserido no sistema analítico. Durante o ciclo de inserção de amostra, as válvulas V_3 e V_4 encontravam-se sempre na posição 1, para garantir que a pressão negativa no interior dos tubos, gerada pela aspiração da bureta automática, influenciava unicamente os tubos para introdução de solução de amostra e solução de reagente (Figura 4.2(A)).

Após a inserção da amostra e reagente, as válvulas V_1 e V_2 eram comutadas para a posição 1, a válvula V_3 era comutada para a posição 2 e o sentido do fluxo era invertido, através da mudança do modo de aspiração da bureta automática para o

modo de impulsão, originando o redireccionamento da zona de reacção localizada dentro do reactor L_1 para o sistema de detecção (Figura 4.2(B)).

As etapas de troca de soluções de amostra, e condicionamento da montagem para a medição seguinte, eram realizadas através do canal CL, pela comutação de V_3 para a posição 1 e da válvula V_4 para a posição 2. Para a preparação do sistema para análise de outra solução de amostra, a nova solução era aspirada para o sistema até alcançar o reactor L_1 , e em seguida, por inversão da direcção do fluxo, o volume de amostra contido no reactor era direccionado pelo canal CL para esgoto, evitando deste modo a passagem pelo sistema de detecção (Figura 4.2(B), D).

Com o objectivo de aumentar o ritmo de amostragem, influenciado pelo tempo necessário para a substituição de soluções e lavagem do sistema, foi realizada uma programação para o funcionamento da bureta, que recorria a diferentes caudais, isto é, o número de passos a realizar pela bureta no espaço de 1 segundo variava consoante a etapa analítica. Durante a etapa de enchimento da seringa e durante a troca de amostra e preparação do sistema, o movimento do pistão era programado para a velocidade máxima (o mais elevado caudal possível, dependente das limitações da bureta) mas durante a aspiração de amostra, transporte da zona de reacção e detecção a velocidade era a determinada pela optimização do sistema, em função da amplitude do sinal.

4.2.4. Método de referência

O método de referência, foi realizado conforme o recomendado na Farmacopeia Europeia [30] e envolvia a dissolução de 0,3500 g de maleato de trimipramina (substância pura) em 50 mL de ácido acético anidro, seguido de titulação

potenciométrica em meio não-aquoso com solução 0,1 M de ácido perclórico, e sendo a detecção do ponto final realizada através do registo da variação da diferença de potencial entre dois eléctrodos, em função da quantidade de solução titulante adicionada.

Para a determinação do fármaco em formulações farmacêuticas sólidas, seguiu-se o mesmo procedimento através da pesagem de uma toma de pulverizado das formulações sólidas, que contivesse aproximadamente a quantidade de 0,3500 g de maleato de trimipramina, sendo feita a estimativa com base na dosagem declarada nas formulações farmacêuticas comerciais.

4.3. Resultados e discussão

Resultados referidos na literatura [37], revelam que o fármaco maleato de trimipramina, dado ser um antidepressivo tricíclico, reage com fortes oxidantes, em meio ácido, dando origem a produtos de cor azul, com máximo de absorvência a 620 nm. Os produtos de oxidação apresentam diferentes estabilidades e velocidades de formação consoante o agente de oxidação utilizado e a natureza e concentração do ácido utilizado.

As experiências preliminares descritas no Capítulo 3, em relação ao fármaco clomipramina, foram reproduzidas para o fármaco maleato de trimipramina e demonstraram que o oxidante monovanadato de amónio era o mais apropriado agente de oxidação porque originava complexos estáveis, com elevada velocidade de reacção, constituindo ainda um reagente de fácil obtenção. Ao mesmo tempo, verificou-se também que a reacção era optimizada em meio ácido, e mais notoriamente com a utilização de ácido sulfúrico, e que com a utilização de ácido nítrico ou ácido clorídrico para acidificar o meio, a resposta analítica obtida era

inferior. Adicionalmente, ainda se concluiu que esse efeito na resposta analítica era dependente da concentração de ácido utilizada.

Para a implementação desta reacção num sistema de fluxo multicomutado, foi idealizado uma montagem analítica envolvendo, inicialmente, dois reactores distintos (Figura 4.3). Um dos reactores (L_1), colocado antes do ponto de confluência X, tinha como principal função a retenção da zona de amostra e reagente aspirados para o sistema, e tinha um comprimento de 2,0 metros, suficiente para prevenir que a zona de reacção alcançasse a seringa da bureta automática. Adicionalmente, e como será demonstrado mais tarde, esse reactor desempenhava adicionalmente uma função essencial, na homogeneização das alíquotas de volumes de amostra com as alíquotas de reagente introduzidas no sistema. O segundo reactor L_2 , colocado exactamente antes do sistema de detecção, entre a válvula solenóide V_3 e o sistema de detecção D, tinha como objectivo potenciar o efeito de mistura amostra/reagente assim como otimizar o desenvolvimento da reacção por intermédio do aumento do tempo de reacção. O comprimento deste último reactor era de 1,0 metros.

Com os componentes do sistema de fluxo assim definidos, realizaram-se ensaios de avaliação da influência que a concentração de ácido sulfúrico exercia no sinal analítico, em relação à amplitude do sinal originado por uma solução 20 mg L^{-1} de trimipramina por oxidação com monovanadato de amónio. Para tal, o caudal foi programado para $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e o tempo total de inserção de amostra foi fixado em 4 segundos, o que correspondia a aproximadamente $100 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de maleato de trimipramina introduzido no sistema. Nas primeiras experiências, a amostra foi introduzida como um volume único entre dois segmentos de igual volume ($100 \text{ }\mu\text{L}$) de solução de reagente (tempo de inserção de 4 segundos cada, para um caudal de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$), originando deste modo duas zonas de interface de reacção. A inversão de fluxo foi utilizada com o objectivo de incrementar a mistura amostra/reagente nas zonas de interface, porque com a aspiração da

amostra e reagente, a zona de reacção originada apresentava a zona da cauda próximo do ponto de inserção no sistema. Com a inversão do fluxo, essas zonas sofrem alterações na disposição, invertendo assim as suas posições. Teoricamente, ocorre após a inversão de fluxo, a penetração das zonas dianteiras da zona de reacção nas zonas de cauda.

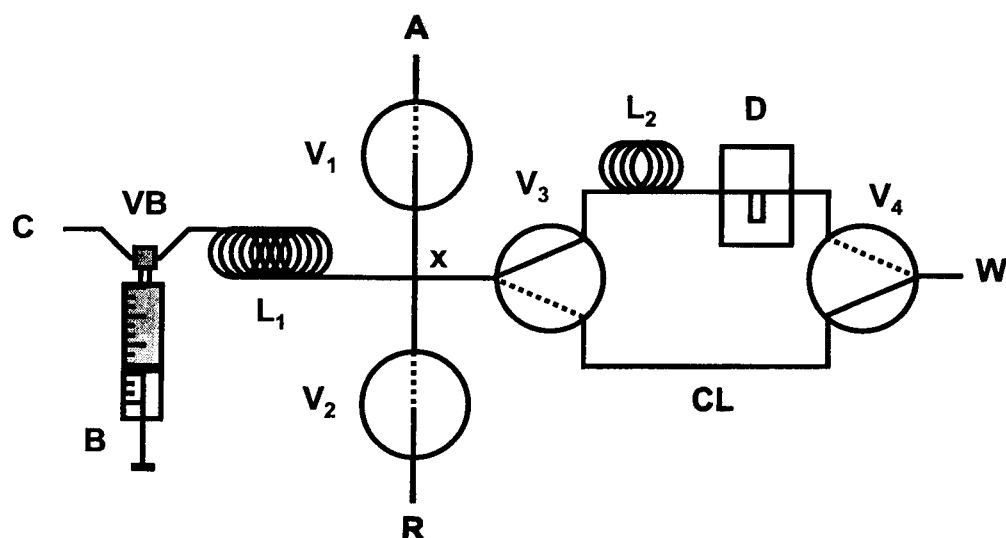


Figura 4.3

Diagrama do sistema de fluxo inicial, para a determinação de maleato de trimipramina.

V₁ e V₂ – válvulas solenóides de 2 vias; V₃ e V₄ – válvulas solenóides de 3 vias (linhas contínuas dentro dos símbolos das válvulas correspondem à posição 1 e linhas tracejadas à posição 2); C: Solução de transportador (ácido sulfúrico); A: Amostra; R – Reagente (monovanadato de amónio); B: Bureta automática; VB – válvula da bureta automática; L₁: reator (2,0 metros); L₂ – Reator (1,0 metros); X: Ponto de confluência; D: Detector; CL – canal de limpeza; W – Resíduos.

As soluções ensaiadas de ácido sulfúrico tinham concentrações compreendidas entre 1,0 e 6,0 mol L⁻¹. As soluções de ácido sulfúrico foram utilizadas não apenas como transportador, mas também para preparar as soluções padrão de trimipramina e a solução com o reagente, que era uma solução 6,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de monovanadato de amônio, prevenindo deste modo a ocorrência de efeitos de Schlieren [38]. Os efeitos de Schlieren manifestam-se quando existem gradientes de índice de refração na zona de reacção, devido a diferenças nos índices de refração entre a solução de amostra, e de reagente e/ou transportador. Essas diferenças afectam a propagação do feixe de radiação incidente, provocando o aparecimento de perturbações no sinal analítico, e podendo assim, comprometer seriamente a precisão, exactidão e limite de detecção da metodologia. Neste trabalho, a diferença de densidade e viscosidade entre a água e ácido sulfúrico afectaria a dispersão da amostra, caso esta fosse solubilizada em água, no reagente e transportador, originando a formação de gradientes de concentração, e portanto, o aparecimento de efeitos decorrentes de diferenças de índices de refração.

Os resultados obtidos para a avaliação da influência no sinal analítico de diferentes concentrações de ácido sulfúrico estão representados na Figura 4.4.

Os valores apresentados na Figura 4.4 demonstram que utilizando concentrações entre 1,0 e 3,0 mol L⁻¹ de soluções de ácido sulfúrico não se registava sinal analítico, isto é, para as condições definidas de configuração do sistema de fluxo e concentrações das soluções envolvidas, não ocorria detecção do maleato de trimipramina. No entanto, entre as concentrações de 3,0 e 5,0 mol L⁻¹ de solução de ácido sulfúrico, a resposta analítica aumentava muito acentuadamente, enquanto que entre 5,0 e 6,0 mol L⁻¹ tendia ligeiramente para estabilização.

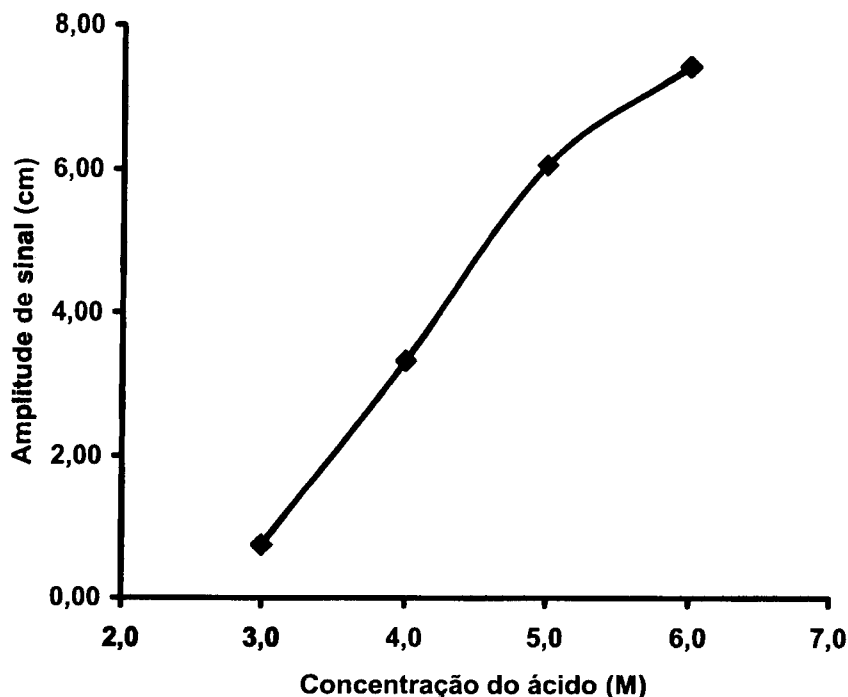


Figura 4.4

Influência no sinal analítico de diferentes concentrações de ácido sulfúrico. [Trimipramina] = 20 mg L⁻¹; Volume de amostra = 100 µL (Tempo de amostragem = 4 segundos); Caudal = 1,5 mL min⁻¹; Reactor L₁ = 2,0 metros; L₂ = 1,0 metros.

Após a análise dos resultados, seleccionou-se para utilização nos ensaios posteriores de uma concentração de 4,0 mol L⁻¹ de solução de ácido sulfúrico para a reacção de determinação de trimipramina pelo sistema de fluxo montado, porque o aumento de resposta analítica verificada entre concentrações de 4,0 e 5,0 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico não era suficientemente significativa para compensar o efeito causado pelo aumento da viscosidade das soluções de ácido sulfúrico, consequência do aumento das concentrações, o que constituía uma dificuldade adicional na mistura dos segmentos de amostra/reagente no interior do sistema de

fluxo. Adicionalmente, como os restantes parâmetros da montagem analítica seriam ainda optimizados, essa diferença de sinal seria atenuada pela optimização da mistura da amostra e reagente antes da detecção.

O estudo da influência do oxidante monovanadato de amónio no sinal analítico para a determinação de trimipramina foi efectuado utilizando a mesma configuração da montagem analítica, num intervalo de concentrações entre $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de solução de monovanadato de amónio, preparada em solução $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico. Através da inserção de uma solução $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ de trimipramina, com um tempo de amostragem de 4 segundos, correspondendo a cerca de $100 \text{ }\mu\text{L}$ de volume de amostra introduzido, e de uma solução de ácido sulfúrico $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ usada como transportador, observa-se que a resposta analítica aumenta acentuadamente com o aumento da concentração da solução de monovanadato de amónio de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, e depois apresenta tendência para estabilizar (Figura 4.5). Deste modo, para os ensaios seguintes utilizou-se uma solução de monovanadato de amónio com concentração $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, de modo a garantir algum excesso de reagente.

Definindo como objectivo a obtenção de uma mistura rápida da zona de amostra com o reagente, que era em alguma extensão dificultada pela elevada viscosidade da solução de ácido sulfúrico com concentração $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ porque limitava a interdispersão entre os segmentos de amostra e os segmentos de reagente, realizou-se um estudo comparativo entre duas estratégias de amostragem, isto é, um estudo comparativo entre a amostragem binária e a inserção de volumes únicos de amostra. Com a amostragem binária em vez de inserir a amostra como um volume único, volume esse posicionado entre segmentos de reagente, o volume de amostra foi dividido em múltiplas fracções, de reduzido volume cada, e eram intercaladas com múltiplas fracções de reagente, de igual volume. Deste modo, esta estratégia criava não duas, mas múltiplas interfaces de reacção que

afectavam positivamente a homogeneização e o desenvolvimento da reacção, em diferentes perspectivas, como será explicado seguidamente, pois essa estratégia estava associada à inversão do sentido de fluxo, também utilizada neste sistema de análise.

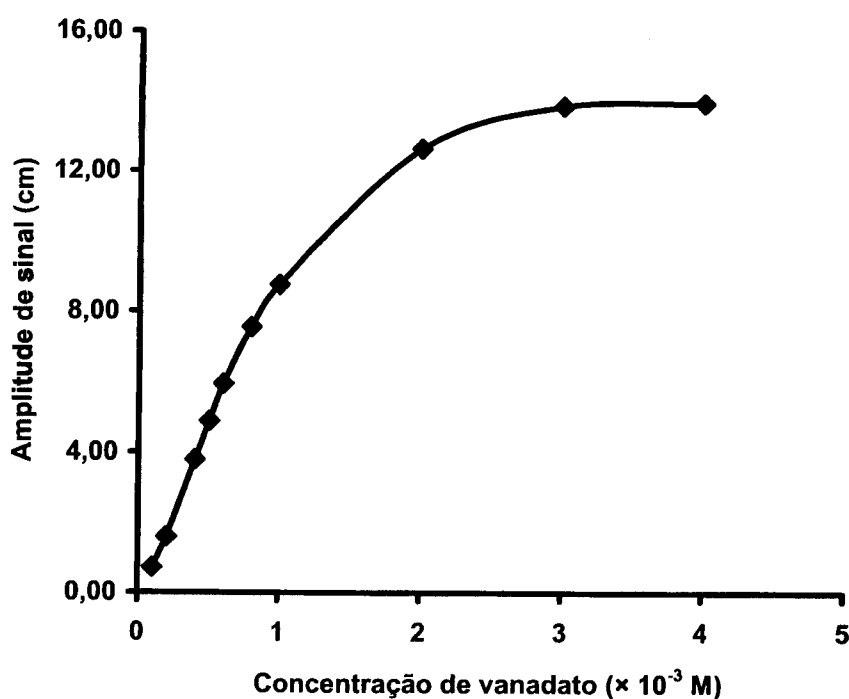


Figura 4.5

Influência no sinal analítico de diferentes concentrações de monovanadato de amónio. Volume de amostra = 100 μ L (Tempo de amostragem = 4 segundos); Caudal = 1,5 mL min^{-1} ; Reactor L_1 = 2,0 metros; L_2 = 1,0 metros.

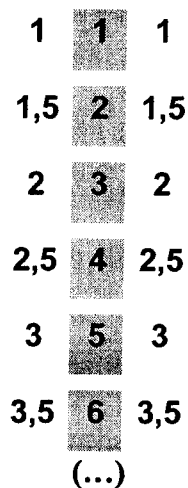
Em primeiro lugar, ao contrário do que sucede em SIA, a reacção teria início imediatamente após a inserção da primeira alíquota de amostra, introduzida por

aspiração para o caminho analítico, e o seu desenvolvimento continuava conforme eram inseridos os restantes volumes de amostra intercalados com reagente, e não apenas quando se finalizava a introdução de um volume único de amostra. Além disso, o aumento da área total de contacto entre as soluções de amostra e reagente melhorava a eficiência da mistura e favorecia a homogeneização entre ambas as soluções. Deste modo, não só toda a zona de amostra participou uniformemente na reacção desde o início, mas também os efeitos de dispersão que seria normalmente necessário para estender a reacção desde as fronteiras amostra/reagente até às secções centrais da zona de amostra foram consideravelmente reduzidos. Por outro lado, e considerando que uma estratégia expedita para aumentar o sinal analítico (altura dos picos) é aumentar o volume de amostra introduzido no sistema, a sensibilidade beneficia grandemente do procedimento desenvolvido. De facto, através da inserção de volumes crescentes de amostra seria problemático garantir um excesso adequado de reagente devido à penetração insuficiente das zonas de reagente [39], que ocorre unicamente nas interfaces de reacção, mesmo considerando que esta situação era em certa escala compensada pela utilização de duas zonas de reagente e pela inversão do sentido do fluxo. Com o procedimento idealizado era possível aumentar o volume de amostra introduzido no sistema e ao mesmo tempo assegurar um excesso adequado de reagente para garantir um considerável desenvolvimento da reacção. Finalmente, durante a inversão do fluxo não ocorria apenas a inversão de duas interfaces de reacção mas sim de múltiplas interfaces, que se interpenetravam e sobrepunham cada uma, numa extensão para garantir elevados e reprodutíveis sinais analíticos, e deste modo, aumentar a sensibilidade, sem implicar a necessidade de efeitos de dispersão adicionais obtidos com o segundo reactor L_2 . Neste estudo, o número e tempos que definiam cada ciclo de inserção determinavam o tempo de amostragem final, e que por sua vez em dependência do caudal, estabelecia o volume de amostra inserido. Dado que estes parâmetros eram

controlados rigorosamente por computador, obtinha-se um controlo completo e efectivo da dispersão da amostra no sistema analítico.

Para o estudo comparativo das estratégias de amostragem, uma solução de trimipramina 10 mg L^{-1} foi injectada no sistema e uma solução $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de monovanadato de amónio foi utilizada como reagente. A solução transportadora foi ácido sulfúrico $4,0 \text{ mol L}^{-1}$. O tempo de amostragem foi programado de modo a obter iguais volumes totais de amostra e reagente para os dois procedimentos de amostragem – amostragem binária e inserção de volumes únicos. Para tal, o incremento de tempo em relação ao reagente na estratégia de inserção de volumes únicos processava-se de 0,5 em 0,5 segundos, enquanto que para a amostragem binária esses tempos sofriam incrementos de 1 segundo. Na Figura 4.6 estão representados em esquema os tempos de inserção de amostra e reagente para cada estratégia de inserção.

Volumes Únicos



Amostragem Binária

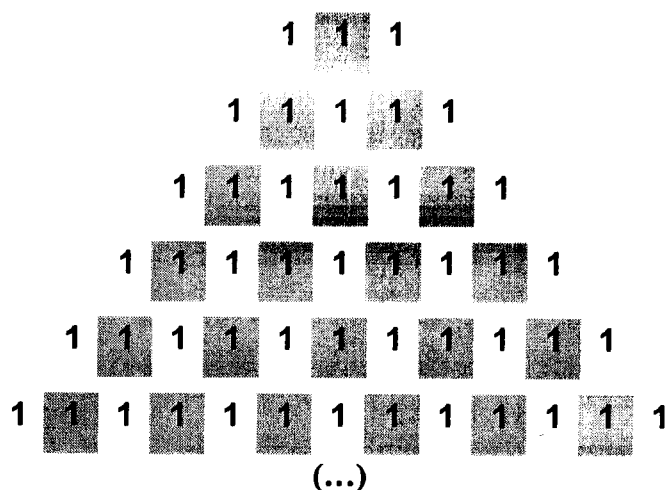


Figura 4.6

Representação do esquema de inserção de amostra e reagente por volumes únicos e amostragem binária. Os números correspondem ao tempo de inserção em segundos, e os quadrados sombreados à inserção da solução de amostra.

Cada linha representa os tempos de inserção de amostra e reagente, e também o esquema de inserção no sistema, entre as duas estratégias. Assim, cada linha simboliza os tempos totais de amostra e reagente inseridos.

Curiosamente, e em oposição à análise teórica descrita anteriormente, os primeiros resultados demonstraram que a resposta analítica obtida com amostragem binária era inferior à obtida recorrendo à estratégia de inserção de volumes únicos, embora a diferença não fosse significativa (Figura 4.7).

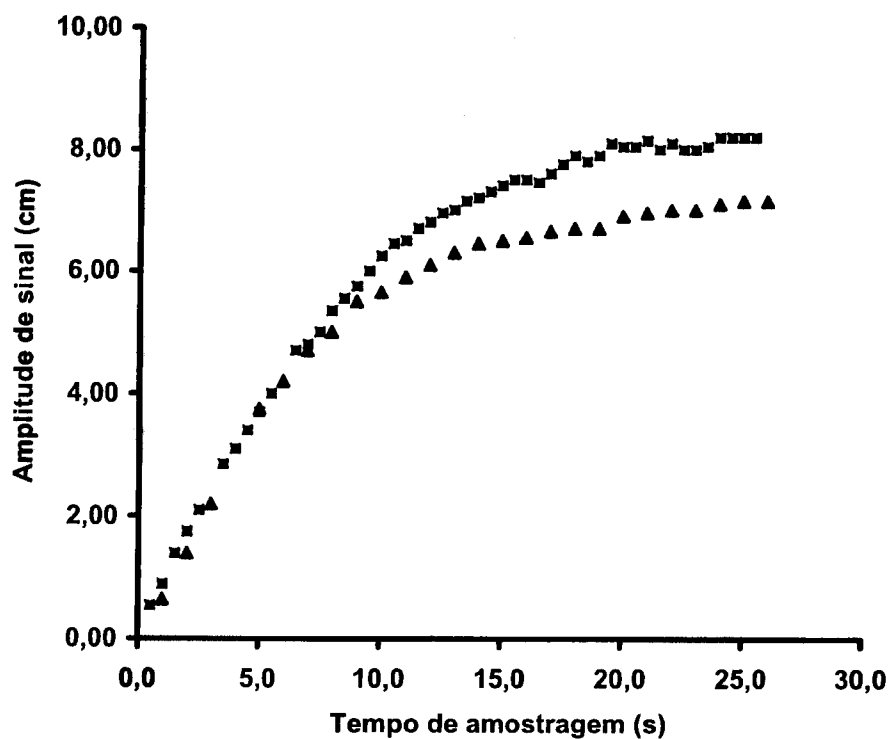


Figura 4.7

Influência no sinal analítico de diferentes estratégias de inserção da amostra no sistema analítico.

Caudal = $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; Reactor $L_1 = 2,0$ metros; $L_2 = 1,0$ metros; ■ – Volumes Únicos; ▲ – Amostragem Binária.

Estes resultados, podiam ter justificação quer na utilização do segundo reaktor (L_2), que originava um tempo de residência excessivo em que os efeitos de dispersão prevaleciam, quer na possibilidade de estar disponível quantidades insuficientes de reagente (baixas concentrações) que conduziam a efeitos de diluição pela solução transportadora. Deste modo, realizou-se um ensaio formalmente semelhante ao anterior, mas utilizando uma solução de reagente monovanadato de amónio com concentração aproximadamente 10 vezes superior ($1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). Para este ensaio apenas se comparou o efeito das diferentes concentrações de reagente em relação à estratégia de inserção de volumes únicos de amostra. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.8.

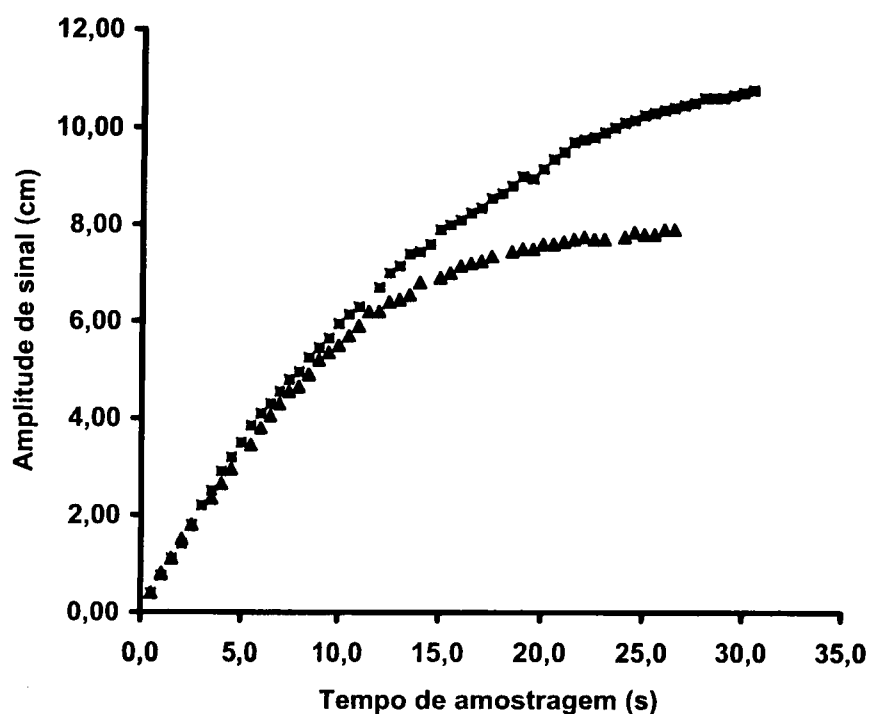


Figura 4.8

Influência no sinal analítico de diferentes concentrações de monovanadato de amónio, introduzindo volumes únicos de amostra como estratégia de inserção. Caudal = $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; Reactor $L_1 = 2,0$ metros; $L_2 = 1,0$ metros; ■ – [vanadato de amónio] = $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; ▲ – [vanadato de amónio] = $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Considerando uma diferença de aproximadamente 10 vezes entre as concentrações de reagente, e observando que a diferença no sinal analítico não é significativa relativamente à diferença de concentrações, então conclui-se que os resultados representados na Figura 4.7 não se devem ao facto do reagente ser um factor limitante no desenvolvimento da reacção, e portanto, na resposta analítica.

Por consequência, a configuração da montagem foi alterada, e o segundo reactor (L_2) colocado imediatamente antes do sistema de detecção foi removido, restando apenas na montagem analítica o reactor L_1 (Figura 4.2). Com esta modificação a homogeneização entre a amostra e reagente ocorria unicamente no reactor L_1 , durante a etapa de inserção de amostra, e era otimizada com a inversão do sentido do fluxo. Estabelecendo como objectivo a diminuição do comprimento total da zona de amostra/reagente inserida no sistema (e portanto, o volume total da zona de reacção) a sequência de intercalação na amostragem binária foi modificada através da reprogramação do ciclo de inserção, isto é, realizou-se uma redução do tempo de inserção do reagente durante a amostragem binária: em vez da sequência binária 1 segundo de amostra/1 segundo de reagente, utilizou-se uma sequência de 1 segundo de amostra/0,25 segundos de reagente. Simultaneamente, a concentração da solução de monovanadato de amónio foi aumentada para $8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, para compensar a diminuição do volume de reagente introduzido. Nestas circunstâncias, a estratégia de amostragem binária originou sinais analíticos superiores aos obtidos com a estratégia de volumes únicos de amostra (Figura 4.9), confirmando que a eficiência da mistura amostra/reagente conferida pela combinação de amostragem binária e inversão de fluxo, e o tempo de residência dentro de L_1 , eram suficientes para promover o desenvolvimento da reacção.

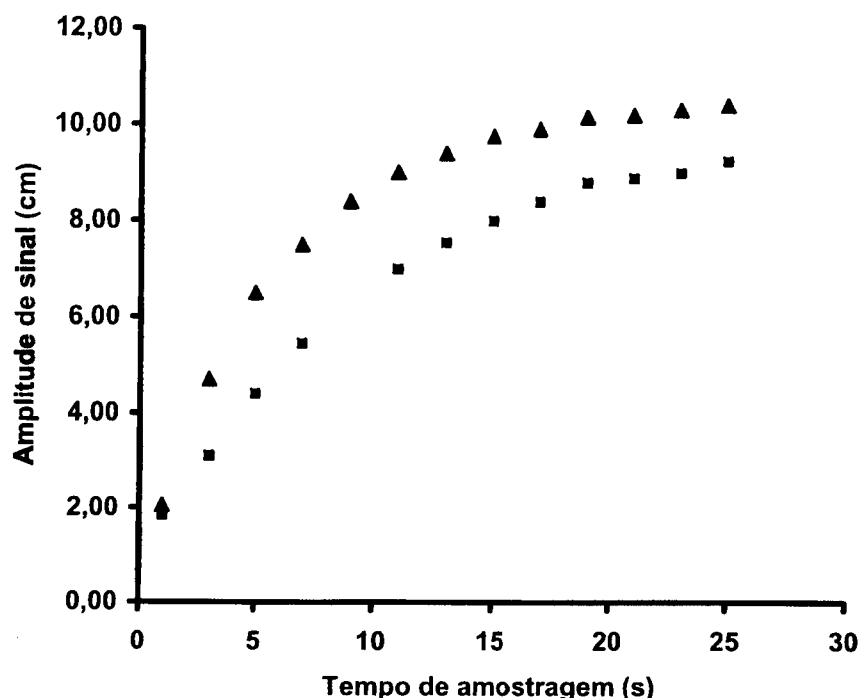


Figura 4.9

Influência no sinal analítico de diferentes estratégias de inserção da amostra no sistema analítico.

Caudal = 1,5 mL min⁻¹; Reactor L₁ = 2,0 metros; ■ – Volumes Únicos; ▲ – Amostragem Binária.

Ainda para mais, o ritmo de amostragem aumentou conseqüentemente, devido à redução dos tempos de amostragem (diminuição do tempo de inserção do reagente) e encurtamento do caminho analítico no sistema de fluxo, e o consumo de reagente diminuiu. Mais concretamente, e como exemplo, para um tempo de inserção de amostra de 11 segundos, o sinal analítico medido utilizando a montagem com o reactor L₂ e utilizando monovanadato de amónio com concentração 3,0 × 10⁻³ mol L⁻¹, foi de 5,9 cm, a um ritmo de amostragem de 34 amostras/hora. Realizando a mesma determinação, mas na montagem analítica sem o reactor L₂, e utilizando monovanadato de amónio com concentração de 8,9

$\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, o mesmo tempo de inserção de amostra originou um sinal analítico correspondente a 9 cm, e com um ritmo de amostragem de 48 amostras/hora.

Em seguida, avaliou-se a influência no sinal analítico de vários tempos de segmento de amostra, mantendo o tempo de segmento de reagente em 0,25 segundos, através da amostragem binária. Deste modo, procedeu-se à optimização do volume de segmento de amostra introduzido no sistema. A concentração da solução de trimipramina ensaiada foi 20 mg L^{-1} , e o número de ciclos de amostragem binária foi 9. A alteração dos tempos de inserção de segmento de amostra efectuou-se com diferenças de tempo de 0,25 segundos. Os resultados estão representados graficamente na Figura 4.10.

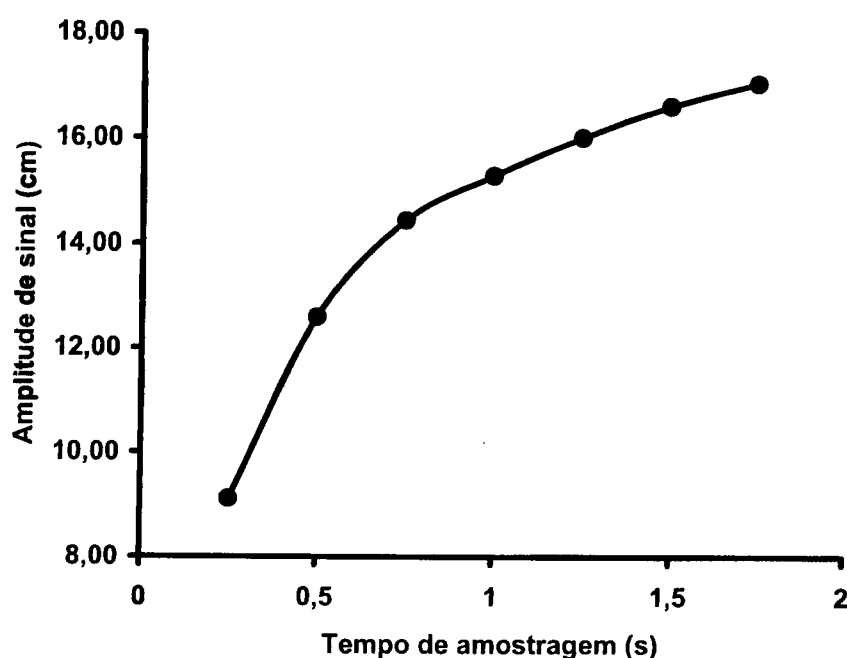


Figura 4.10

Influência na resposta analítica de vários tempos de inserção de amostra em combinação com a inserção de 0,25 s de reagente, em amostragem binária.

Verificou-se um aumento acentuado da amplitude de sinal na resposta analítica desde 0,25 segundos até 0,75 segundos de inserção de segmento de amostra, sendo que para valores superiores o aumento da resposta analítica aumentava ligeiramente. Deste modo, seleccionou-se 1 segundo como tempo de segmento de amostra, para inserção através da amostragem binária. Adicionalmente, a reprodutibilidade alcançada com um tempo de intercalação de 1 segundo era superior à obtida com tempos inferiores, devido provavelmente às características lógicas do programa de controlo. A menor reprodutibilidade na execução dos tempos pelo computador podia dever-se a dificuldades de processamento na contagem de tempo realizada pelo microprocessador, sendo que uma possível solução implicaria alterações a nível do programa de controlo desenvolvido, de modo a realizar ciclos de contagem com base nos ciclos de relógio executados pelo microprocessador.

Com a configuração da montagem de fluxo assim definida, foi reavaliada a influência no sinal analítico de diferentes concentrações de solução de ácido sulfúrico (4,0 e 5,0 mol L⁻¹). Paralelamente, e para cada concentração de ácido utilizou-se duas diferentes estratégias de inserção de amostra, recorrendo à amostragem binária e à inserção de volumes contínuos de amostra. Para realizar o ensaio recorrendo à estratégia de amostragem binária, aumentava-se gradualmente o número de ciclos de intercalação de 1 segundo de solução 20 mg L⁻¹ de trimipramina seguido de 0,25 segundos de solução $8,9 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de monovanadato de amónio. Para o correspondente ensaio, mas recorrendo à estratégia de inserção de volumes contínuos, o volume de amostra inserido correspondia ao volume originado pelo somatório dos volumes de inserção de segmentos de amostra na amostragem binária, definidos pelos tempos de inserção para um caudal de 1,5 mL min⁻¹ utilizado no ensaio. Deste modo, e para fins comparativos entre os vários ensaios, manteve-se equiparável o volume de amostra inserido no sistema. Os resultados estão representados na Figura 4.11.

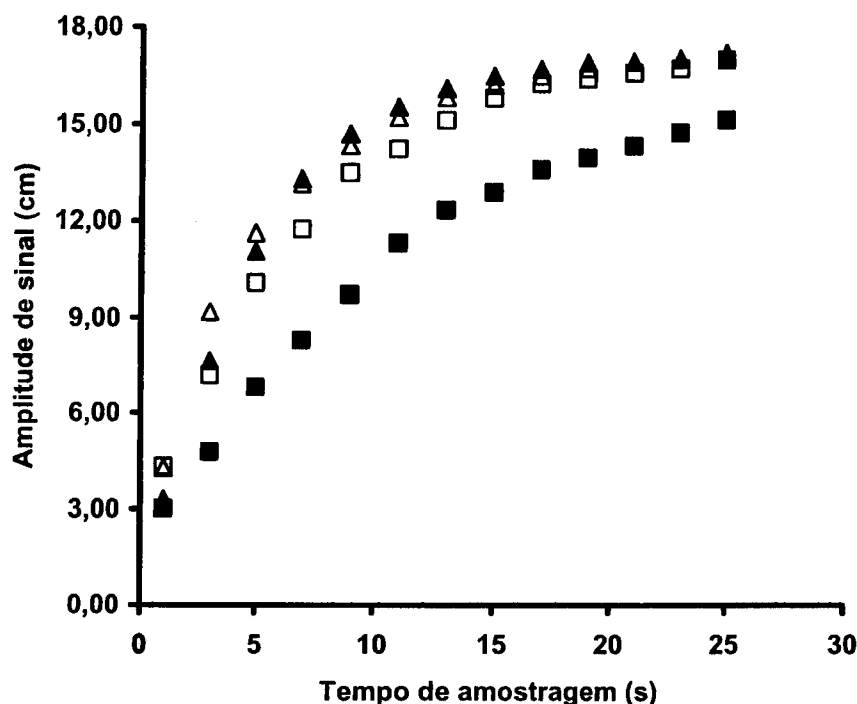


Figura 4.11

Influência na resposta analítica de diferentes concentrações de ácido sulfúrico, e com diferentes estratégias de amostragem. ■ – Volumes únicos e $[H_2SO_4] = 4 \text{ mol L}^{-1}$; □ – Volumes únicos e $[H_2SO_4] = 5 \text{ mol L}^{-1}$; ▲ – Amostragem binária e $[H_2SO_4] = 4 \text{ mol L}^{-1}$; △ – Amostragem binária e $[H_2SO_4] = 5 \text{ mol L}^{-1}$.

Observou-se que os resultados obtidos com a estratégia de amostragem binária eram apreciavelmente melhores dos obtidos com a inserção de volumes únicos de amostra. A maior resposta analítica foi obtida utilizando uma solução de ácido sulfúrico $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ e com a estratégia de inserção de amostra por amostragem binária, embora a diferença de sinal para a concentração $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico não seja significativa. Estes resultados são justificados pelos diferentes graus de mistura obtidos com a utilização de diferentes concentrações de soluções de ácido sulfúrico, devido aos diferentes valores de viscosidade das soluções de

ácido. Utilizando volumes únicos de amostra (e estabelecendo idênticos tempos de amostragem globais) verificou-se um comportamento semelhante, excepto que o sinal analítico mais elevado foi obtido com a utilização de uma solução 5,0 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico.

Estes resultados podem ser explicados, como foi anteriormente referido, pela eficiência da homogeneização da zona de amostra providenciada pela estratégia de amostragem binária em associação à inversão do sentido de fluxo. Em confirmação a esta hipótese, verificou-se que para o mesmo tempo de amostragem e para uma solução 4,0 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico o sinal analítico obtido com amostragem binária era acentuadamente superior ao obtido com volumes únicos de amostra (Figura 4.11). Além de que, registou-se uma superior reprodutibilidade, muito provavelmente devido à menor dificuldade na mistura amostra e reagente com a utilização de uma solução 4,0 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico.

A influência do caudal no sinal analítico foi estudada em combinação com o volume total inserido de amostra, através da utilização de diferentes tempos de inserção de amostra e de reagente, que determinavam o volume de solução introduzido no sistema, dependendo do caudal. Essa variação nos volumes introduzidos foi realizada por modificação do número de repetição de ciclos da sequência de amostragem binária (Figura 4.12). Uma grande limitação existente neste ensaio era as características operacionais da bureta automática que limitavam o caudal máximo disponível. Considerando a bureta automática equipada com uma seringa de volume 5,0 mL e movida com um motor de passo com um total de 2500 passos (2 µL por cada passo), um caudal de 1,5 mL min⁻¹ iria corresponder, aproximadamente, a 750 passos por minuto ou à execução de um passo por cada 0,08 segundos, o que se aproximava da frequência operacional máxima da bureta automática, podendo assim afectar a estabilidade do fluxo. Tal

facto foi verificado, e observou-se que para tempos inferiores a bureta não efectuava alguns passos, fenómeno que ocorria de um modo aleatório.

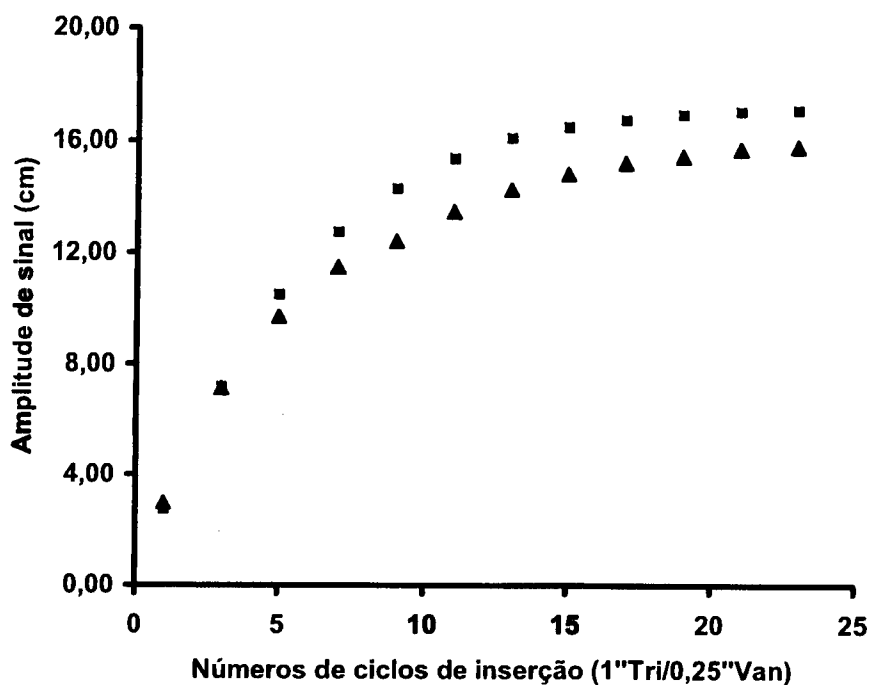


Figura 4.12

Influência na resposta analítica de diferentes caudais e diferentes volumes de amostra introduzidos.

▲ – caudal = 1,0 mL min⁻¹; ■ – caudal = 1,5 mL min⁻¹.

Com o objectivo de estabelecer um compromisso entre o ritmo de amostragem e a sensibilidade, o que como resultado de uma rápida homogeneização da zona de amostra podia ser aumentado através da limitação da dispersão de amostra, para as experiências seguintes seleccionou-se uma sequência de intercalação consistindo

em 11 ciclos de 1 segundo de amostra/0,25 segundos de monovanadato de amónio, e um caudal de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Resumindo, os tempos totais de inserção eram de 11 segundos para a solução de trimipramina e 3 segundos para a solução de monovanadato de amónio (cada ciclo de inserção começava e terminava com um segmento de volume de monovanadato de amónio).

Uma importante vantagem inerente à metodologia desenvolvida é que os produtos da reacção são transportados em direcção ao sistema de detecção sobre uma pressão positiva, enquanto que geralmente em multicomutação [40] o sistema de propulsão é colocado após o detector sendo a zona de reacção transportada por aspiração. A utilização de pressões positivas reduz a ocorrência de bolhas de ar, como sucede com pressões negativas, o que pode comprometer seriamente a detecção.

4.3.1. Análise de formulações farmacêuticas

Para avaliar a metodologia desenvolvida na determinação da trimipramina em formulações farmacêuticas, foi investigada a influência de alguns compostos utilizados normalmente como excipientes. Um composto foi considerado como não-interferente se a variação de sinal analítico era $\pm 3\%$ quando comparado com o sinal analítico obtido com a ausência do composto referido. Os resultados demonstraram que os excipientes glucose, sucrose, galactose, lactose, benzoato de sódio e estearato de magnésio não interferiram até concentrações correspondentes a 100 vezes a razão molar em relação à trimipramina.

Após a optimização do sistema, utilizando um caudal de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e 11 ciclos de 1 segundo amostra/0,25 segundos de solução $8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de

monovanadato de amônio, foram obtidos intervalos de concentrações de resposta linear para concentrações de trimipramina entre 1,0 e 18,0 mg L⁻¹ (Figura 4.13). A curva analítica era representada por $A = 0,7888C + 0,6976$, com um coeficiente de correlação (R) correspondente a 0,998. Na equação da resposta linear A era a altura de sinal analítico expressa em cm e C era a concentração de trimipramina expressa em mg L⁻¹.

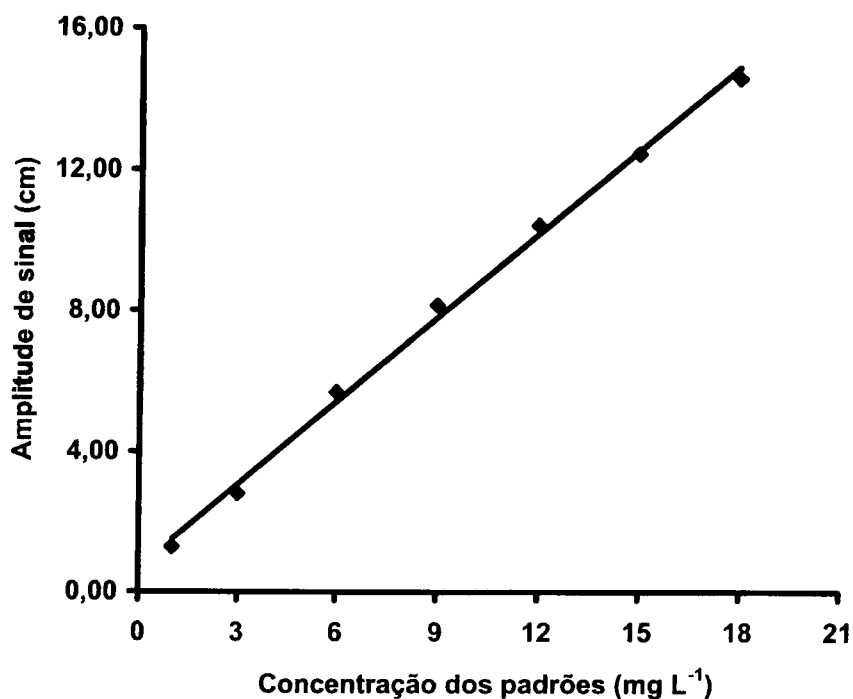


Figura 4.13

Curvas de calibração obtida com soluções padrão de trimipramina com concentrações de 1 até 18 mg L⁻¹.

A metodologia analítica desenvolvida foi aplicada à determinação de trimipramina em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos foram utilizados para avaliar o sistema através da sua comparação com os resultados da determinação da trimipramina pelo método de referência. Foram obtidos desvios relativos (em percentagem) entre -0,26 e 2,37. O desvio padrão relativo foi inferior a 1,69% (n=10). A Tabela 4.1 resume os resultados obtidos.

O ritmo de amostragem foi de aproximadamente 48 amostras por hora.

O sistema analítico demonstrou um funcionamento estável, sem desvios na linha de base ao longo do tempo.

Tabela 4.1

Resultados obtidos para a determinação de clomipramina em preparações farmacêuticas.

Amostra	Concentração declarada (mg/formulação)	Lote analisado	Concentração encontrada (mg/formulação)		D.R. ^a (%)
			Metodologia desenvolvida ^b	Método de Referência	
Surmontil 25 (comprimidos)	25	A	24,55 ± 0,17	24,61	-0,26
		B	24,65 ± 0,21	24,56	0,35
		C	25,19 ± 0,27	25,15	0,14
Surmontil 100 (comprimidos)	100	A	99,52 ± 1,68	98,27	1,27
		B	101,92 ± 1,04	99,56	2,37

^a Desvio relativo para a metodologia desenvolvida em relação ao procedimento de referência.

^b Média±desvio padrão

4.4. Conclusões

Os resultados obtidos demonstraram que a reacção da trimipramina com monovanadato de amónio constitui um procedimento alternativo para a determinação da trimipramina em formulações farmacêuticas, e que adicionalmente não implica aquecimento ou longos tempos para desenvolvimento de reacção, e não é susceptível de interferências provocadas por substâncias excipientes normalmente usadas nas formulações farmacêuticas. Quando implementado num sistema de fluxo baseado no conceito de multicomutação resulta numa metodologia simples, de baixo custo, rápida, sensível e exacta, que pode ser vantajosamente aplicada a análises de rotina.

Em SIA, por comutação da válvula multiposição e por inversão do sentido de escoamento cria-se uma zona composta de sobreposição das zonas de amostra e reagente para a qual também contribuem os processos de dispersão radial e axial. Quando esta zona de sobreposição é encaminhada para o detector, é obtido um sinal transiente, de magnitude proporcional à concentração da espécie monitorizada, numa zona de concentrações.

O novo procedimento de homogeneização explorado neste trabalho, consistindo na combinação da estratégia de amostragem binária com inversão de fluxo, exibiu uma eficiência de mistura muito elevada o que permitiu reduzir marcadamente a dispersão da amostra durante o transporte para o sistema de detecção, enquanto se assegurava um desenvolvimento conveniente da reacção.

As vantajosas características operacionais da multicomutação, nomeadamente o elevado grau de automação e a versatilidade que proporciona, asseguram um controlo efectivo dos parâmetros analíticos, e deste modo, da reacção química e possibilita uma vasta gama de manipulações da zona de amostra sem requerer qualquer reconfiguração física da montagem de fluxo.

Consequentemente, a metodologia desenvolvida pode ser estendida a outras reacções químicas ou para a determinação de outras espécies através de nenhuma ou poucas modificações na estrutura modular característica do sistema de fluxo por multicomutação. Mais concretamente, para efectuar a inserção de mais um reagente é unicamente necessário a adição ao sistema de mais uma válvula solenóide. Evidencia-se, deste modo, a elevada versatilidade dos sistemas de fluxo por multicomutação, no sentido de facilmente possibilitar diversos percursos analíticos, devido à presença de pontos de comutação numa montagem analítica. Existindo a possibilidade de alterar o número desses pontos de comutação através da adição de válvulas solenóides, então um sistema de fluxo por multicomutação possibilita facilmente o acrescento de canais de inserção de soluções, que deste modo, permitem executar determinações químicas que envolvem mais reagentes.

4.5. Referências bibliográficas

- 1 Goodman & Gilman's, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 10th Ed. (2001)
- 2 C. B. Eap, L. Koeb, E. Holsboertrachsler, P. Baumann, Ther. Drug Monit., 14, 380 (1992)
- 3 J. E. Kountourallis, C. K. Markopoulou, J. A. Stratis, Anal. Lett., 26, 2171 (1993)
- 4 S. Hartter, B. Hermes, C. Hiemke, J. Liq. Chromatogr. 18, 3495 (1995)
- 5 E. Ameyibor, J. T. Stewart, J. Liq. Chromatogr. R. T., 20, 3107 (1997)
- 6 C. Frahnert, M. L. Rao, K. Grasmader, J. Chromatogr., B 794, 35 (2003)
- 7 A. A. Gulaid, G. A. Jahn, C. Maslen, M. J. Dennis, J. Chromatogr. – Biomed., 566, 228 (1991)
- 8 S. Bouquet, S. Guyon, G. Chapelle, M. C. Perault, D. Barthes, J. Liq. Chromatogr., 15, 1993 (1992)
- 9 H. W. Zhang, K. Heinig, J. Henion, J. Mass Spectrom., 35, 423 (2000)
- 10 S. McClean, E. J. O'Kane, W. F. Smith, J. Chromatogr., B 740, 141 (2000)
- 11 U. Gutteck, K. M. Rentsch, Clin. Chem. Lab. Med., 41, 1571 (2003)
- 12 R. F. Suckow, T. B. Cooper, J. Pharm. Sci., 73, 1745 (1984)
- 13 N. Jourdil, B. Pinteaur, F. Vincent, C. Marka, G. Bessard, J. Chromatogr. – Biomed., 613, 59 (1993)
- 14 A. A. Syed, M. F. Silwadi, S. R. Kirumakki, N. Narasimiah, Acta Chromatogr., 12, 80 (2002)
- 15 A. M. Bougerolle, J. L. Chabard, M. Jbilou, H. Bargnoux, J. Petit, J. A. Berger, G. Dordain, J. Chromatogr. – Biomed., 434, 232 (1988)
- 16 C. B. Eap, L. Koeb, P. Baumann, J. Chromatogr., B 652, 97 (1994)

- 17 S. Ulrich, T. Isensee, U. Pester, *J. Chromatogr.*, B 685, 81 (1996)
 - 18 M. A. Martinez, C. S. de la Torre, E. Almarza, *J. Anal. Toxicol.*, 27, 353 (2003)
 - 19 K. J. Lee, J. J. Lee, D. C. Moon, *J. Chromatogr. – Biomed.*, 616, 135 (1993)
 - 20 H. S. Kou, C. C. Chen, Y. H. Huang, W. K. Ko, H. L. Hu, S. M. Wu, *Anal. Chim. Acta*, 525, 23 (2004)
 - 21 M. C. Ortiz, J. Arcos, J. V. Juarros, J. Lopezpalacios, L. A. Sarabia, *Anal. Chem.*, 65, 678 (1993)
 - 22 M. Khodari, *Electroanal.*, 5, 521 (1993)
 - 23 A. Ferancova, E. Korgova, R. Miko, J. Labuda, *J. Electroanal. Chem.*, 492, 74 (2000)
 - 24 G. M. Greenway, S. J. L. Dolman, *Analyst*, 124, 759 (1999)
 - 25 H. R. McKim, D. G. Calverley, G. B. Baker, W. G. Dewhurst, *Can. J. Pharm. Sci.*, 13, 102 (1978)
 - 26 K. Nikolic, L. Arsenijevic, M. Medenica, *Acta. Pharm. Jugosl.*, 36, 349 (1986)
 - 27 B. Starczewska, H. Puzanowska-Tarasiewicz, *Anal. Lett.*, 31, 809 (1998)
 - 28 P. Nagaraja, M. F. Silwadi, A. A. Syed, *Anal. Lett.*, 33, 2913 (2000)
 - 29 P. Nagaraja, M. F. Silwadi, A. A. Syed, *Mikrochim. Acta*, 135, 185 (2000)
 - 30 *European Pharmacopoeia*, Council of Europe, Strasbourg, Fourth Ed., 2078 (2002)
 - 31 J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, Second Ed., Wiley, New York (1988)
 - 32 J. Ruzicka, G. D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, 237, 329 (1990)
 - 33 B. F. Reis, M. F. Gine, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. S. Lapa, *Anal. Chim. Acta*, 20, 129 (1994)
 - 34 D. Betteridge, P. B. Oates, A. P. Wade, *Anal. Chem.*, 59, 1236 (1987)
-

- 35 S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, A. A. S. C. Machado, J. L. F. C. Lima, J. M. Paulís, *Quim. Anal.*, 6, 278 (1987)
- 36 R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, *Anal. Chim. Acta*, 377, 103 (1998)
- 37 Wieslawa Misiuk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22, 189 (2000)
- 38 D. Betteridge, E. L. Dagless, B. Fields, N. F. Graves, *Analyst*, 103, 897 (1978)
- 39 G. D. Marshall, J. F. van Staden, *Process Contr. Qual.*, 3, 251 (1992)
- 40 R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, J. L. M. Santos, *Anal. Chim. Acta*, 419, 17 (2000)

CAPÍTULO

5

DETERMINAÇÃO DE ISONIAZIDA

POR UM SISTEMA EM FLUXO

CONTÍNUO

A isoniazida é considerada um fármaco de primeira escolha no tratamento da tuberculose. Neste capítulo é descrito o desenvolvimento de um sistema de fluxo, baseado na utilização de buretas automáticas que actuam simultaneamente como unidades de inserção de amostra, introdução de reagente e propulsão de soluções. O sistema de fluxo desenvolvido foi avaliado através da utilização de diferentes estratégias de inserção como a amostragem binária, a confluência de zonas e a inserção de volumes únicos, na determinação espectrofotométrica de isoniazida em formulações farmacêuticas após reacção com 1,2-naftoquinona-4-sulfonato, em meio alcalino. A combinação de amostragem binária com a inserção de segmentos de soluções com 1 microlitro resultou num favorecimento da mistura amostra e reagente, mesmo em condições de dispersão limitada. Adicionalmente, as buretas automáticas são facilmente controladas por computador, o que simplifica o funcionamento do sistema, até porque as buretas foram os únicos dispositivos activos na montagem.

5.1. Introdução

A isoniazida, hidrazida do ácido nicotínico ou hidrazida do ácido 4-piridinacarboxílico (Figura 5.1), é uma substância cristalina branca ou incolor, solúvel em água ou em etanol (14 g e 2 g em 100 mL a 25 °C, respectivamente), e pouco solúvel em clorofórmio e éter [1].

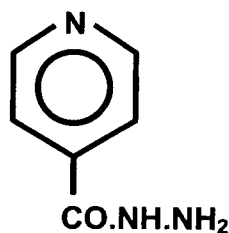


Figura 5.1

Estrutura química da isoniazida.

Em 1912, Meyer e Mally [2] sintetizaram pela primeira vez esta substância, através do aquecimento de uma mistura de ácido nicotínico e hidrazida a 300 °C. A sua acção antibacteriana sobre estirpes de *Mycobacterium* foi pela primeira vez confirmada em 1945 por Chorine e Huant.

Uma solução 1% de isoniazida origina um valor de pH entre 5,5 e 6,5. A um pH próximo de 3 e em condições anaeróbias é hidrolisada, sendo convertida em ácido isonicotínico. Por outro lado, em condições aeróbias, a sua hidrólise alcalina

origina principalmente ácido isonicotínico, isonicotinamida e hidrazida de 1,2-diisonicotinoil.

A isoniazida é considerada uma primeira droga de escolha no tratamento da tuberculose. É um fármaco altamente activo contra microorganismos do género *Mycobacterium*, especialmente *M. tuberculosis*. O seu derivado isopropilo, iproniazida (1-isonicotinil-2-isopropilhidrazida), também inibe a multiplicação dos bacilos *Mycobacterium*. No entanto, este composto que é também um potente inibidor da monoamina oxidase, é muito tóxico para poder ser administrado em seres humanos. Contudo, o seu estudo levou ao uso de inibidores da monoamina oxidase para o tratamento de depressões.

A isoniazida é bacteriostática para bacilos em estado latente, mas é bactericida para microorganismos em estado de multiplicação. A sua concentração tuberculostática mínima é 0,025 a 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [3]. A droga é marcadamente selectiva para micobactérias, pois são necessárias concentrações em excesso, da ordem de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para inibir o crescimento de outros microorganismos.

Em 1975, Takayama e colaboradores sugeriram que uma acção principal da isoniazida é a inibição da biosíntese de ácidos micólicos, que são constituintes muito importantes da parede celular das micobactérias. E porque os ácidos micólicos são constituintes únicos das micobactérias, esta acção explica o elevado grau de selectividade da actividade antimicrobiana da isoniazida. Verificou-se que a exposição a isoniazida leva à perda rápida de ácidos gordos, verificável experimentalmente por uma diminuição da quantidade lipídica extraível com metanol dos microorganismos. Quando usada isoladamente no tratamento da tuberculose verifica-se o rápido aparecimento de estirpes resistentes, fenómeno que é limitado ou mesmo evitado através de uma terapia combinada com outros agentes antibacterianos. O mecanismo mais comum da resistência à isoniazida é a ocorrência de mutações na enzima catalase-peroxidase, diminuindo a sua actividade enzimática, e impedindo a conversão da pró-droga isoniazida no seu

metabolito activo. Outro mecanismo de resistência está relacionado com uma mutação no gene responsável pela biossíntese de ácidos micólicos [3, 4].

A isoniazida é prontamente absorvida, podendo ser administrada por via oral ou parentérica, atingindo um valor máximo de concentração no sangue entre uma a duas horas após a sua administração. A sua ligação às proteínas plasmáticas é pequena (menor que 10%), e difunde-se facilmente através dos fluidos biológicos (incluindo o líquido cefalorraquidiano), tecidos e órgãos. Cerca de 75% a 95% da dose de isoniazida administrada, é excretada na urina dentro de 24 horas, principalmente como metabolitos. Os principais produtos de excreção nos seres humanos resultam de acetilação enzimática (acetilisoniazida) e hidrólise enzimática (ácido isonicotínico). Outras vias metabólicas como conjugação com a glicina, formação de hidrazona e N-metilação, originam reduzidas quantidades de metabolitos, mas também detectados na urina. De todos os metabolitos formados, a acetilhidrazina formada no fígado por N-acetilação, apresenta elevada toxicidade hepática. A taxa de acetilação altera significativamente as concentrações da droga no plasma e o seu tempo de semi-vida na circulação. O tempo de semi-vida do fármaco pode ser prolongado em casos de insuficiência hepática. É aconselhável uma redução da dose administrada de isoniazida nos doentes que são acetiladores lentos e que sofrem de insuficiência renal. A excreção de isoniazida é dependente em pequena percentagem do estado da função renal, mas os pacientes que são inactivadores lentos da droga podem acumular concentrações tóxicas caso sofram de insuficiência renal.

A isoniazida é usada em associação com outros fármacos, como a rifampicina e a pirazinamida, no tratamento da tuberculose pulmonar e extrapulmonar, e isoladamente, na profilaxia da tuberculose em grupos de elevado risco. A dose diária total de isoniazida administrada normalmente é 5 mg kg^{-1} , num máximo de 300 mg, durante 6 meses.

A reacção adversa mais comum resultante da administração crónica é a nevrite periférica, cujos sintomas são entorpecimento, zumbidos, e uma sensação de irritação da pele. A hepatite também é outro efeito lateral associado com o tratamento, e é igualmente de grande perigosidade. Consistindo numa inflamação do fígado, os sintomas podem ser pele e olhos amarelados, náuseas, vómitos, anorexia, urina escura, sensação anormal de cansaço ou fraqueza generalizada. Outras reacções adversas que podem ocorrer são problemas na visão (nevrite óptica), diarreias, febre, dores de estômago, hiperpirexia, hipotensão, taquicardia, retenção urinária, hemorragias, cianose e agranulocitose.

Em casos raros, a isoniazida pode provocar depressão, ou desordens maníaco-depressivas, possivelmente resultantes do facto da droga interaccionar com a vitamina B6 provocando então uma depleção dos seus níveis biológicos. A isoniazida liga-se a piridoxal-5-fosfato, que é a forma activa da piridoxina (vitamina B6), para formar hidrazonas isoniazida-piridoxal. O piridoxal-5-fosfato é um cofactor para a descarboxilase do ácido glutâmico e para a transaminase do GABA, no caminho de síntese do GABA. Um excesso dos níveis de isoniazida resulta na diminuição de piridoxal-5-fosfato, e portanto, diminuição da síntese de GABA. Consequentemente, ocorre excitabilidade cerebral e ataques apopléticos.

A enorme popularidade e importância alcançada pela isoniazida como agente primário no tratamento da tuberculose impulsionaram o desenvolvimento de diversas metodologias analíticas para a sua determinação, tanto em preparações farmacêuticas como em amostras biológicas.

Uma pesquisa bibliográfica no "ISI WEB Of Knowledge", base de dados científica disponibilizada on-line [5], revela aproximadamente 210 artigos científicos publicados e relativos à determinação de isoniazida em formulações farmacêuticas e/ou amostras biológicas. Em virtude da lista de publicações científicas ser extensa, apenas se irá referir, a título de exemplo, alguns desses trabalhos mais significativos e relacionáveis com o conteúdo deste capítulo.

Os métodos cromatográficos são provavelmente os mais frequentemente usados na determinação de isoniazida em preparações farmacêuticas, e muito especialmente em amostras biológicas. Estes métodos recorrem a diferentes tipos de detectores, sendo no entanto a detecção na região do ultravioleta a mais utilizada [6-8]. A detecção fluorimétrica, quer por derivatização usando como agente oxidante o peróxido de hidrogénio [9], quer por tratamento fotoquímico [10] tem sido também utilizada, assim como a cromatografia gasosa [11] e a cromatografia em camada fina [12].

No entanto, há a destacar um número significativo de métodos colorimétricos, que tiram proveito da estrutura química da isoniazida, nomeadamente da reactividade do grupo hidrazida. Deste modo, foram propostas várias metodologias colorimétricas baseadas na formação de hidrazonas coradas, por reacção da isoniazida com diferentes aldeídos, como por exemplo o p-dimetilaminobenzaldeído [13] e o benzaldeído [14]. Foram também propostos como reagentes cromogénios a 1,2-naftoquinona-4-sulfonato, que reage com o grupo hidrazida, em meio alcalino, formando um composto de cor laranja com um máximo de absorvência a 480 nm [15, 16], a 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona que forma com a isoniazida um composto azul, em meio alcalino [17], 6,7-dicloroquinolina-5,8-diona, que forma produtos de condensação verdes em meio etanólico alcalino [18], e também a 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona [19], o 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazol [20], a 9-cloroacridina [21]. Recentemente, surgiu um trabalho publicado em que se explora a reactividade da isoniazida com 4,4'-sulfonildianilina em meio com hidróxido de sódio [22].

Alguns trabalhos exploram a forte absorvência da isoniazida na região do ultravioleta para a sua determinação [23]. A absorvência entre 230 e 290 nm de misturas de isoniazida e rifampicina foi utilizada para determinação espectrofotométrica simultânea destes compostos [24].

Embora a isoniazida não apresente originalmente fluorescência foram também propostas para a sua determinação metodologias fluorimétricas. Em 1971, Bartos [25] propôs a abertura do anel piridínico, do ácido nicotínico, com brometo de cianogénio, com formação de um derivado do aldeído glutacónico e condensação deste com o ácido p-aminobenzóico para formar uma base de Schiff fluorescente com um comprimento de onda de 366 nm e 480 nm. Ioannou propôs alternativamente a reacção entre a isoniazida e o 2-hidroxi-1-naftaldeído, em meio ácido [26].

O mesmo reagente foi usado por Sarwar et. al. [27] para a determinação de isoniazida por titulação com detecção visual do ponto final, usando o vermelho Bordeaux como indicador. A metodologia de referência da Farmacopeia Portuguesa é igualmente uma volumetria, sendo usado como titulante uma solução de bromato de potássio, e como indicador uma solução de vermelho de metilo. Uma ampla variedade de outros métodos volumétricos está disponível na literatura, incluindo as titulações não-aquosas com ácido perclórico, com detecção visual [28] ou potenciométrica [29] do ponto de equivalência.

Métodos electroquímicos também foram aplicados para a determinação da isoniazida, e envolvem essencialmente métodos polarográficos [30, 31] e coulométricos [32].

Também técnicas que exploram o conceito de gravimetria podem ser encontradas na literatura, como por exemplo, baseadas na formação de um composto insolúvel entre a isoniazida e o ácido pícrico [33].

No que diz respeito a metodologias de fluxo, a detecção espectrofotométrica foi utilizada num sistema envolvendo uma paragem de fluxo, para a determinação cinética de isoniazida por reacção com o 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno em meio micelar [34].

A detecção fluorimétrica também foi utilizada num sistema de fluxo, por Calatayud et. al., em que propuseram uma metodologia de fluxo com base na oxidação da isoniazida pelo peróxido de hidrogénio [35].

Uma metodologia automatizada de fluxo, baseada na quimioluminescência produzida durante a reacção entre a isoniazida e a N-bromosuccinimida, em meio alcalino, foi proposta por Calokerinos et. al. [36]. Este reagente também foi usado numa metodologia por Análise por Injecção em Fluxo, por Safani et. al., em 2003 [37].

O objectivo deste trabalho foi desenvolver uma nova metodologia de fluxo automatizada para a determinação de isoniazida em formulações farmacêuticas após reacção com 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS) em meio alcalino, e com detecção espectrofotométrica dos produtos da reacção no comprimento de onda 475 nm. A reacção química envolvida está representada na Figura 5.2.

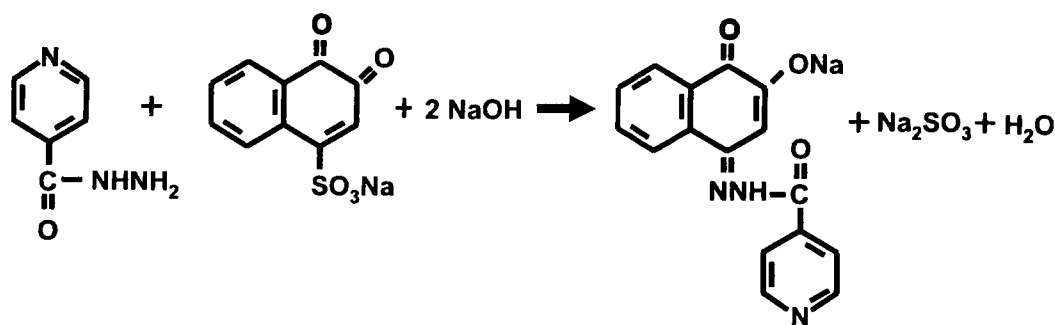


Figura 5.2

Mecanismo de reacção entre a isoniazida e NQS (Adaptado de [16]).

Simultaneamente, foi implementado um sistema de fluxo baseado na utilização de múltiplas buretas automáticas, de modo a que originassem volumes de passo entre 1 e 4 μL . As buretas automáticas, frequentemente utilizadas como unidades de propulsão alternativas às bombas peristálticas, são muito versáteis e facilmente controladas e operadas, o que faz delas dispositivos muito atractivos para a implementação de metodologias analíticas automáticas. O funcionamento programado das buretas possibilitou a obtenção de um fluxo pulsado. A sua avaliação foi realizada com distintas estratégias de amostragem, incluindo volumes únicos de amostra, amostragem binária e confluência de zonas, que representam diferentes procedimentos para a mistura entre amostra e reagente. Este estudo foi estendido a outros parâmetros de fluxo pulsado, que afectavam o perfil do sinal analítico, como por exemplo, o reactor e o volume interno da célula de fluxo.

5.2. Parte experimental

5.2.1. Reagentes

Uma solução $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de isoniazida foi preparada diariamente através da pesagem rigorosa de 50,0 mg do sólido isoniazida seguido de dissolução em 100 mL de solução tampão de carbonato/hidrogenocarbonato ($\text{pH} = 10,2$). Esta solução era conservada no frigorífico, e a partir dela eram preparadas as soluções padrão utilizadas para determinação na montagem analítica e para elaboração das curvas de calibração, por diluição com a mesma solução tampão de carbonato/hidrogenocarbonato.

A solução de NQS, com uma concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada também diariamente através da dissolução de 6,5 mg do reagente sólido pesado rigorosamente, em 500 mL de água bidesionizada. Esta solução era conservada num frasco de cor âmbar para limitar os possíveis efeitos de degradação provocados por exposição à luz, facto resultante de observações realizadas durante o trabalho.

A solução tampão de carbonato/hidrogenocarbonato a pH 10,2 foi preparada através da mistura de 11,76 mL de solução $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ de hidrogenocarbonato de sódio e 25,79 mL de uma solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de carbonato de sódio e perfazendo o volume até 100 mL com água bidesionizada [38].

5.2.2. Equipamento

A montagem de fluxo era constituída por buretas automáticas da marca Crison, modelos Micro BU 2030 e 2031, e estavam equipadas com seringas da marca Hamilton de capacidades 2,5, 5 ou 10 mL.

O seu controlo foi realizado através de um microcomputador Pentium I através da porta de série (RS-232C), e por intermédio de um programa de computador, desenvolvido em linguagem BASIC (Microsoft).

Como interface entre microcomputador e sistema analítico utilizou-se uma placa PCL-818L da marca Advantech, que também possibilitava realizar a aquisição de dados.

As medições espectrofotométricas foram realizadas com um espectrofotómetro Jenway, modelo 6100, equipado com uma célula de fluxo (Hellma) de 8 ou 18 μL de volume interno, e com percurso óptico de 10 mm.

Os tubos de fluxo e os reactores eram em PTFE e com diferentes diâmetros internos: 0,38 mm, 0,5 mm e 0,8 mm. Também foram utilizados adaptadores construídos no laboratório, conectores e confluências [39].

5.2.3. Montagem de fluxo

A integração das diferentes operações em apenas um único componente resultou num sistema de fluxo que explorou o conceito de multi-impulsão, com uma configuração muito simples (Figura 5.3).

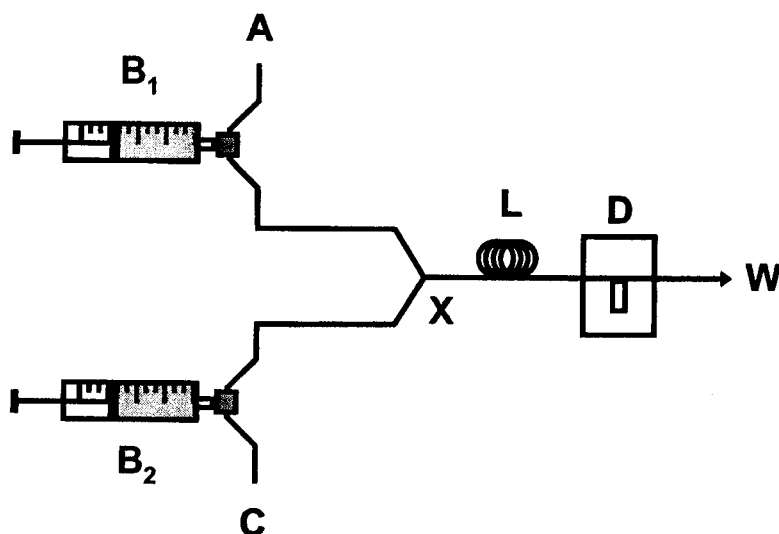


Figura 5.3

Diagrama da montagem de fluxo para a determinação de isoniazida.

B₁ e B₂ – Buretas automáticas equipadas com seringas de 2,5 mL para a introdução de amostra e reagente, respectivamente; A – Solução de amostra; C – Solução de reagente/transportador; X – ponto de confluência; L – Reactor (44 cm); D – Detector; W – Resíduos.

A montagem de fluxo proposta foi apenas constituída por dois distintos componentes funcionais: duas buretas automáticas (B_1 e B_2) e um espectrofotómetro. No entanto, as buretas automáticas foram os únicos dispositivos activos do sistema de fluxo. O computador, embora não se encontre esquematizado na Figura 5.3, foi um componente necessário visto que o controlo do sistema dependia das instruções programadas.

No sistema analítico a bureta automática B_2 foi responsável pela inserção e propulsão do transportador (também utilizado como reagente), enquanto que a bureta automática B_1 foi utilizada para a inserção e propulsão da solução de amostra. Alguns parâmetros inerentes ao funcionamento do sistema, como por exemplo, a frequência de passo das buretas, volume por cada passo, volumes de solução inseridos no sistema e estratégia de amostragem, foram definidos para cada uma das unidades automáticas de seringa possibilitando, deste modo, uma elevada versatilidade na manipulação da inserção de amostra e transporte das soluções em direcção ao sistema de detecção.

Inicialmente, a bureta B_2 era operada com uma frequência de passo constante e definida de modo a estabelecer a linha de base. Em seguida, para possibilitar a inserção de solução de amostra e solução de reagente no ponto de confluência X, as buretas automáticas B_1 e B_2 eram operadas simultaneamente e/ou alternadamente, dependendo da estratégia de amostragem utilizada. A resultante zona de reacção era de seguida transportada em direcção ao sistema de detecção D através da actuação da bureta automática B_2 .

O caudal foi definido pela frequência de passo e o volume correspondente a cada passo. Relativamente ao volume de amostra inserido no sistema, este foi estabelecido pelo número de passos executados pela bureta multiplicado pelo volume de cada passo.

Nas situações de análise que implicassem a substituição da solução de amostra inserida por intermédio da bureta automática B_1 , era necessário proceder à

lavagem e preparação da bureta B_1 com a nova solução, ou seja, era imprescindível a definição de uma etapa de lavagem no programa de controlo do sistema. Esta etapa embora não implicasse um grande consumo de tempo, podia afectar o ritmo de amostragem, sendo este facto importante considerando que o objectivo final do trabalho seria a aplicação do sistema de fluxo para determinações analíticas de rotina em formulações farmacêuticas.

Deste modo, para minimizar esta limitação, a etapa de lavagem foi realizada operando a bureta automática B_1 com uma frequência de passo muito elevada, de aproximadamente 10 passos por segundo, o que permitia um caudal de cerca de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ (para uma seringa de 2,5 mL de capacidade, que era o volume mais adequado para a implementação de algumas fases intermédias do procedimento desenvolvido).

Um procedimento alternativo ou sinérgico ao anterior, e relativo à etapa de lavagem na substituição da solução de amostra, consistia na inclusão de uma válvula solenóide de comutação de três vias (V), colocada entre a bureta automática B_1 e o ponto de confluência X, em simultâneo com uma alça de armazenamento (L_1) para prevenir que as soluções de amostra atingissem a seringa da bureta B_1 (Figura 5.4).

Ou seja, a solução de amostra era primeiro aspirada em excesso para a alça de armazenamento L_1 e depois um segmento da zona de amostra era impulsionada para o ponto de confluência para mistura com o reagente. A seringa da bureta automática B_1 estava sempre preenchida com água bidesionizada que era utilizada como transportador da solução de amostra. Durante a etapa de substituição da solução de amostra, tal como acontecia com a configuração anterior (Figura 5.3), a bureta automática era operada numa frequência de passo elevada. Como em ambas as configurações o caminho analítico era o mesmo, os resultados obtidos eram idênticos. No entanto, quando era usada a válvula solenóide, o consumo das soluções reduzia acentuadamente porque não era necessário o enchimento da

seringa da bureta automática e sua lavagem com a solução de amostra a determinar. Adicionalmente, a versatilidade de funcionamento do sistema também aumentou, pois a etapa de substituição da solução de amostra realizava-se de modo a prevenir a mistura de diferentes soluções.

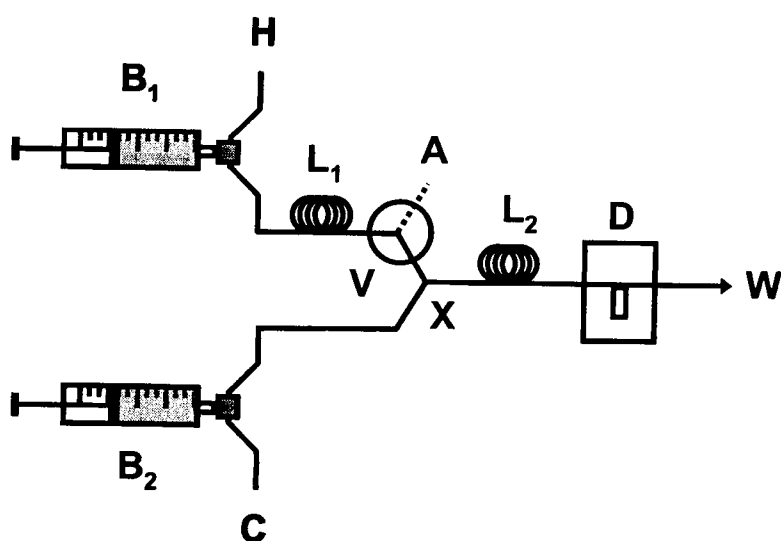


Figura 5.4

Diagrama da montagem de fluxo para a determinação de isoniazida.

B₁ e B₂ – Buretas automáticas equipadas com seringas de 2,5 mL para a introdução de amostra e reagente, respectivamente; V – Válvula solenóide de comutação (3 vias); A – Solução de amostra; C – Solução de reagente/transportador; H – Água; L₁ e L₂ – Reactores; X – ponto de confluência; D – Detector; W – Resíduos.

5.2.4. Método de referência

Para avaliar a exactidão da metodologia desenvolvida, foi analisada a isoniazida em formulações farmacêuticas de acordo com a Farmacopeia Portuguesa [40], através de uma titulação com bromato de potássio e utilizando como indicador o vermelho de metilo.

O doseamento foi realizado numa amostra de 20 comprimidos pulverizados, através da pesagem rigorosa de uma quantidade de pó correspondente a cerca de 0,4 g de isoniazida, e seguido de dissolução em água bidesionizada. A solução resultante foi filtrada e lavada com água bidesionizada até completar 250 mL. Em seguida, a uma alíquota de 50 mL da última solução foi adicionado 50 mL de água bidesionizada, 20 mL de ácido clorídrico, 0,2 g de brometo de potássio e 0,05 mL de solução de vermelho de metilo.

Esta solução foi titulada com uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de bromato de potássio, até se verificar o desaparecimento da coloração vermelha, sendo que, 1 mL de solução de bromato de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ corresponde a 3,429 mg de isoniazida.

5.3. Resultados e discussão

A utilização de buretas automáticas como dispositivos activos de propulsão em sistemas analíticos de fluxo sofreu recentemente um aumento notável. Este facto relaciona-se directamente com as características operacionais das buretas automáticas, que estão usualmente associadas à geração de um fluxo constante e não pulsado, e que por essa razão justificaram a sua aplicação em distintas

técnicas de fluxo, como por exemplo, análise por injeção sequencial [45] e multicomutação [46].

Contudo, a suposição geralmente reconhecida de que o fluxo originado pelo funcionamento das buretas automáticas não é pulsado pode ser questionada, porque a maioria das buretas automáticas comerciais é constituída por motores de passo, com capacidade de execução de 2500 ou 5000 passos no máximo, pelo menos pela altura da realização do trabalho descrito no presente capítulo. Actualmente, por exemplo, são comercializadas buretas automáticas da marca Crison com capacidade máxima de resolução de 40000 passos por seringa.

Considerando por exemplo, uma bureta automática com um motor de 2500 passos (Crison BU 2030 e 2031) equipada com uma seringa com capacidade de 10 mL, é facilmente verificado que cada passo executado pela bureta corresponde a um volume debitado de 4 μ L da seringa. Deste modo, é esperado que através do controlo da frequência de actuação da bureta (frequência de passo) e em condições restritas de dispersão seja obtido um fluxo pulsado, porque quando a bureta executa diversos passos consecutivos, cada volume de passo é debitado independentemente, não estando envolvido num fluxo constante. Este facto é muito importante, porque um fluxo pulsado implica um movimento caótico das soluções em todas as direcções dentro dos tubos, o que contribui para a optimização da mistura, e consequentemente, uma eficiente mistura entre amostra e reagente quando comparado com o típico fluxo laminar geralmente associado com o fluxo contínuo.

Com o intuito de observar a ocorrência de fluxo pulsado originado pelo funcionamento programado das buretas automáticas, e utilizando o sistema descrito anteriormente na Figura 5.3, configurou-se o registador para uma velocidade elevada de deslizamento de papel (5 mm por segundo). Deste modo, foi possível visualizar em papel os rápidos incrementos de absorvência (os picos surgem com um aspecto semelhante a escada) fornecidos pelo espectrofotómetro,

para a reacção entre isoniazida e o reagente NQS. Para tal, inseriu-se uma solução $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de isoniazida e uma solução $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de NQS. A capacidade das seringas acopladas às buretas era de 10 mL, originando por isso um volume de 4 μL por cada passo da bureta. No entanto, verificou-se que utilizando tubo de PTFE com um diâmetro interno de 0,8 mm e uma célula de fluxo de 18 μL acoplada no espectrofotómetro, os pulsos não se revelavam. Estes resultados são diferentes dos obtidos em outro trabalho [41], em que uma micro-bomba debitando 3 μL de volume de solução por pulso, originava um acentuado fluxo pulsado mesmo considerando que o volume por pulso era inferior, com uma diferença de apenas 1 μL (para células de fluxo de igual volume óptico).

O movimento muito mais rápido do diafragma da micro-bomba, e que permite um débito quase instantâneo do volume do pulso, podia explicar este comportamento diferente.

Numa experiência ulterior, a dispersão das soluções foi alterada drasticamente, através da utilização de uma seringa com 2,5 mL de capacidade (1 μL de volume por passo), tubos de fluxo com diâmetro interno de 0,38 mm, e também utilizando uma célula de fluxo com capacidade de 8 μL . Nestas condições limitadas de dispersão, as mesmas soluções de isoniazida e NQS produziam um sinal analítico com um perfil em escada (Figura 5.5), o que é sem dúvida característico de um fluxo pulsado. Demonstrou-se que em condições limitadas de dispersão, o fluxo pulsado se revela mais acentuadamente, enquanto que noutras situações a dispersão no acto da medida esconde as características hidrodinâmicas do fluxo.

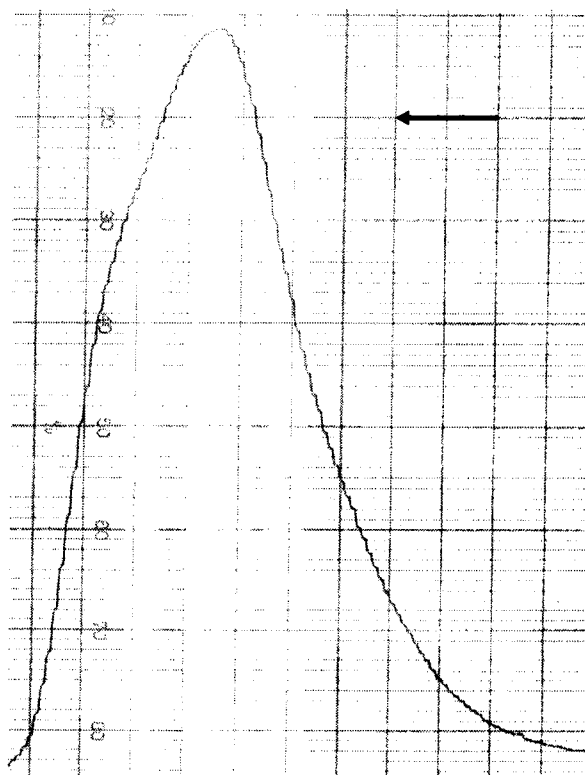


Figura 5.5

Registro gráfico do sinal analítico obtido com a inserção de 2 pulsos (8 μ L) de amostra e reagente, por amostragem binária. Velocidade do registro = 5 mm/s.

5.3.1. Volume de passo da bureta, comprimento do reactor, volume de amostra e estratégia de amostragem

Em virtude dos resultados anteriores, embora aparentemente uma bureta automática não origine, pelo menos em condições normais de dispersão, uma corrente de fluxo que possa ser considerada sem dúvida um fluxo pulsado, o volume debitado por cada passo executado pela bureta e a estratégia de amostragem, desempenham um efeito importante na amplitude da resposta

analítica. Esta influência deve-se ao facto de tanto o volume de passo como a estratégia de amostragem utilizada afectarem não apenas o transporte das soluções, mas igualmente a homogeneização da zona de reacção.

Assim, para estudar experimentalmente este facto foi desenhado um ensaio, envolvendo uma solução $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de isoniazida e uma solução $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de NQS, e que serviu para avaliar a influência na resposta analítica de três distintas estratégias de inserção de amostra: amostragem binária, confluência de zonas, e volumes únicos de amostra [47]. O ensaio realizou-se através do registo do sinal analítico em função dos volumes de amostra inserida no sistema, para cada uma das diferentes estratégias de amostragem e também para distintos volumes de passo das buretas (1, 2 e 4 μL). Estes diferentes volumes de passo foram conseguidos recorrendo a seringas de diferentes capacidades: 2,5, 5 e 10 mL a que correspondem volumes de passo 1, 2 e 4 μL , respectivamente; estes valores são assim definidos para as buretas automáticas utilizadas no ensaio, com motores de capacidade de execução de 2500 passos no percurso máximo por seringa. Os volumes de amostra inseridos no sistema, e traduzidos proporcionalmente pelo número de passos executados pela bureta responsável pela inserção da solução de amostra, foram programados de modo a serem coincidentes para as três estratégias de amostragem ensaiadas, para que deste modo, os resultados obtidos entre os ensaios fossem passíveis de comparação, independentemente da capacidade da seringa utilizada. Isto significa que, por exemplo, era obtido um volume de amostra de 20 μL com 5 passos de uma bureta equipada com uma seringa de 10 mL, 10 passos com uma seringa de 5 mL e 20 passos com a utilização de uma seringa de 2,5 mL. A única diferença, e que era importante, ocorria na estratégia de amostragem binária: o volume de cada passo, dependente da capacidade da seringa acoplada à bureta automática, influenciava a intercalação dos segmentos de amostra e reagente. De facto, e embora considerando que o volume final da zona de amostra era idêntico, uma seringa de

2,5 ml possibilitava a intercalação de 1 μL de amostra e 1 μL de reagente (20 ciclos de intercalação para um volume de 20 μL de amostra), enquanto uma seringa de 10 mL apenas permitia a intercalação de alíquotas de 4 μL de amostra e 4 μL de reagente (5 ciclos de intercalação para um volume de 20 μL de amostra). Sendo assim, podia obter-se diferentes graus de mistura de solução de amostra com solução de reagente, dependendo da capacidade das seringas colocadas nas buretas automáticas.

O caudal era igualmente um parâmetro analítico importante que implicava que fosse mantido constante entre os ensaios, porque embora no sistema de fluxo descrito não influenciasse o volume total de amostra inserido no sistema, influenciava certamente o tempo de residência da zona de amostra no sistema e consequentemente o tempo da reacção. Assim, o caudal foi fixado em 0,24 mL min^{-1} para todos os ensaios realizados, através de uma programação do tempo de repouso entre cada passo da bureta de 1, 0,5 e 0,25 segundos, para as seringas de 10, 5 e 2,5 mL de capacidade, respectivamente.

Os resultados dos ensaios estão representados na Figura 5.6, organizados pela capacidade das seringas utilizadas. Pela observação dos resultados conclui-se que para todas as seringas utilizadas, tendo em consideração a estratégia de amostragem, a amostragem binária originou os sinais analíticos mais elevados, seguido da estratégia de confluência de zonas e inserção de volumes únicos de amostra.

Além disso, o sinal analítico aumentou acentuadamente com o volume de amostra inserido no sistema até um determinado valor de volume após o qual se verificou uma diminuição da resposta analítica, sendo esse decréscimo mais acentuado quando se introduziu volumes únicos de amostra.

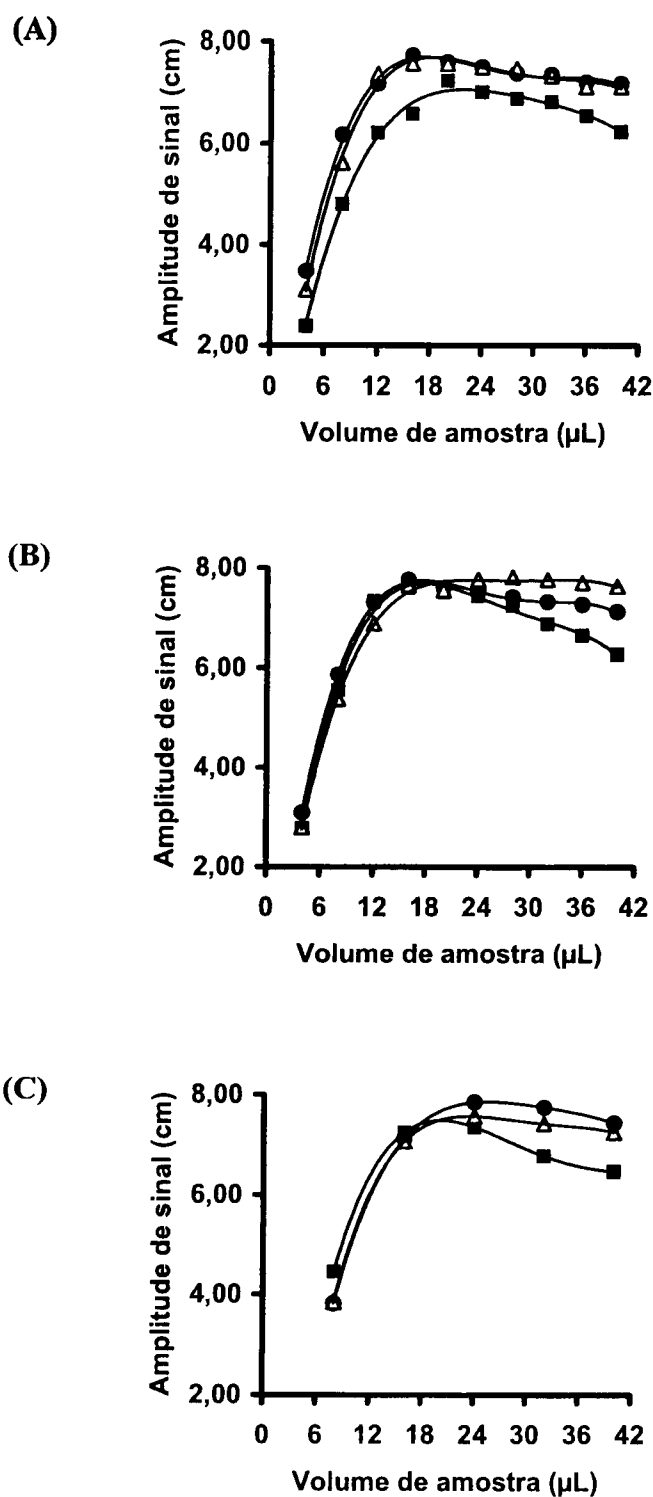


Figura 5.6

Avaliação da influência no sinal analítico da estratégia de inserção de amostra utilizada, em função do volume de amostra. (A) – seringa de 2,5 mL; (B) – seringa de 5,0 mL; (C) – seringa de 10,0 mL. ● – amostragem binária; ■ – volumes únicos; Δ - confluência de zonas.

Este facto, concordante com o aparecimento de um segundo pico no registo analítico, localizado na zona do registo correspondente à cauda da zona de amostra, era devido a uma deficiente mistura entre amostra e reagente que não atingia porventura a zona mais central da zona de amostra para o caso da estratégia de volumes contínuos, ou por falta de reagente na zona central para o caso das outras estratégias. Por outro lado, e tendo em conta os factos apresentados, a mistura entre amostra e reagente providenciada pelas estratégias de amostragem binária e confluência de zonas assegurava uma mais adequada homogeneização da zona de amostra mesmo para volumes elevados de amostra, conforme se pode verificar pelos resultados.

Em seguida, na Figura 5.7 são apresentados os mesmos resultados obtidos do ensaio anterior, mas organizados de acordo com a estratégia de amostragem utilizada. Quando se compara a amplitude de sinal analítico em relação ao volume por passo das buretas verifica-se que o sinal analítico mais elevado foi semelhante para os três volumes por passo avaliados: 1, 2 e 4 μL .

No entanto, o valor mais elevado foi obtido para baixos volumes de amostra quando se utilizava 1 μL e 2 μL de volume de passo das buretas. De facto, os resultados obtidos, por exemplo com a estratégia de amostragem binária (Figura 5.7), demonstraram que o máximo de sinal foi obtido com um volume de amostra de aproximadamente 16 μL para 1 μL e 2 μL de volume por passo, e com 24 μL de volume de amostra para um volume de 4 μL por passo. Este desempenho diferente foi devido provavelmente à melhor homogeneização da zona de amostra e que só é possível com a intercalação de volumes de amostra e reagente tão pequenos como 1 μL , o que originou múltiplas interfaces de reacção e contribuiu portanto para um desenvolvimento da reacção muito mais optimizado.

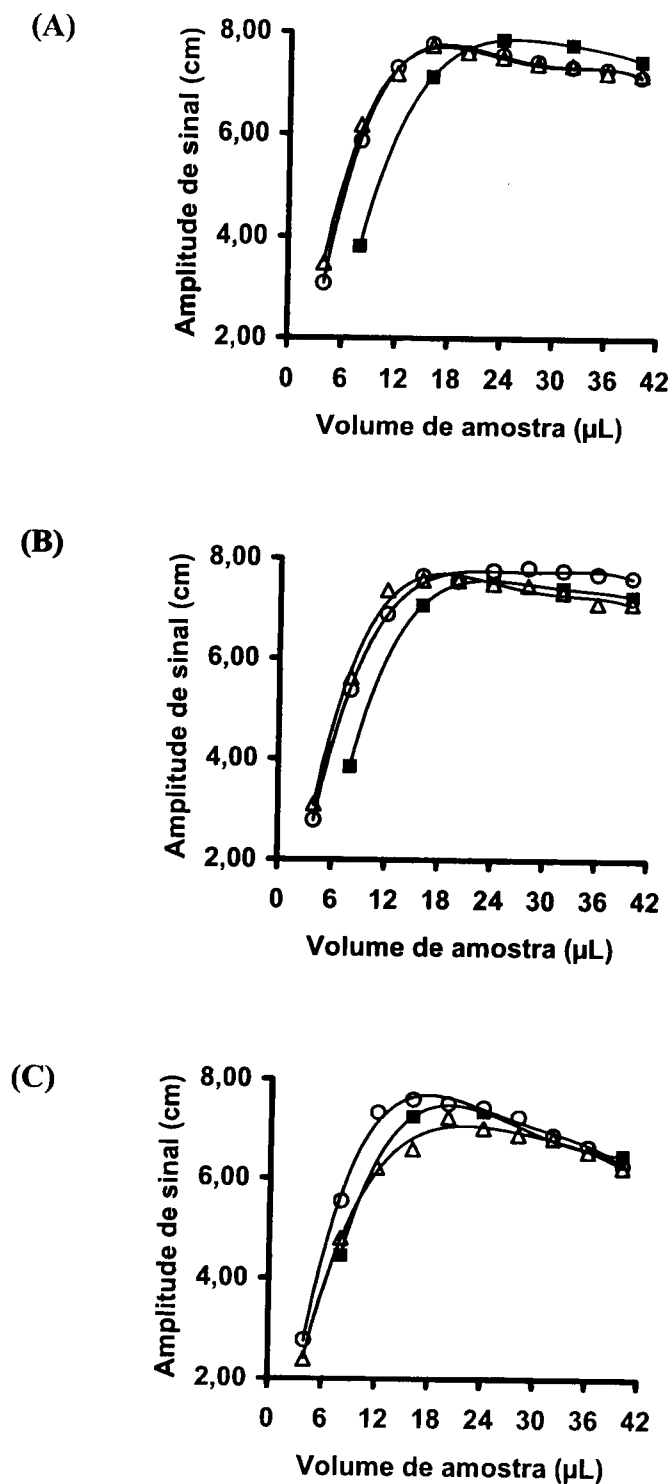


Figura 5.7

Avaliação da influência no sinal analítico da capacidade da seringa utilizada, em função do volume de amostra. (A) – amostragem binária; (B) – confluência de zonas; (C) – volumes únicos. ■ – seringa 10,0 mL; ● – seringa 5 mL; Δ – seringa 2,5 mL.

Considerando, por exemplo, um volume de amostra de 16 μL , a utilização de um volume de passo de 1 μL origina 32 interfaces amostra/reagente para ocorrência de reacção, recorrendo à inserção de solução de amostra através da estratégia de amostragem binária. Comparativamente, para o mesmo volume de amostra e utilizando um volume de passo de 4 μL , origina-se apenas 8 interfaces de reacção. Apesar da ínfima diferença de volume entre 1 e 4 μL de volume por passo da bureta automática, em circunstâncias de dispersão limitada como as ocorridas com a utilização de tubos com diâmetro interno muito pequeno e reduzido volume interno da célula de fluxo, a intercalação de segmentos de soluções com menor volume facilita obviamente a homogeneização, embora seja importante referir o facto de que este comportamento característico ou distinto não ocorreria em condições mais convencionais ou típicas de fluxo contínuo.

Inclusive, um estudo da influência do diâmetro interno dos tubos de fluxo no sinal analítico demonstrou que utilizando tubos com 0,8 mm d.i., as três estratégias diferentes de amostragem originaram sinais analíticos idênticos (Figura 5.8).

Além disso, esta semelhança ocorria para todos os volumes de amostra inseridos. No entanto, quando se utilizava tubos com d.i. de 0,5 mm, e mais acentuadamente para tubos com 0,38 mm de d.i., os sinais analíticos produzidos pela amostragem binária foram ligeiramente superiores aos obtidos com a estratégia de confluência de zonas, mas manifestamente maiores que os obtidos com a estratégia de inserção de volumes únicos de amostra (Figura 5.8), confirmando que devido ao reduzido diâmetro interno dos tubos tanto a dispersão axial como a dispersão radial eram limitadas [48], o que resultou numa mistura amostra/reagente ineficiente, e por isso, no registo analítico observou-se a ocorrência de um duplo pico por amostra introduzida, situação essa que foi reprimida recorrendo às estratégias de amostragem binária ou confluência de zonas.

Os mesmos resultados foram reorganizados, de modo a serem representados de acordo com a estratégia de inserção de amostra utilizada (Figura 5.9).

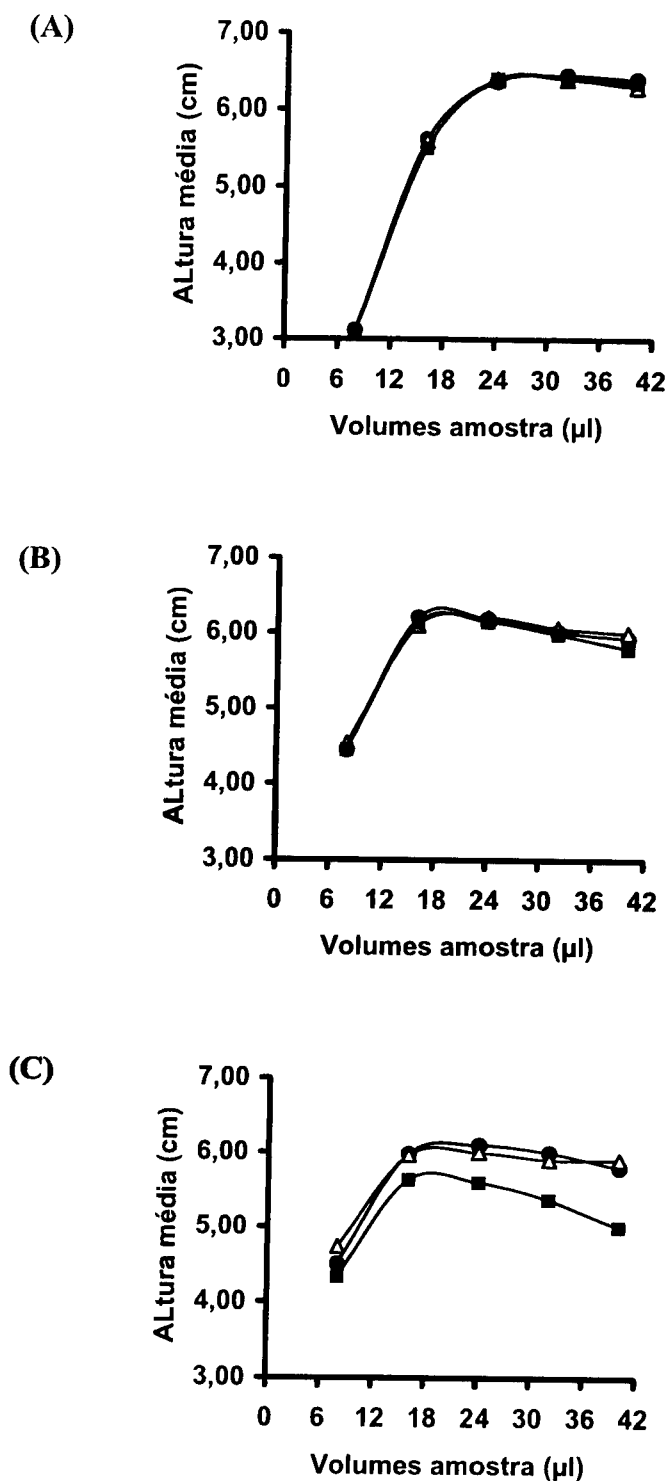


Figura 5.8

Avaliação da influência no sinal analítico de diferentes diâmetros internos dos tubos, em função do volume de amostra introduzido no sistema. (A) – diâmetro interno 0,8 mm; (B) – diâmetro interno 0,5 mm; (C) – diâmetro interno 0,38 mm. ● – amostragem binária; ■ – volumes únicos; Δ - confluência de zonas.

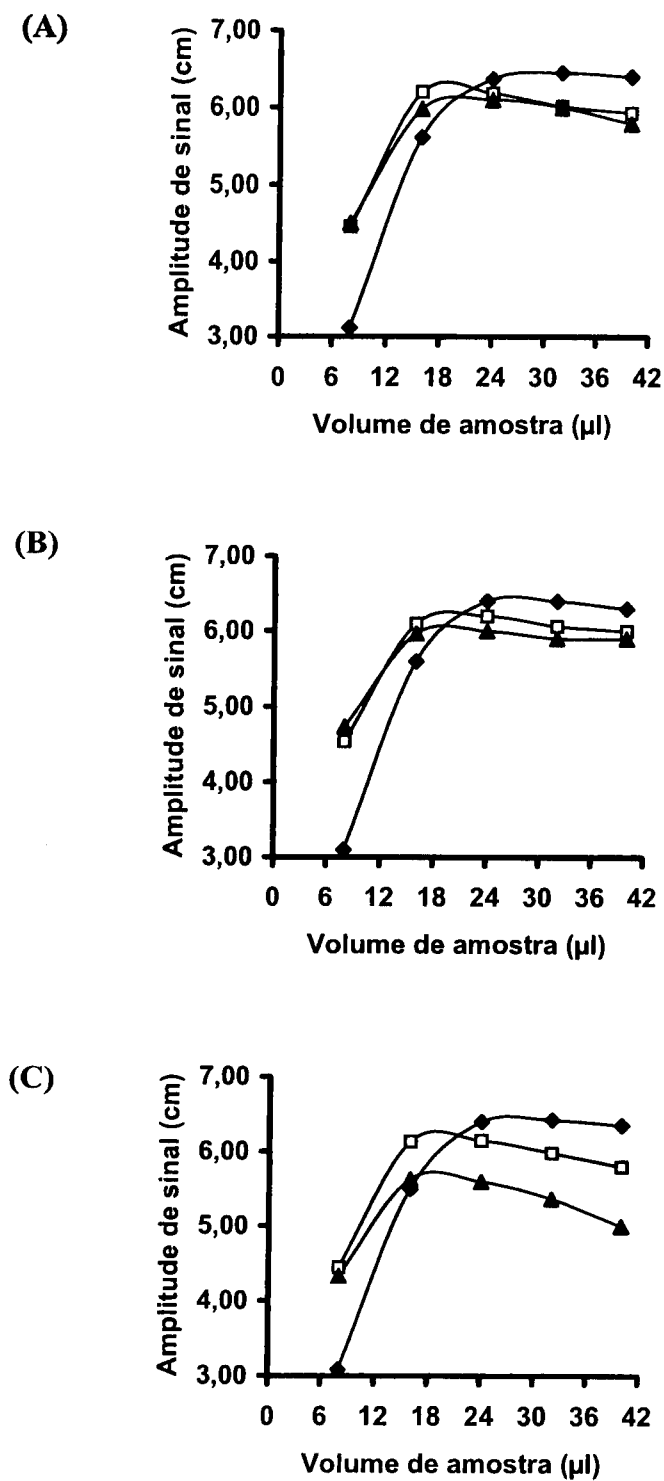


Figura 5.9

Avaliação da influência no sinal analítico de diferentes diâmetros internos dos tubos, em função do volume de amostra. (A) – amostragem binária; (B) – confluência de zonas; (C) – volumes únicos.

◆ – diâmetro interno 0,8 mm; □ – diâmetro interno 0,5 mm; ▲ – diâmetro interno 0,38 mm.

A partir da observação dos resultados representados na Figura 5.9, verifica-se claramente que com tubos de diâmetro interno de 0,8 mm, a utilização de diferentes estratégias não influenciou a amplitude sinal analítico. No entanto, a situação já foi bem diferente quando se utilizou tubos com diâmetro interno de 0,5 ou 0,38 mm. Neste caso, já se verificou uma evidente separação das amplitudes de sinal obtidas para a situação de inserção de volumes únicos em função da utilização de diferentes diâmetros internos nos tubos. A estratégia de inserção de volumes únicos de amostra é mais influenciada pelas condições de dispersão do sistema analítico, pois a mistura amostra/reagente durante o transporte para detecção está dependente unicamente dos efeitos de dispersão.

Numa perspectiva mais geral, também se verificou que os sinais analíticos obtidos com a utilização de uma célula de fluxo de 18 μL foram comparativamente inferiores aos obtidos quando da utilização de uma célula de fluxo de 8 μL , o que já seria de esperar devido ao incremento da dispersão da zona de reacção no interior da célula de fluxo. Também o perfil das escadas do registo analítico foi diferente, devido ao efeito aumentado da dispersão numa célula de fluxo de 18 μL . Os resultados obtidos para este ensaio estão representados na Figura 5.10 e Figura 5.11.

Adicionalmente, e referindo como considerações gerais, é importante assinalar que a estratégia de utilização de um volume de 1 μL por passo das buretas combinado com a estratégia de amostragem binária para inserção das soluções de amostra no sistema, constituiu um procedimento mais versátil e que assegurou um controlo rigoroso e minucioso da introdução de amostra no sistema analítico, providenciando os meios para a implementação de sistemas de fluxo compactos, dada a eficiência nos processos de homogeneização sem implicar a presença de reactores maiores ou outros dispositivos promotores de mistura. Adicionalmente, a estratégia referida possibilitou a minimização dos volumes de reagente consumido.

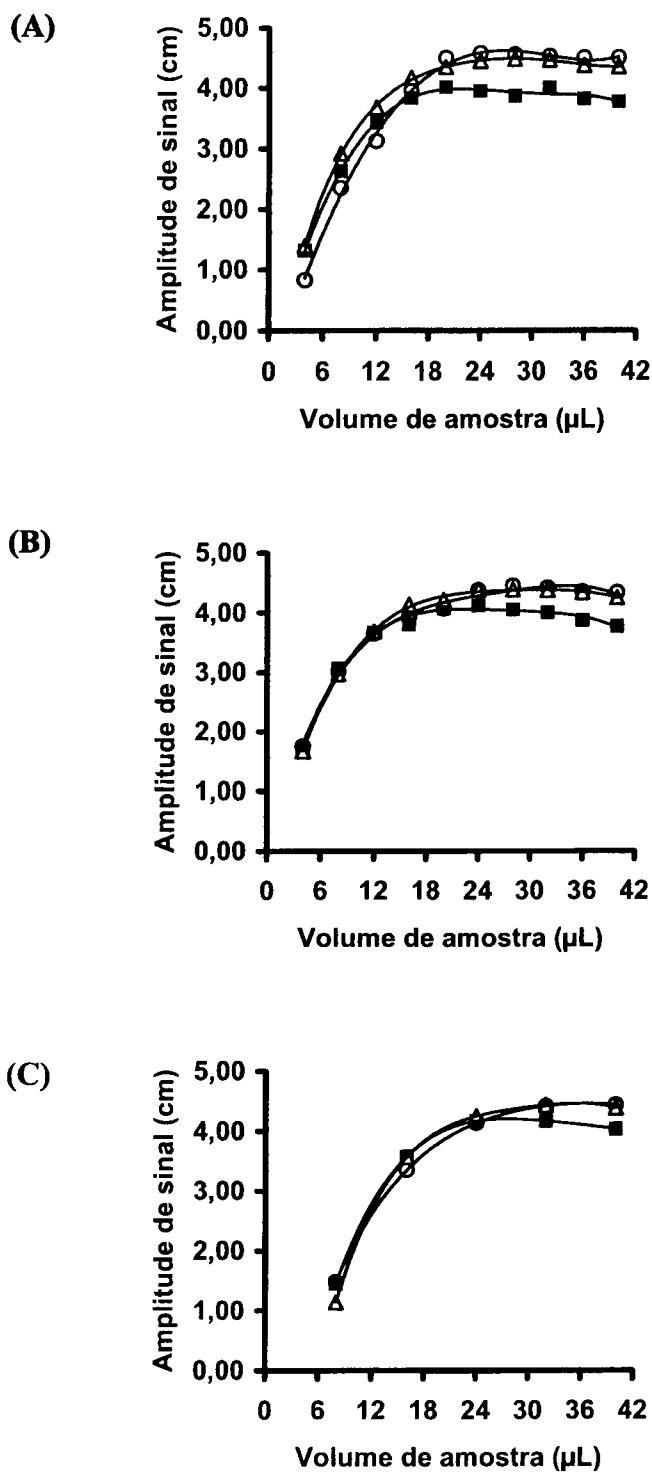


Figura 5.10

Avaliação da influência no sinal analítico da estratégia de inserção de amostra utilizada, em função do volume de amostra. (A) – seringa de 2,5 mL; (B) – seringa de 5,0 mL; (C) – seringa de 10,0 mL. ○ – amostragem binária; ■ – volumes únicos; Δ - confluência de zonas.

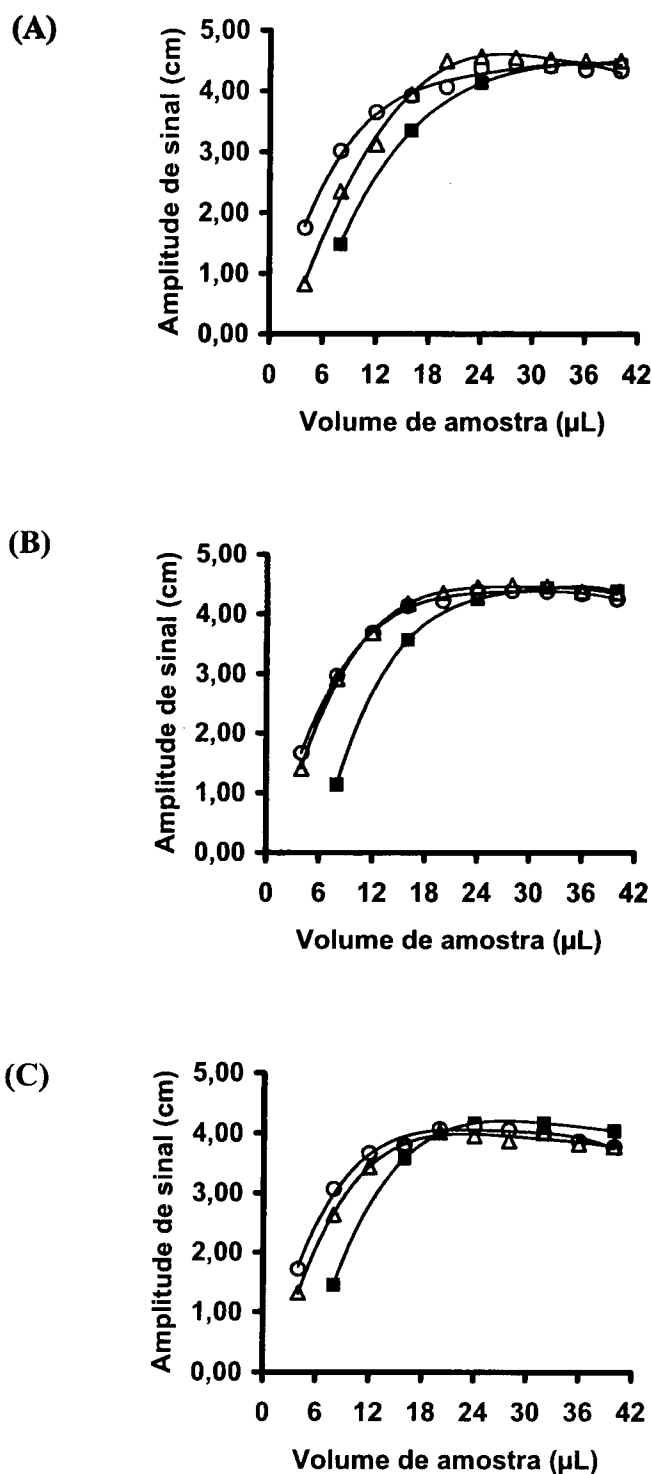


Figura 5.11

Avaliação da influência no sinal analítico da estratégia de inserção de amostra utilizada, em função do volume de passo. (A) – amostragem binária; (B) – confluência de zonas; (C) – volumes únicos.

■ – seringa de 10,0 mL; ○ – seringa de 5,0 mL; Δ – seringa de 2,5 mL.

Contudo, como a utilização de 1 μ L de volume de passo implicava a colocação de seringas de 2,5 mL de capacidade nas buretas, e o volume destas se esgotava mais rapidamente que com a utilização de seringas de 5 ou 10 mL para o mesmo número de determinações, havia obrigatoriedade de um maior número de etapas de enchimento das seringas, sendo esta dificuldade superada através da estratégia de adição ao sistema de uma válvula solenóide de comutação como referido na descrição da montagem analítica.

5.3.2. Comprimento do reactor

Um parâmetro também importante, e que foi avaliado, foi o comprimento do reactor L_2 utilizado no sistema analítico, porque influenciava directamente a dispersão e o tempo de residência da zona de reacção no sistema antes da detecção, isto é, o tempo de reacção, para um determinado caudal. Considerando que um dos objectivos foi avaliar o desempenho do sistema proposto em condições de dispersão limitadas, o comprimento do reactor foi fixado em 44 cm e o diâmetro interno do tubo utilizado foi de 0,38 mm. Um reactor mais longo ou com um diâmetro interno maior resultaria num aumento da dispersão de amostra que iria certamente atenuar ou mascarar a influência do volume de passo na resposta analítica.

Os resultados estão representados nas Figuras 5.12 e 5.13.

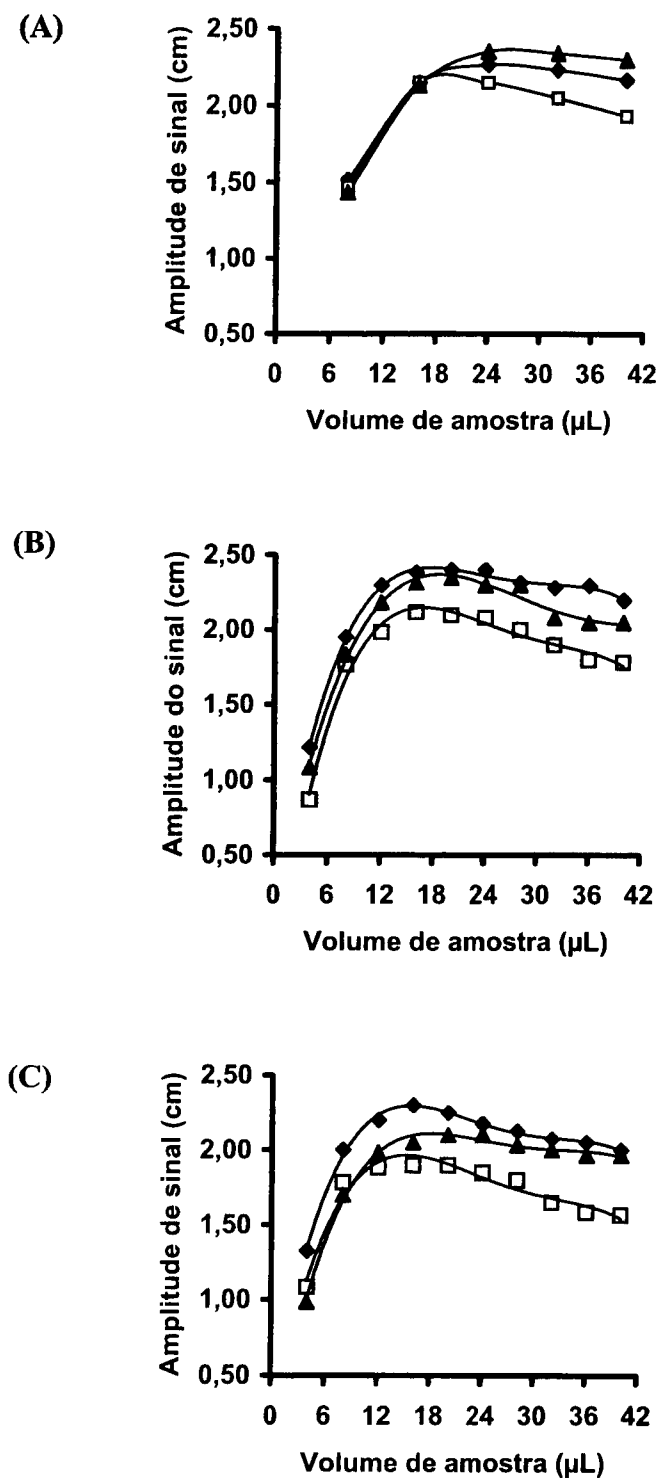


Figura 5.12

Avaliação da influência no sinal analítico da estratégia de inserção de amostra utilizada, em função do volume de amostra. (A) – seringa de 10,0 mL; (B) – seringa de 5,0 mL; (C) – seringa de 2,5 mL. ♦ – amostragem binária; □ – volumes únicos; ▲ - confluência de zonas.

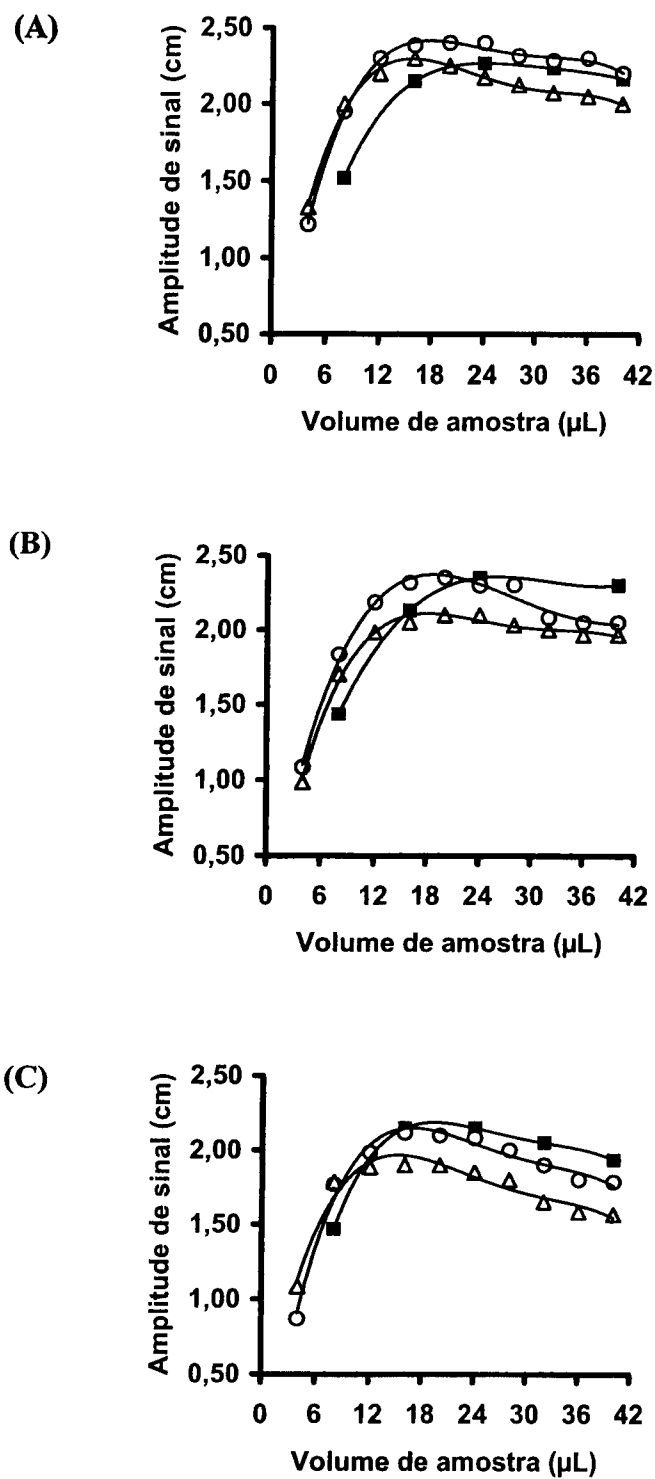


Figura 5.13

Avaliação da influência no sinal analítico da capacidade da seringa utilizada, em função do volume de amostra. (A) – amostragem binária; (B) – confluência de zonas; (C) – volumes únicos. ■ – seringa de 10,0 mL; ○ – seringa de 5,0 mL; Δ – seringa de 2,5 mL.

A avaliação do efeito do comprimento do reactor, por comparação com os resultados obtidos nos ensaios iniciais e representados na Figura 5.6 e Figura 5.7, demonstrou, tal como seria de esperar, que um reactor de 44 cm produziu um sinal analítico quase 3 vezes superior ao obtido com um reactor de 22 cm (para todas as estratégias de inserção de amostra). Isto pode ser explicado pelo mais reduzido tempo de residência quando se utilizou um reactor de 22 cm e que resultou num desenvolvimento insuficiente da reacção.

5.3.3. Caudal (frequência de passo das buretas)

De acordo com o procedimento desenvolvido, o caudal era determinado pela frequência de passo (número de passos executados pela bureta por unidade de tempo) multiplicado pelo volume de passo. É um parâmetro analítico muito importante, porque afecta directamente o tempo do percurso e contacto no interior da montagem, e consequentemente, a amplitude do sinal analítico e ritmo de amostragem.

A frequência de passo foi controlada através da alteração do tempo de repouso entre duas actuações consecutivas do motor de passo da bureta automática. Para um determinado volume de passo, o caudal aumentava conforme esse tempo de repouso diminuía. No entanto, devido às limitações operacionais das buretas, o caudal mais elevado foi limitado a uma frequência de passo de cerca de 10 passos por segundo (ou, tempo de repouso entre passos de 0,1 segundos), sendo que acima deste valor o funcionamento da bureta automática se revelou irregular. Considerando uma bureta equipada com seringas de capacidade de 10, 5 ou 2,5 mL, uma frequência de passo da ordem de 10 s^{-1} originou caudais de aproximadamente 2,4, 1,2 e 0,6 mL min^{-1} , respectivamente. Por outro lado, e por

exemplo, para a situação de uma seringa de 2,5 mL, tempos de repouso definidos para 0,25, 0,5, 0,75 e 1 segundos (frequências de passo de cerca de 4, 2, 1,3 e 1 por segundo) traduziram-se em caudais de 0,24, 0,12, 0,09 e 0,06 mL min⁻¹, respectivamente.

É importante referir que o parâmetro frequência de passo foi avaliado apenas em termos de actuação de um único passo por cada ordem de activação do motor de passo da bureta. Este facto é referido, porque o motor de passo da bureta pode ser programado para executar múltiplos passos, apenas com uma ordem de actuação enviada pelo computador. Neste caso, este aspecto mecânico das buretas automáticas possibilitava alcançar caudais mais elevados, mas por outro lado seriam também mais irregulares.

A avaliação da influência do caudal foi realizada inserindo volumes crescentes de amostra de 8, 16, 24, 32 e 40 µL em frequências de passo de 1, 1,3, 2, 4 e 10 e utilizando uma seringa com capacidade de 2,5 mL (a escolha foi justificada em 5.2.3). Adicionalmente, para cada uma destas frequências de passos das buretas, ou seja, para cada caudal testado, foi analisado as três estratégias de inserção de amostra mencionadas anteriormente: amostragem binária, confluência de zonas e volumes únicos de amostra.

Os resultados encontram-se representados em gráficos nas Figuras 5.14 e 5.15. Na Figura 5.14 cada gráfico representa um caudal diferente e é possível observar os efeitos no sinal analítico através da alteração da estratégia de inserção de amostra. Na Figura 5.15, os mesmos resultados estão organizados de maneira diferente, em que cada gráfico representa uma mesma estratégia de inserção de amostra para diferentes caudais.

Verificou-se que a amplitude do sinal analítico mais elevada foi obtida com um caudal de 0,12 mL min⁻¹ (tempo de repouso entre passos de 0,5 s) e um volume de amostra de 16 µL inserido pela estratégia de amostragem binária. Estes resultados obtidos foram muito semelhantes aos obtidos com a estratégia confluência de

zonas, mas superiores aos obtidos com a estratégia de inserção de volumes únicos de amostra. Aliás, por observação da Figura 5.14 verificou-se que os resultados obtidos para a amostragem binária se sobrepuseram com frequência aos obtidos com a estratégia de confluência de zonas, para todos os caudais avaliados. Ocorreu obviamente para a utilização da estratégia de volumes únicos uma diferença significativa na amplitude dos sinais analíticos, que foram inferiores aos obtidos com as outras estratégias, sendo esse facto mais acentuado para valores elevados de volumes de amostra, mais concretamente para volumes de amostra entre 16 e 40 μL . É de notar que para um volume de amostra de 8 μL o sinal analítico diminuiu conforme aumentava o caudal, o que pode ser explicado pelo aumento da dispersão mas insuficiente tempo de reacção. Para este volume em todos os ensaios não se verificou a ocorrência de duplos picos. Este comportamento foi partilhado pelas três estratégias de amostragem, que produziram sinais analíticos equiparáveis. Significa, portanto, que em todas as situações se conseguiu misturas eficientes de amostra com reagente.

Elevados volumes de amostra (32 a 40 μL) não foram afectados pelo caudal, tendo-se verificado contudo a ocorrência de duplos picos até em caudais tão baixos como 0,06 mL min^{-1} .

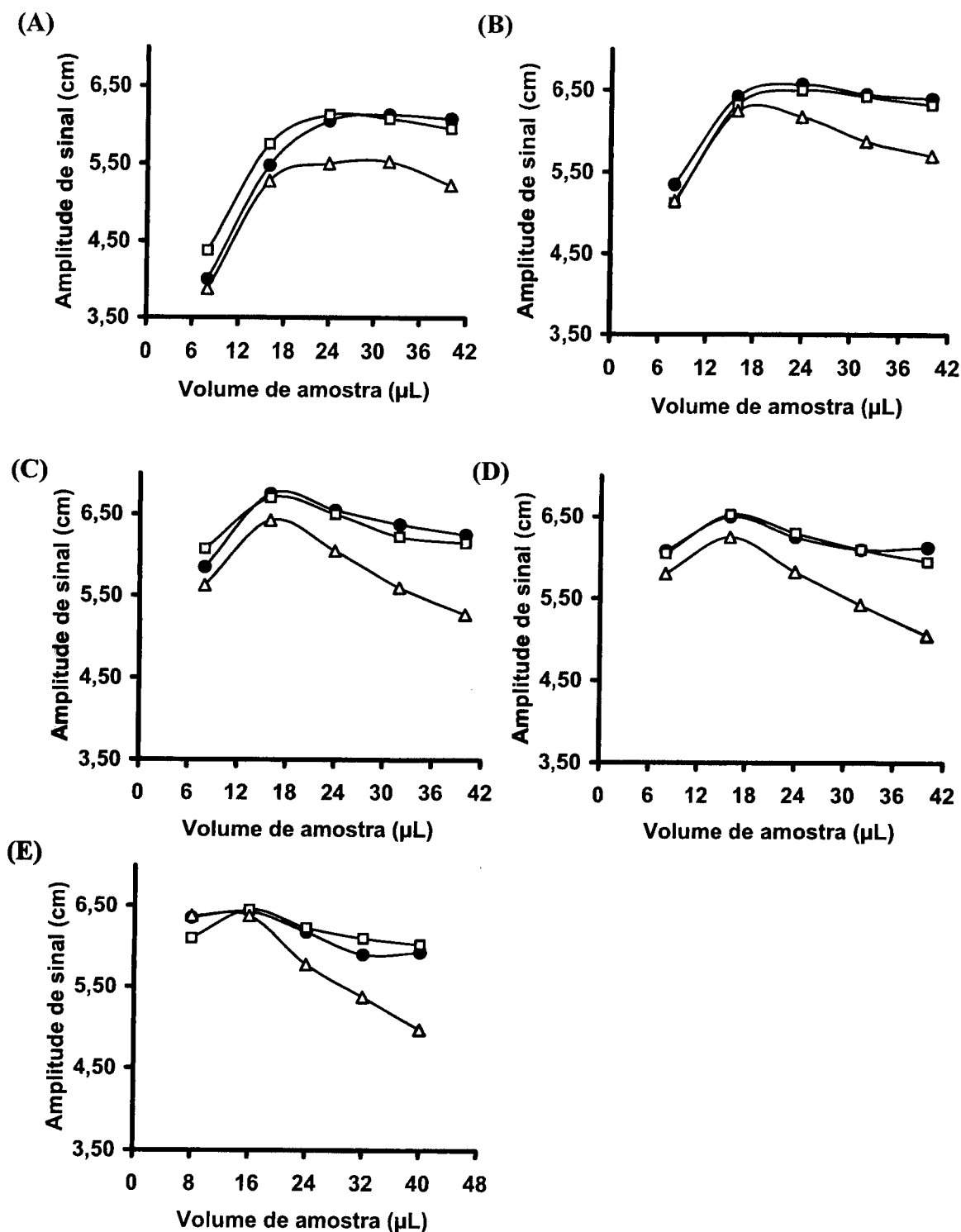


Figura 5.14

Avaliação da influência no sinal analítico do caudal, em função do volume de amostragem. (A) – tempo de repouso 0,1 s; (B) – tempo de repouso 0,25 s; (C) – tempo de repouso 0,5 s; (D) – tempo de repouso 0,75 s; (E) – tempo de repouso 1 s. ● – amostragem binária; □ – confluência de zonas; Δ – volumes únicos.

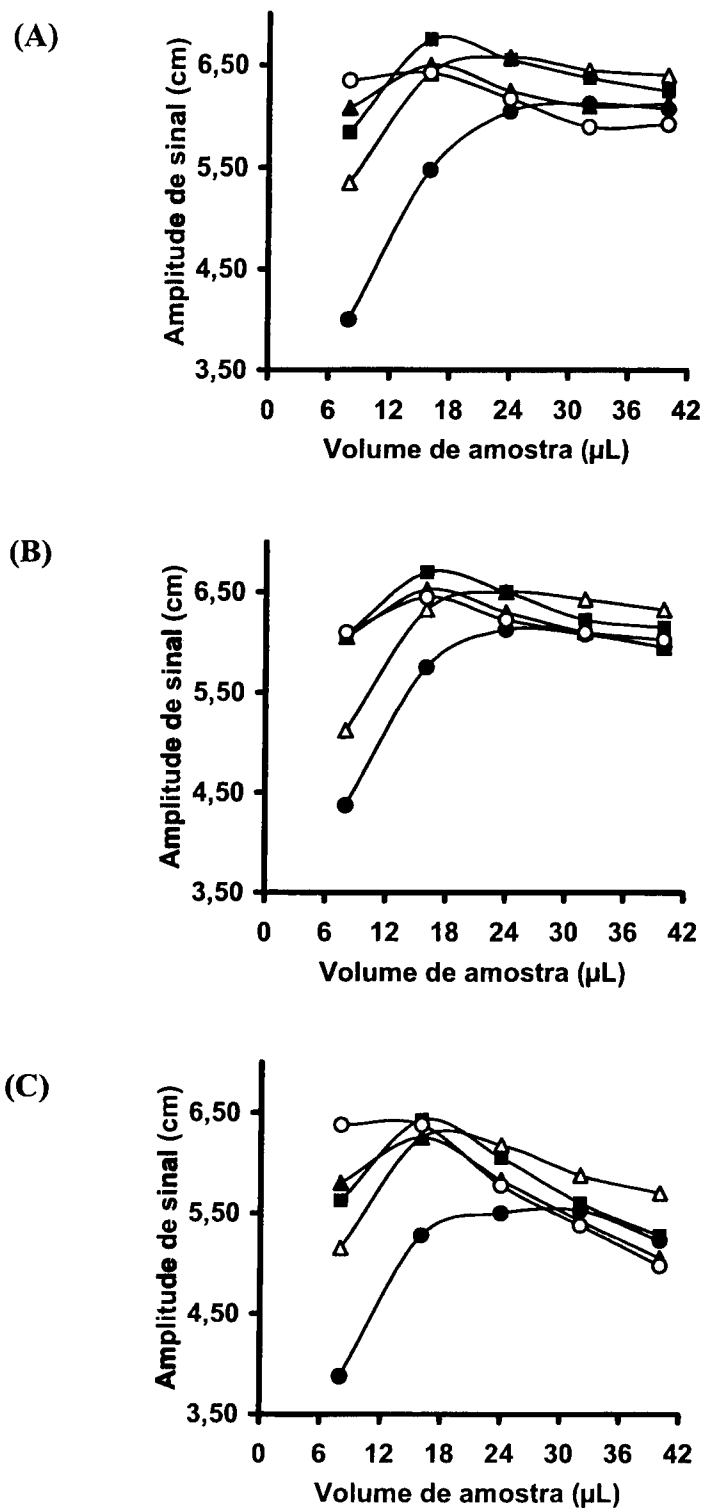


Figura 5.15

Avaliação da influência no sinal analítico do caudal, em função do volume de amostra. (A) – amostragem binária; (B) – confluência de zonas; (C) – volumes únicos. ● – tempo de repouso 0,1 s; Δ – tempo de repouso 0,25 s; ■ – tempo de repouso 0,5 s; ▲ – tempo de repouso 0,75 s; ○ – tempo de repouso 1 s.

5.3.4. Concentração de NQS e pH

A avaliação da influência da concentração de NQS no sinal analítico foi realizada para um intervalo de concentrações entre $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos demonstraram claramente um aumento muito acentuado da resposta analítica de $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sendo que para concentrações superiores o sinal analítico diminuiu gradualmente (Figura 5.16). A diminuição do sinal registado deve-se ao facto de as soluções de NQS com concentrações gradualmente maiores apresentarem uma coloração também gradualmente maior, provocando também efeitos de absorção da radiação, e implicando em cada ensaio o ajuste do valor de branco no espectrofotómetro. Sendo assim, os valores registados correspondem às diferenças de valor entre a amplitude de sinal do branco e o valor de amplitude de sinal do produto da reacção. Considerando os valores apresentados no gráfico da Figura 5.16, foi seleccionada uma solução com concentração $1,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de NQS para as experiências seguintes.

Outro parâmetro químico que afectava o sinal analítico era o pH da solução tampão utilizada. Verificou-se que a cinética de reacção era favorecida em meio alcalino e que a solução tampão carbonato/hidrogenocarbonato a pH 10,2 originava os sinais analíticos mais elevados (Figura 5.17). Por esta razão, foi seleccionado este valor de pH da solução tampão para a realização das determinações seguintes.

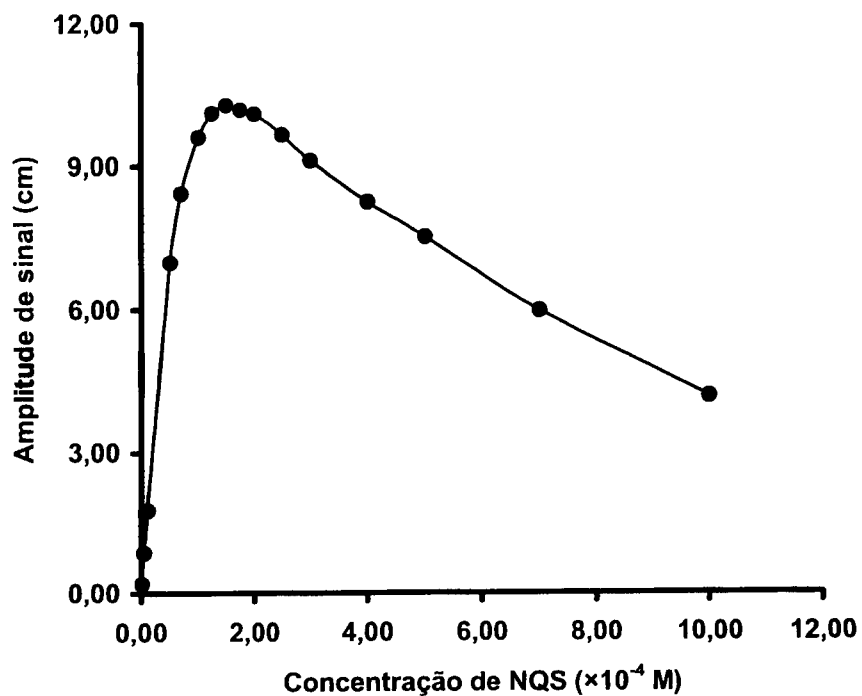


Figura 5.16

Avaliação da influência no sinal analítico de diferentes concentrações de solução de NQS.

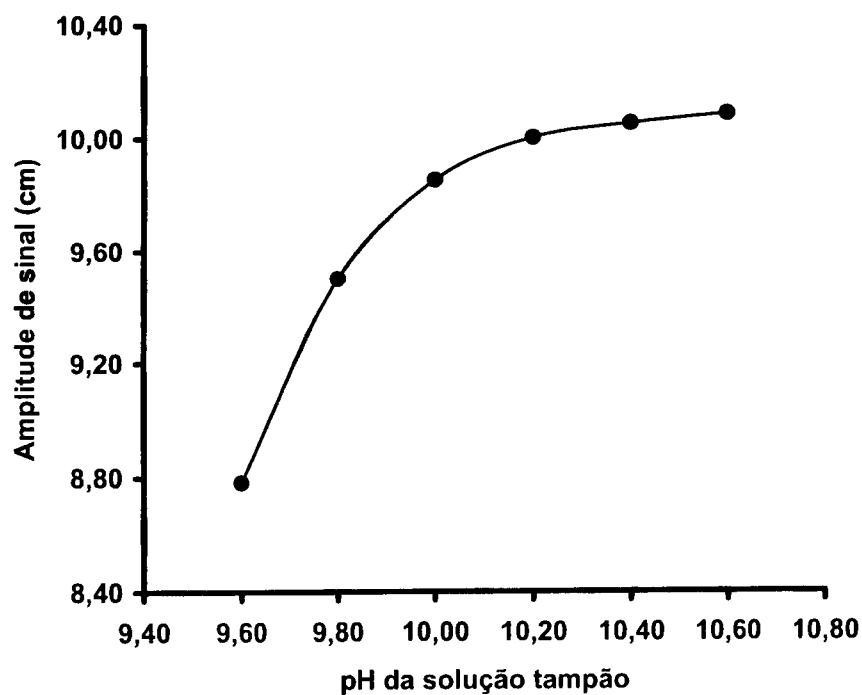


Figura 5.17

Avaliação da influência no sinal analítico de diferentes pH da solução tampão utilizada.

5.3.5. Análise de formulações farmacêuticas

Após os ensaios de otimização do sistema analítico, concluiu-se que a obtenção do maior valor de resposta analítica foi possível utilizando um caudal de 0,12 mL min⁻¹, através de um tempo de repouso entre passos de 0,5 s para uma bureta equipada com uma seringa de 2,5 mL (1 µL de volume de passo) e um volume de amostra de 16 µL (16 passos executados pela bureta automática responsável pela inserção de amostra), em combinação com a estratégia de amostragem binária para inserção das soluções de amostra.

Com a configuração da montagem analítica descrita anteriormente, obteve-se resposta linear para o intervalo de concentrações de isoniazida de 2,0 µg mL⁻¹ a 18,0 µg mL⁻¹. A curva analítica (Figura 5.18) foi representada por $A = 0,2933C - 0,1014$, em que A era a altura de pico (em cm) e C era a concentração de isoniazida expressa em µg mL⁻¹, com um coeficiente de correlação de 0,9980. Para 10 determinações consecutivas, o desvio padrão relativo foi inferior a 1,48%. A qualidade dos resultados fornecidos pelo sistema de fluxo foi avaliada na determinação de isoniazida em formulações farmacêuticas disponíveis para distribuição hospitalar (Isoniazida 300). Para uma quantidade declarada de 300 mg de isoniazida por comprimido, o resultado obtido após análise foi de 295 ± 4,4 mg, revelando um desvio relativo (em percentagem) de 0,68%, relativamente ao procedimento de referência.

A determinação de isoniazida em outras formulações, mas contendo a substância rifampicina não foi possível, porque a dissolução deste fármaco produziu uma solução de coloração alaranjada, interferindo deste modo na detecção no comprimento de onda 475 nm. No entanto, com os excipientes normalmente utilizados para produzir as formulações farmacêuticas comprimidos não se observou interferência, para a determinação de isoniazida.

O sistema analítico demonstrou um funcionamento estável, e não se observou desvio da linha de base durante o período de determinações analíticas. Esta montagem de fluxo foi capaz de efectuar 30 determinações por hora.

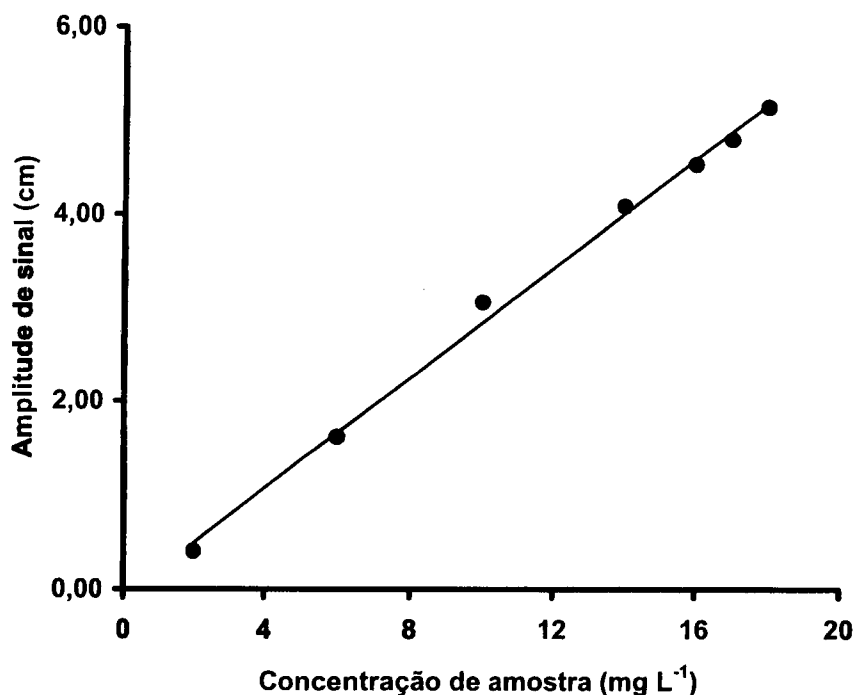


Figura 5.18

Curva de calibração obtida com soluções padrão de isoniazida com concentrações de 2,0 até 18,0 mg L⁻¹.

5.4. Conclusões

Os resultados obtidos confirmam que o conceito de fluxo pulsado pode ser facilmente implementado através da utilização de buretas automáticas. Embora estes dispositivos não produzam um fluxo pulsado em condições normais de

utilização, podem efectuar diferentes tarefas, incluindo simultaneamente a inserção individual de soluções de amostra e reagentes, a comutação de fluxo e propulsão das diferentes soluções, com uma excelente precisão, exactidão e versatilidade.

Adicionalmente, estes dispositivos são robustos e o seu controlo computadorizado assegura uma elevada versatilidade na manipulação de soluções possibilitando a implementação de diferentes estratégias para a inserção das soluções de amostra, como por exemplo a amostragem binária, confluência de zonas ou inserção de volumes únicos. Quando todas estas características são reunidas, é obtido com a utilização de buretas automáticas um sistema analítico de fluxo totalmente automatizado, e em que cada alíquota inserida de cada solução envolvida é controlada em termos de número, volume e frequência de pulso.

O facto de as seringas colocadas nas buretas serem susceptíveis de fácil substituição, possibilita a utilização de distintos volumes de passo, providenciando os meios para um excelente controlo do processo de mistura entre as soluções de amostra e reagente. A exploração dos volumes na ordem dos microlitros é também uma perspectiva muito interessante que pode ser facilmente implementada através da utilização de seringas de inferior capacidade conjuntamente com tubos de reduzido diâmetro interno e células de fluxo de baixo volume interno, levando deste modo a uma redução do consumo de amostra e reagentes.

O sistema de fluxo apresentado, que explora o conceito de fluxo pulsado, pode constituir uma alternativa para a miniaturização dos sistemas de fluxo contínuo. Esta suposição é suportada por duas evidências importantes: o uso de um inferior número de componentes para realizar o mesmo número de tarefas com semelhante desempenho analítico e a redução no consumo de soluções.

A metodologia desenvolvida quando comparada com o actual método de referência da Farmacopeia Portuguesa, demonstra claramente as vantagens em

executar determinações em formulações farmacêuticas por metodologias automáticas em fluxo. Neste trabalho, demonstrou-se o aumento da produtividade e a redução do tempo necessário para realizar uma determinação, face ao ritmo de amostragem obtido. Outro factor a considerar é a diminuição da intervenção humana, com consequências na redução dos erros de um procedimento analítico, como em titulações com detecção visual do ponto final que requerem habilidade do operador.

5.5. Referências bibliográficas

- 1 The Index Merck, Thirteenth Edition, 5204 (2001)
- 2 G. A. Brewer, *Anal. Profiles Drug Subst.*, 6, 183 (1977)
- 3 *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman's & Gilman's, 10th Ed., McGraw-Hill (2001)
- 4 K. Johnsson, D. S. King, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 5009 (1995)
- 5 <http://isi15.isiknowledge.com/portal.cgi>
- 6 J. T. Stewart, I. L. Honigberg, J. P. Btant, W. A. Murray, J. L. Webb, J. B. Smith, *J. Pharm. Sci.*, 65, 1536 (1976)
- 7 K. C. Jindal, R. S. Chaudhary, A. K. Singla, S. S. Gangwal, S. Khanna, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12, 493 (1994)
- 8 R. N. Gupta. M. Lew, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 69, 441 (1988)
- 9 H. Kubo, T. Kinoshita, K. Matsumoto, T. Nishikawa, *Chromatographia*, 30, 69 (1990)
- 10 K. Mawatari, F. Linuma, M. Watanabe, *Anal. Sci.*, 6, 515 (1990)
- 11 A. Carlin, N. Gregory, J. Simmons, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17, 885 (1998)
- 12 A. P. Argekar, S. S. Kunjir, K. S. Purandare, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14, 1645 (1996)
- 13 V. Spinkova, *Pharm. Acta. Helv.*, 46, 643 (1971)
- 14 L. H. Welsh, *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, 40, 807 (1957)
- 15 E. L. Pratt, *Anal. Chem.*, 25, 814 (1953)
- 16 P. Nagaraja, K. C. Srinivasa Murthy, H. S. Yathirajan, *Talanta*, 43, 1075 (1996)

- 17 A. A. Abou-Ouf, A. M. Taha, M. B. Saidhom, *J. Pharm. Sci.*, 62, 1700 (1973)
 - 18 M. E. El-Kommos, A. S. Yanni, *Analyst*, 113, 1091 (1988)
 - 19 N. M. A. Mahfouz, K. M. Emara, *Talanta*, 40, 1023 (1993)
 - 20 H. S. I. Tan, *J. Pharm. Sci.*, 62, 993 (1973)
 - 21 J. T. Stewart, D. A. Settle. *J. Pharm. Sci.*, 64, 1403 (1975)
 - 22 P. Nagaraja, K. Sunitha, R. Vasantha, H. Yathirajan, *Turk. J. Chem.*, 26, 743 (2002)
 - 23 D. S. Goldman, *Science*, 120, 315 (1954)
 - 24 K. K. Mahalanabis, D. Basu, B. Roy, *Analyst*, 114, 1311 (1989)
 - 25 J. Bartos, *Ann. Pharm. Fr.*, 29, 71 (1971)
 - 26 P. C. Ioannou, *Talanta*, 34, 857 (1987)
 - 27 M. Sarwar, A. Malik, U. A. Khan, *Anal. Lett.*, 22, 853 (1989)
 - 28 E. Kahane, O. Sackur, *Ann. Pharm. Fr.*, 11, 175 (1953)
 - 29 M. B. Devani, C. J. Shishoo, *J. Pharm. Sci.*, 59, 90 (1970)
 - 30 J. J. Vallon, C. Bichon, *Anal. Chim. Acta*, 78, 93 (1975)
 - 31 S. T. Sulaiman, Y. O. Hameed, *Anal. Chim. Acta*, 206, 379 (1988)
 - 32 V. J. Jennings, A. Dodson, A. Harrison, *Analyst*, 99, 145 (1974)
 - 33 A. M. Leal, M. A. Alves, *Ver. Port. Farm.*, 2, 175 (1952)
 - 34 C. A. Georgiou, M. A. Koupparis, T. P. Hadjiioannou, *Talanta*, 38, 689 (1991)
 - 35 J. A. Garcia-Bautista, J. V. Garcia-Mateo, L. Martinez-Calatayud, *Anal. Lett.*, 31, 1209 (1998)
 - 36 S. A. Halvatzis, M. M. Thimotheou-Potamia, A. C. Calokerinos, *Analyst*, 115, 1229 (1990)
 - 37 A. Safani, M. A. Karimi, M. R. H. Nezhad, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 1499 (2003)
-

- 38 D. D. Perrin, B. Dempsey, "Buffers for pH and Metal Ion Control", London (1979)
- 39 S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, A. A. S. C. Machado, J. L. F. C. Lima, J. M. Paulís, *Quím. Anal.*, 6, 278 (1987)
- 40 Farmacopeia Portuguesa VII, Ed. Oficial, Lisboa, 1342 (2002)
- 41 R. A. S. Lapa, J. L. F. V. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 466, 125 (2002)
- 42 J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, 2nd. Ed., Wiley, New York (1988)
- 43 J. Ruzicka, G. D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, 237, 329 (1990)
- 44 B. F. Reis, M. F. Giné, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. S. Lapa, *Anal. Chim. Acta*, 293, 129 (1994)
- 45 H. Pasekova, M. Polasek, J. F. Cigarro, J. Dolejsova, *Anal. Chim. Acta*, 438, 165 (2001)
- 46 J. L. F. C. Lima, J. A. V. Prior, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 467, 75 (2002)
- 47 A. C. B. Dias, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 499, 107 (2003)
- 48 M. Valcarcel, M. D. Luque de Castro, *Flow Injection Analysis: Principles and Applications*, Ellis Horwood, Chichester (1987)

CAPÍTULO

6

DETERMINAÇÃO DA PIRAZINAMIDA POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA NUM SISTEMA DE FLUXO COM MULTI- IMPULSÃO

A pirazinamida é um fármaco utilizado no tratamento da tuberculose. Neste capítulo é descrito o desenvolvimento de uma metodologia analítica baseada na implementação de um sistema de fluxo com multi-impulsão, acoplado a um sistema de detecção por quimioluminescência, para a determinação de pirazinamida em formulações farmacêuticas. Na metodologia desenvolvida obtiveram-se dois intervalos de resposta linear para concentrações de pirazinamida, unicamente através de alterações nas instruções introduzidas no programa de controlo do sistema, e portanto, sem necessidade de efectuar alterações na configuração física da montagem de fluxo.

6.1. Introdução

A Pirazinamida (Figura 6.1), ou pirazina-2-carboxamida, é uma droga de primeira escolha para o tratamento da tuberculose, uma doença extremamente infecciosa provocada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e uma das doenças com maior grau de contágio e morte a nível mundial [1].

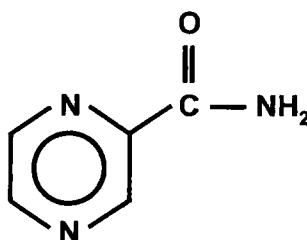


Figura 6.1

Estrutura química da pirazinamida.

O fármaco pirazinamida é um pó branco, ligeiramente solúvel na água, pouco solúvel no álcool e no cloreto de metileno e muito pouco solúvel no éter [2].

Actualmente, a saúde mundial depara-se com o problema do aumento gradual da resistência da tuberculose ao tratamento com os antibióticos utilizados. Este facto tem adquirido tais dimensões que a Organização Mundial de Saúde recomenda um tratamento de duração de seis meses envolvendo uma terapia de associação, isto é, a aplicação de diversos antibióticos, como por exemplo, rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, administrados em associação nos dois primeiros meses, seguido nos restantes quatro meses de uma terapia com rifampicina e pirazinamida. A pirazinamida é uma droga muito importante no

tratamento da tuberculose porque contribui para diminuir o tempo de duração do tratamento quimioterápico aplicado actualmente [1].

A descoberta dos efeitos de actividade da pirazinamida no tratamento da tuberculose teve início em 1945, quando Chorine descobriu que a nicotinamida (vitamina B3) tinha actividade inibitória sobre a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* [3]. Este facto também foi verificado em 1948, por McKenzie *et. al.*, nos Laboratórios “Lederle” de “American Cyanamid” [4]. Nestes laboratórios prosseguiram estudos, conjuntamente com os laboratórios Merck, onde descobriram que a pirazinamida era um análogo sintético da nicotinamida, que se mostrou mais activo num estudo da tuberculose efectuada em roedores. É importante referir que os estudos dos análogos da nicotinamida conduziram à descoberta de outros potentes fármacos para o tratamento da tuberculose, nomeadamente, a isoniazida [5] e a etionamida [6].

Posteriormente, a descoberta da eficácia da pirazinamida no tratamento da tuberculose, originou estudos mais específicos das suas propriedades, nos laboratórios “Walsh McDermott” na Universidade de Cornell. Na procura das condições de actuação eficaz da pirazinamida, descobriu-se que o fármaco é activo contra a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* apenas em meio com pH ácido, aproximadamente 5,5 [7], situação que pode ocorrer durante a inflamação activa devido à produção de ácido láctico pelas células inflamatórias. O mesmo grupo de investigação também demonstrou pela primeira vez que a pirazinamida é um pró-fármaco, cuja actividade depende da sua conversão a ácido pirazinóico por uma enzima da bactéria infecciosa [8].

Estudos recentes [9-11] apontam para que o mecanismo de actuação da pirazinamida é por entrada do fármaco na bactéria causadora da tuberculose, através de um processo de difusão passiva, onde é convertida a ácido pirazinóico pela enzima pirazinamidase, e o produto é excretado por difusão passiva. Se o pH extracelular é ácido (pH = 5,5), o ácido pirazinóico na sua forma protonada, é

reabsorvido pela bactéria facilmente através da membrana. O influxo do ácido pirazinóico é aparentemente mais forte que o deficiente efluxo, provocando uma acumulação do ácido nas bactérias. A forma protonada do ácido dentro das células origina um aumento de prótons, que eventualmente provocam a acidificação citoplasmática, com a consequente inibição de enzimas vitais [12]. Uma das enzimas afectadas parece ser a enzima responsável pela síntese dos ácidos gordos da membrana das bactérias, e portanto, envolvida na biosíntese de ácidos micólicos [1].

A pirazinamida é prontamente absorvida no tracto gastrointestinal, e é distribuída globalmente pelo corpo, incluindo o sistema nervoso central, pulmões e fígado. A administração oral de 500 mg origina concentrações plasmáticas de aproximadamente 9 a 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ao fim de duas horas, e 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ao fim de oito horas. O tempo de semi-vida plasmático é de 9 a 10 horas em pacientes com função renal normal. O fármaco é excretado principalmente por filtração renal e o maior produto de excreção é o ácido 5-hidroxipirazinóico, através de uma reacção de hidroxilação [1].

A pirazinamida está disponível para administração oral na forma de comprimidos. A dose oral diária para adultos é 15 a 30 mg Kg^{-1} , administrados numa única dose. A dose máxima que pode ser administrada é 2 g por dia, independentemente do peso do indivíduo. Também se verificou actividade eficaz do fármaco quando administrado duas ou três vezes por semana, mas em doses superiores às mencionada anteriormente.

No entanto, a pirazinamida apresenta efeitos laterais [1], dos quais os danos hepáticos são os mais graves. Quando uma dose de 40 a 50 mg Kg^{-1} é administrada oralmente, surgem sinais e sintomas de doença hepática em cerca de 15 % dos pacientes, e em que 2 a 3% apresentam icterícia e em casos raros a morte devido à necrose hepática. Mas, em primeiro lugar verifica-se um aumento das concentrações plasmáticas de aminotransferases, causado pelo fármaco. Todos

os pacientes que são tratados com a pirazinamida devem ser submetidos a estudos da função hepática antes de ser administrada a droga, e estes estudos devem ser repetidos com frequência durante o período de tratamento com pirazinamida. Nos indivíduos em que se verifique insuficiência hepática, de qualquer grau, a terapia com pirazinamida deve ser evitada, a não ser que não exista alternativa. Nas situações de terapia com pirazinamida e em que surjam evidências significativas de danos hepáticos, a terapia deve ser interrompida imediatamente.

A pirazinamida inibe a excreção de urato, resultando em hiperuricemia em praticamente todos os pacientes. Outros efeitos verificados com a administração de pirazinamida foram artralgias, anorexia, náuseas e vômitos, disúria, desconforto, indisposição e febre.

A utilização cada vez mais frequente da pirazinamida como droga de tratamento da tuberculose a nível mundial, assim como, o aumento do número de trabalhos de investigação científica das suas propriedades terapêuticas, impulsionou o desenvolvimento de diversas metodologias analíticas para a sua determinação.

Diversas técnicas foram desenvolvidas e aplicadas na determinação da pirazinamida em formulações farmacêuticas e também em amostras biológicas.

Encontra-se referido na literatura diversas metodologias cromatográficas, das quais se destacam cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC) com detecção por espectrofotometria na região do ultravioleta [13-24], HPLC acoplada a um detector de massa [25], cromatografia líquida com detecção por espectrofotometria na região do ultravioleta [26-30], cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa [31] e cromatografia capilar acoplada a detecção por espectrofotometria na região do ultravioleta [32].

Na área dos métodos electroquímicos também foram realizados trabalhos, nomeadamente, usando a voltametria [33,34].

Foram também usadas metodologias com detecção colorimétrica na região do

visível para a determinação de pirazinamida, recorrendo a diversas reacções de desenvolvimento de cor [35,36].

Metodologias envolvendo análises multivariadas com detecção na região do ultravioleta foram igualmente utilizadas para a determinação de pirazinamida em formulações farmacêuticas [37-39]

Contudo, a determinação da pirazinamida em formulações farmacêuticas através de uma metodologia em fluxo nunca foi efectuada. A análise em fluxo revelou-se como uma técnica de análise química que se adapta constantemente aos avanços tecnológicos, fornecendo diferentes alternativas automatizadas, mais simples, rápidas e miniaturizadas, para efectuar determinações químicas.

De igual modo, a automatização dos processos analíticos para o controlo das preparações farmacêuticas é cada vez mais uma prioridade, cujos objectivos envolvem, por exemplo, o aumento dos ritmos de amostragem, uma elevada versatilidade nas determinações que um sistema efectua, e a maximização do desempenho do equipamento analítico, tanto em qualidade dos resultados como em custos de operação.

Neste contexto, a análise em fluxo com multi-impulsão é uma alternativa para a automatização dos processos de controlo farmacêutico em medicamentos.

A multi-impulsão é uma metodologia de análise em fluxo proposta recentemente, que combina a versatilidade e facilidade de controlo conferidas pela automatização, com o elevado controlo na manipulação das soluções no interior das montagens analíticas, e também, com as características de fluxo pulsado que assegura uma rápida homogeneização da zona de reacção. De facto, o fluxo pulsado torna a metodologia de multi-impulsão numa ferramenta muito atractiva para a implementação de medições por quimioluminescência, porque este método de detecção é normalmente gerado por reacções muito rápidas, e em que os fenómenos de emissão de luz podem ser detectados unicamente quando a reacção química é iniciada numa zona muito próxima do detector de luz, implicando deste

modo, a necessidade de uma mistura amostra e reagente muito rápida e eficiente, e que ocorra preferencialmente dentro da célula de medida.

A emissão de luz com origem numa reacção de quimioluminescência é normalmente iniciada logo que os reagentes se misturem. Portanto, a intensidade de emissão de luz é dependente do tempo de desenvolvimento de reacção conforme ocorre a formação dos intermediários excitados ou produtos da reacção.

Numa análise em fluxo, devido à elevada velocidade com que pode ocorrer a emissão de luz derivada de uma reacção de quimioluminescência, quando é registado o máximo de intensidade de emissão de luz, correspondente à altura máxima do sinal analítico, a reacção de quimioluminescência pode não estar completa nem, muito provavelmente, se completou a mistura das soluções envolvidas. Neste sentido é importante que o sistema de fluxo forneça óptimas condições de mistura das soluções, e que essa mistura se realize o mais possível no interior da célula de fluxo, de modo a maximizar a emissão de luz e a sua detecção.

Por isso, quando se realiza uma análise em fluxo com detecção por quimioluminescência, as soluções de amostra e de reagentes devem entrar na célula de medição assim que a emissão de luz atinja valores próximos dos correspondentes à intensidade máxima, permanecendo entretanto dentro da célula, e sair apenas quando o sinal está a diminuir [40].

Neste trabalho, foi desenvolvida uma metodologia para determinação de pirazinamida em formulações farmacêuticas, por intermédio de um sistema de análise em fluxo baseado no conceito de multi-impulsão e acoplado a um sistema de detecção de quimioluminescência. A origem da emissão de luz foi uma reacção de quimioluminescência muito utilizada, que consiste na oxidação de luminol por peróxido de hidrogénio, catalisada por catião cobre (II).

A quimioluminescência do luminol foi relatada pela primeira vez em 1928, por Albrecht [41]. Como já referido, a reacção de quimioluminescência utilizada neste

trabalho envolve a oxidação de luminol, normalmente por acção do peróxido de hidrogénio, e ocorre na presença de um catalizador, como por exemplo, o catião cobre (II) (Figura 6.2).

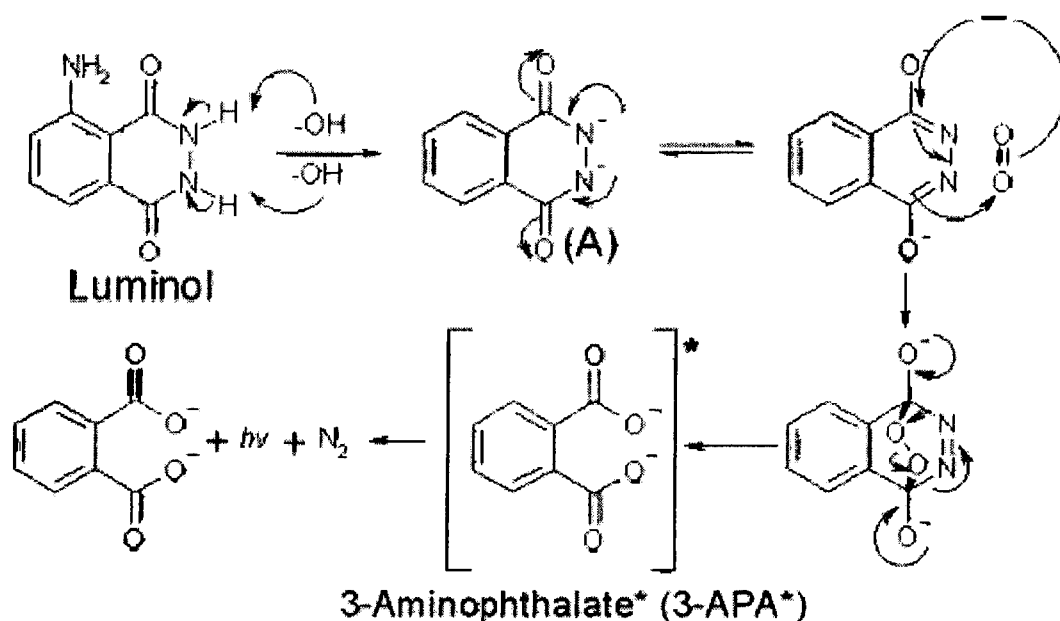


Figura 6.2

Reacção de oxidação do luminol, para produzir luz. Adaptado de [42].

White *et. al.* [43,44] demonstraram que a emissão de luz a partir da oxidação do luminol é devida à formação de um ião negativo do luminol, que reage com oxigénio ou um reagente oxidante alternativo, para originar um estado excitado do ião aminoftalato, e que é responsável pela emissão de luz.

Devido à estrutura química da pirazinamida, esta forma complexos estáveis com o catião cobre (II), tendo sido esta propriedade explorada neste trabalho, para inibir a actividade catalítica do catião cobre (II) na reacção de oxidação do luminol pelo

peróxido de hidrogénio. Consequentemente, a intensidade de luz gerada foi relacionada com a concentração da pirazinamida nas amostras de formulações farmacêuticas.

6.2 Parte Experimental

6.2.1 Reagentes

Foi preparada diariamente uma solução com uma concentração de 500 mg L^{-1} de pirazinamida através da dissolução de 50,0 mg da substância sólida em 100 mL de água bidesionizada. A partir desta solução foram preparadas as soluções padrão utilizadas para a elaboração das curvas de calibração, por diluição com água bidesionizada.

A solução de catião cobre (II) com uma concentração de 50 mg L^{-1} foi preparada através da pesagem de 13,41 mg de cloreto de cobre dihidratado, e dissolução em 100 mL numa solução $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico. Através desta solução preparou-se outra solução de catião cobre (II) com concentração de 4 mg L^{-1} em catião cobre (II), utilizada nas determinações analíticas, por diluição com a solução $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico.

Uma solução de concentração $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em luminol foi preparada através da pesagem de 182,64 mg de luminol 97% w/w, e dissolução em 100 mL de solução de hidróxido de sódio com concentração de $1,75 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução serviu para preparar outra solução de luminol utilizada para as determinações, com uma concentração de $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, por diluição com solução de hidróxido de sódio com concentração $1,75 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Uma solução $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogénio foi preparada diariamente através da diluição de 256 μL de peridrol, em 1000 mL de água bidesionizada.

6.2.2 Equipamento

Todas as medições foram efectuadas com um detector de quimioluminescência construído no laboratório, cuja construção própria foi realizada do modo a adaptar o detector para análises em fluxo. Para este propósito, utilizou-se um fotomultiplicador da marca Hamamatsu, modelo Fotosensor H5784-04, e também uma célula de fluxo com volume interno de 40 μL construída para ser colocada junto ao sensor de luz (Figura 6.3). A célula de fluxo esquematizada, colocada junto à superfície de detecção do fotomultiplicador, possibilita maximizar a intensidade de luz captada.

O volume interno da célula de medição influencia os tempos de passagem e de residência das soluções no seu interior, além da influência que exerce na mistura das soluções, e por isso, este parâmetro deve ser alvo de algumas considerações.

A aplicação de um sistema de análise em fluxo baseado no conceito de multi-impulsão pode permitir compatibilizar vantagens com a utilização de uma célula de fluxo de baixo volume, porque possibilita uma melhor optimização do sinal analítico registado [45], com baixa dispersão, devido ao mais eficiente processo de mistura das soluções no interior dos tubos de fluxo, em virtude do característico fluxo pulsado que origina um movimento caótico das soluções durante o transporte para o sistema de detecção, como já foi referido anteriormente. Deste facto, resulta uma menor necessidade da presença de reactores (ou, a sua existência com pequenas dimensões) na montagem analítica, o

que possibilita a introdução quase directa das soluções na célula de fluxo, e a sua mistura quase instantânea, também na célula de fluxo.

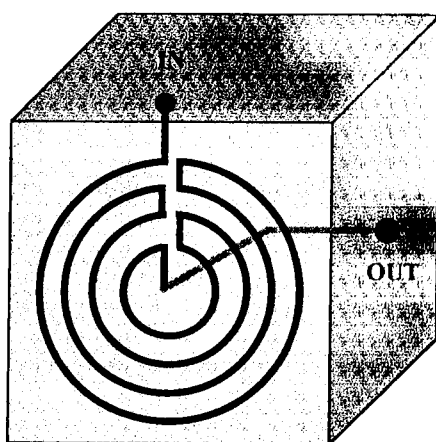


Figura 6.3
Esquema da célula de fluxo.

Sendo assim, com a utilização do conceito de multi-impulsão numa análise em fluxo com detecção por quimioluminescência, o que garante um incremento na mistura das soluções, a célula de fluxo pode ter um volume interno pequeno, como 40 μL , reduzindo assim a influência do volume da célula de fluxo na amplitude de sinal analítico, permitindo evitar a utilização de células com volumes internos grandes que originavam mais dispersão das soluções.

Ainda no contexto da influência do volume da célula de fluxo, é importante referir que a metodologia de multi-impulsão permite o controlo automático por computador dos caudais gerados por cada micro-bomba, o que por sua vez possibilita o controlo do tempo de residência da zona de reacção na célula de fluxo. Tal controlo simplificado providencia uma certa adaptabilidade dos tempos de desenvolvimento da reacção química utilizada às dimensões internas da célula

de fluxo disponível, e deste modo, à redução da influência do volume da célula de fluxo na amplitude de sinal analítico obtido, uma vez mais.

A montagem de fluxo envolveu a utilização de 4 micro-bombas da marca Biochem Valve Inc. (USA), modelo 090SP, com capacidade para debitar, por pulso, volumes de cerca de 8 μ L.

O controlo das micro-bombas foi realizado através de um microcomputador com um microprocessador Pentium, pelo envio de sinais TTL por intermédio de uma placa de interfaceamento e de aquisição e controlo de sinais da marca Advantech, modelo PCL-818L, para uma outra placa da marca NResearch Inc. (USA), modelo CoolDriveTM, sendo esta última um circuito de alimentação das micro-bombas.

Todo o sistema foi controlado através do microcomputador, por intermédio de um programa desenvolvido em linguagem BASIC (Microsoft).

Os tubos de fluxo e os reactores eram em PTFE, da marca Omnifit, e com diâmetro interno de 0,8 mm. Também foram utilizados adaptadores construídos no laboratório, conectores e confluências [46].

6.2.3 Montagem de fluxo

A configuração física da montagem analítica desenvolvida neste trabalho foi concebida com o objectivo de possibilitar uma fácil manipulação de cada solução envolvida na reacção, tendo em especial atenção, a importância da reacção da amostra com o catião cobre (II). Na Figura 6.4 encontra-se representada a montagem analítica utilizada para a determinação de pirazinamida.

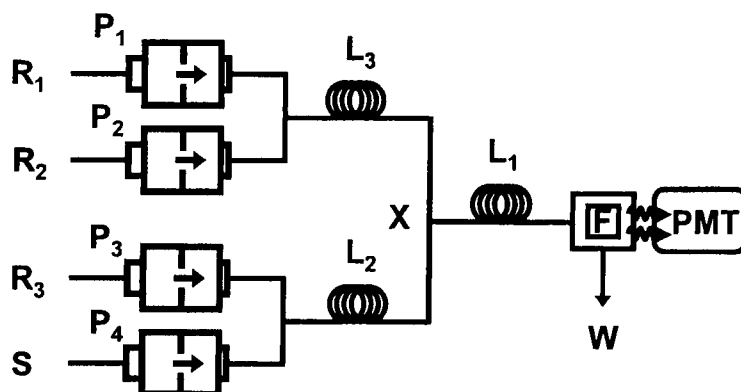


Figura 6.4

Diagrama do sistema de fluxo para a determinação de pirazinamida. P_1 a P_4 – micro-bombas de $8\ \mu\text{L}$; L_1 , L_2 , L_3 – reactivos de 15 cm, 25 cm e 25 cm, respectivamente; X – ponto de confluência; F – célula de fluxo; PMT – fotomultiplicador; R_1 – solução de luminol; R_2 – solução de peróxido de hidrogénio; R_3 – solução de catião cobre (II); S – solução de amostra (pirazinamida); W – resíduos.

No esquema da Figura 6.4, P_1 a P_4 representam quatro micro-bombas de volume interno de $8\ \mu\text{L}$, sendo cada uma responsável pela inserção e impulsão de cada uma das soluções envolvidas na determinação de pirazinamida em formulações farmacêuticas.

O número de reagentes, e consequentemente, o número de soluções, que se reflecte num determinado número de micro-bombas utilizadas (cada solução é impulsionada por uma micro-bomba diferente) é um aspecto muito importante a considerar aquando da montagem de um sistema de fluxo. Num sistema que envolve muitas soluções, e em que a reacção de quimioluminescência é de desenvolvimento rápido, a amostra deve ser introduzida num fluxo em separado e misturada posteriormente com o reagente de quimioluminescência próximo da região de entrada para a célula de fluxo, junto ao detector. Paralelamente, outros reagentes que desencadeiem o início da reacção também devem ser misturados

apenas nas proximidades da célula de fluxo. Esta imposição conferida pela quimioluminescência evidencia claramente a necessidade de se possuir um controlo individualizado e versátil sobre o transporte de cada solução interveniente num sistema de fluxo, o que influencia directamente a extensão da mistura das soluções em fluxo.

Quando se executa a activação de uma micro-bomba, ocorre a aspiração de um determinado volume de solução, e quando a micro-bomba é desactivada, essa alíquota de solução é impelida para o sistema. O volume de solução envolvido na aspiração e impulsão depende do volume interno da micro-bomba, determinado por fabrico na origem, como já referido no Capítulo 2.

Em concordância com recomendações providenciadas pelo fabricante, o tempo durante o qual o solenóide das micro-bombas deve ser activado foi definido por um valor constante de 150 ms, no programa de controlo do sistema. Esse tempo é assim definido como sendo o suficiente para que as micro-bombas aspirem os volumes de solução para os quais foram desenhadas.

Por outro lado, o tempo decorrente entre activações dos solenóides, e portanto correspondente ao período de tempo em que o solenóide estava desactivado, é correspondente a um tempo de pulso. Este tempo de pulso, também denominado de tempo de pulso, por corresponder ao intervalo de tempo entre a execução de pulsos pelas micro-bombas, define o parâmetro frequência de pulso, termo esse referido na literatura relativa aos sistemas de fluxo baseados no conceito de multi-impulsão [45].

Por motivos de simplificação, os tempos definidos no programa de controlo e referidos ao longo deste capítulo são os correspondentes ao tempo de pulso (frequência de pulso).

Deste modo, o caudal no sistema de fluxo foi definido pela programação do tempo decorrente entre activações dos solenóides (tempo de pulso), e também pelo número de micro-bombas activadas simultaneamente e que debitavam volumes

para um mesmo ponto de confluência. Adicionalmente, e porque cada micro-bomba é independente das restantes, podia ser definido um caudal diferente para cada unidade de inserção e propulsão, originando, deste modo, diferentes razões entre as quantidades de reagentes no interior do sistema.

A versatilidade e facilidade de automatização e controlo das micro-bombas, que são responsáveis pela inserção de soluções no sistema, possibilitaram o total controlo da manipulação dos volumes de amostra e reagente introduzidos no sistema, do caudal, do tempo de amostragem e da estratégia de amostragem.

A montagem analítica desenvolvida consistiu em duas sub-estruturas: uma responsável pela inserção e mistura da solução de luminol e solução de peróxido de hidrogénio, e outra responsável pela inserção e mistura da solução de amostra e solução de catião cobre (II).

As micro-bombas P_1 e P_2 foram responsáveis pela inserção de luminol e peróxido de hidrogénio, respectivamente, e o reactor L_3 possibilitava a mistura adicional destas soluções, já promovida essencialmente pelo fluxo pulsado característico destes sistemas. Estas soluções constituíam a linha de base. Como não era adicionada a solução de catião cobre (II), que funciona como catalisador da reacção de oxidação do luminol, não ocorria um desenvolvimento da reacção com significativa extensão, e portanto, a sensibilidade de detecção era baixa.

A activação das micro-bombas P_3 e P_4 originava a inserção no sistema das soluções de amostra e de catião cobre (II), através de uma estratégia de amostragem predefinida. O reactor L_2 possibilitava a uniformização da mistura promovida pelo movimento caótico das soluções causado pelo fluxo pulsado, das soluções de amostra e de catião cobre (II), e deste modo, permitiu otimizar a mistura das quatro soluções utilizadas na reacção de determinação da pirazinamida.

A reacção de emissão de luz tinha o seu início no ponto de confluência X da

Figura 6.4, e foi otimizada pelo reactor L_1 durante o transporte da zona de reacção.

O procedimento utilizado neste trabalho possibilitou um registo analítico sob a forma de picos, cuja altura foi relacionada directamente com a concentração de pirazinamida. Cada pico correspondia ao sinal analítico gerado pela reacção de quimioluminescência, e influenciado pelo efeito inibidor da pirazinamida, cuja altura dependia das suas concentrações. A introdução no sistema de soluções de pirazinamida com concentrações gradualmente maiores originou respostas analíticas gradualmente menores.

O perfil do registo assim obtido deve-se ao procedimento utilizado para a obtenção da linha de base. Como já foi referido, esta era constituída unicamente por solução de luminol e solução de peróxido de hidrogénio, e por isso, não sucedia a detecção de luz durante o registo da linha de base. O procedimento adoptado possibilitou realizar a mistura da solução de amostra com a solução de catião cobre (II) com mais extensão, previamente ao desenvolvimento da reacção de detecção. A alternativa seria promover constantemente a emissão de luz através da introdução no sistema das soluções de luminol, peróxido de hidrogénio e catião cobre (II), constituindo este procedimento a linha de base, e após a introdução de soluções de pirazinamida com diferentes concentrações, observar no registo as variações de sinal, que consistiriam em diminuições da emissão de luz. O registo analítico corresponderia portanto a picos invertidos.

6.2.4 Método de referência

Para avaliar a exactidão e a precisão da metodologia apresentada neste capítulo foi realizada a determinação de pirazinamida em formulações farmacêuticas, de

dispensa hospitalar (Pramide[®], 500 mg de pirazinamida por comprimido), de acordo com o método de referência referido na Farmacopeia Portuguesa [47] por intermédio de uma titulação potenciométrica em meio não-aquoso.

As soluções de amostra das formulações sólidas foram preparadas através da selecção de uma toma, rigorosamente pesada, após a trituração de 5 comprimidos, correspondente a aproximadamente 100 mg de fármaco. A toma rigorosamente pesada foi dissolvida em 50 mL de ácido acético anidro, seguido de titulação potenciométrica em meio não-aquoso com solução 0,1 M de ácido perclórico.

A detecção do ponto final foi realizada por intermédio da observação da variação da diferença de potencial, entre dois eléctrodos, em função da quantidade de solução titulante adicionada.

6.3 Resultados e discussão

No caso particular de um sistema de fluxo acoplado a um sistema de detecção por quimioluminescência, a optimização, que envolve o ajuste de todos os parâmetros experimentais, é realizada para que o detector de luz capte o máximo possível de radiação enquanto a zona de reacção atravessa a célula de fluxo. Por isso, todos os parâmetros que influenciem a cinética de fluxo e a cinética da reacção química devem ser ajustados de modo a gerar o máximo de intensidade de emissão de luz dentro da célula.

Como já referido, as reacções de quimioluminescência requerem níveis baixos de dispersão, de modo a possibilitar elevadas sensibilidades de detecção. Deste modo, e porque a característica predominante é o intervalo de tempo decorrente desde a mistura dos reagentes e amostra até à produção do máximo de intensidade de luz, a optimização deve ser centralizada neste intervalo de tempo.

Num sistema de fluxo este intervalo de tempo depende dos caudais utilizados para cada fluxo de solução envolvida na determinação, e das dimensões dos tubos de transporte entre o ponto de mistura dos reagentes e a célula de fluxo. Consequentemente, a sensibilidade de detecção pode ser maximizada através do controlo destes parâmetros.

Além da influência dos caudais e das dimensões dos reactores na amplitude do sinal analítico, a alteração dos volumes inseridos das soluções de reagentes e da estratégia de amostragem utilizada, influencia também o tempo em que a passagem da zona de reacção pela célula de fluxo coincide com o máximo de intensidade de luz emitida. Adicionalmente, um estudo do efeito no sinal analítico das concentrações de cada reagente envolvido na reacção química forneceu dados para otimizar ainda mais a sensibilidade da detecção.

A influência dos parâmetros referidos foi investigada através da inserção no sistema representado na Figura 6.4 em triplicado de soluções padrão de pirazinamida e através da modificação dos parâmetros da Tabela 6.1.

Tabela 6.1

Esquema representativo dos parâmetros de configuração do programa de controlo do sistema. A definição dos parâmetros na tabela é apenas exemplificativa.

Etapa	Estado de Impulsão				Número de pulsos	Tempo de pulso (ms)
	P1	P2	P3	P4		
1	ON	ON	OFF	OFF	10	300
2	OFF	OFF	ON	ON	4	300
3	ON	ON	OFF	OFF	50	300
Etc.	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)

6.3.1 Optimização dos parâmetros químicos

A optimização dos parâmetros químicos que influenciavam o sinal de quimioluminescência foi realizada através de um método univariado, isto é, eram fixados todos os parâmetros envolvidos na determinação química com excepção do parâmetro a optimizar.

Assim, as condições químicas iniciais de trabalho foram definidas, tendo em consideração trabalhos realizados por outros autores que envolviam a reacção de quimioluminescência do luminol catalisada pelo catião cobre (II) [48, 49]. Deste modo, preparou-se uma solução $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogénio, uma solução 2 mg L^{-1} de catião cobre (II) em solução de ácido sulfúrico com concentração $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, uma solução de luminol com concentração $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio e uma solução 20 mg L^{-1} de pirazinamida.

Em relação à estrutura da montagem analítica, para os primeiros ensaios de optimização, os reactores L_1 e L_3 (Figura 6.4) representavam as ligações entre os componentes reduzidas ao mínimo que as condições físicas entre os componentes permitiam, enquanto o reactor L_2 tinha 30 cm de comprimento. Os parâmetros de configuração do programa de controlo das micro-bombas, foram fixados em 3 pulsos de amostra inseridos no sistema, o tempo de pulso das micro-bombas em 300 ms, e a estratégia adoptada inicialmente para a inserção de pulsos de amostra/cobre foi a inserção de volumes únicos.

A influência da concentração de luminol no sinal analítico foi estudada no intervalo de concentrações de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 6.5).

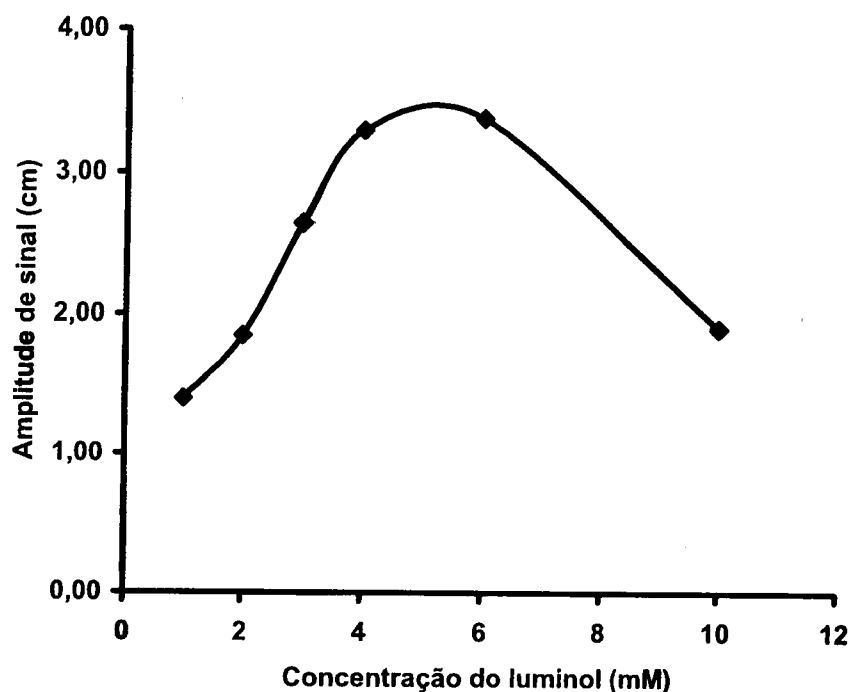


Figura 6.5

Influência no sinal analítico de diferentes concentrações de luminol, de 10^{-3} mol L⁻¹ a 10^{-2} mol L⁻¹.

Pela análise dos resultados obtidos, verifica-se um aumento acentuado do sinal analítico em função da concentração de luminol até cerca de 4×10^{-3} mol L⁻¹. A partir da concentração em luminol de 4×10^{-3} mol L⁻¹ observa-se que o sinal analítico estabilizou até sensivelmente uma concentração de 6×10^{-3} mol L⁻¹ e após este valor diminuiu a intensidade de sinal. Este comportamento deve-se a reacções paralelas, nomeadamente de auto-absorção de luz, em que o excesso de luminol existente no fluxo absorve a radiação de luz emitida pela reacção de quimioluminescência. A emissão de luz pela oxidação do luminol ocorre num comprimento de onda de aproximadamente 445 nm.

Como o máximo de intensidade de luz gerada pela reacção foi obtido para uma concentração de luminol de aproximadamente $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, este valor foi seleccionado para as posteriores determinações.

A concentração da solução de hidróxido de sódio utilizada na reacção de oxidação do luminol era importante para o desenvolvimento da reacção de quimioluminescência, ao influenciar o pH final em que se processava a reacção dentro da célula de fluxo após a mistura dos reagentes. Por isso, realizaram-se ensaios visando o estudo da influência no sinal analítico da concentração da solução de hidróxido de sódio utilizada para preparar a solução de luminol (Figura 6.6). Desses estudos verificou-se que entre concentrações de hidróxido de sódio de $1,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,75 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a intensidade de resposta aumentava, e que para valores de concentração superiores a $1,75 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ o sinal analítico diminuía. Além da influência directa da concentração de iões hidróxido na reacção de oxidação do luminol (Figura 6.2), o perfil do registo analítico obtido pode ser também devido à influência do pH na concentração de iões de cobre (II) em solução, dado a constante de solubilidade do hidróxido de cobre ser na ordem de 10^{-19} . Talvez por isso, se verifique a diminuição de sinal analítico para concentrações de hidróxido de sódio superiores a aproximadamente $1,75 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Assim, utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio com concentração $1,75 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para as posteriores determinações analíticas.

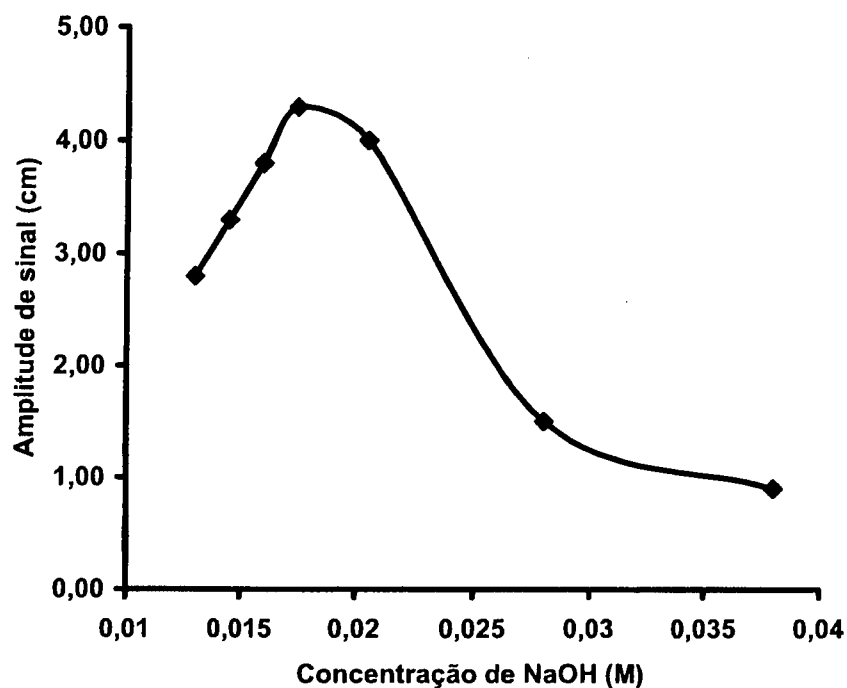


Figura 6.6

Influência no sinal analítico de diferentes concentrações de hidróxido de sódio entre $1,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,8 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Ainda no contexto da influência do pH na amplitude de sinal analítico obtido pela oxidação de luminol por peróxido de hidrogénio, ensaiaram-se diferentes concentrações de soluções de ácido sulfúrico, desde $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ até $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 6.7). A solução de ácido sulfúrico era utilizada para preparar as soluções de catião cobre (II).

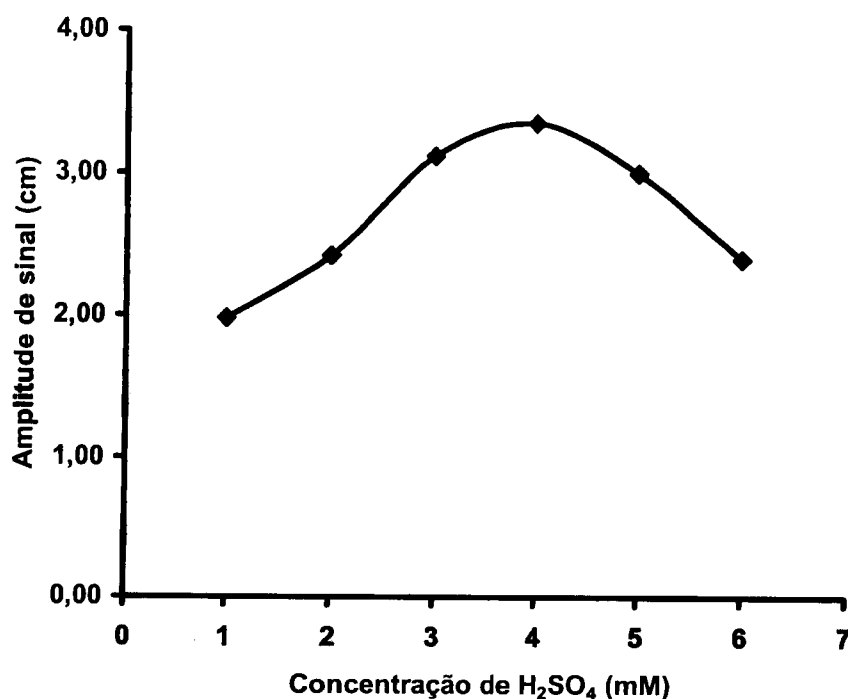


Figura 6.7

Influência no sinal analítico de diferentes concentrações de ácido sulfúrico entre $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Os resultados obtidos revelam que o máximo de intensidade de sinal analítico foi obtido quando se utilizou uma solução de ácido sulfúrico com concentração $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, visto que, para concentrações inferiores e superiores a $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ o sinal analítico gerado foi inferior. Tais resultados relacionam-se, como no ensaio anterior, com a influência positiva no sinal analítico pela presença de íons hidróxido para desencadear a oxidação do luminol e com a influência negativa pelo excesso de íons hidróxido que provocam um efeito de diminuição da concentração de catião cobre (II) livre em solução. Deste modo, a concentração da

solução de ácido sulfúrico seleccionada para as determinações seguintes foi $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Também se realizaram ensaios para estudar a influência no sinal analítico de diferentes concentrações da solução de peróxido de hidrogénio utilizada para a oxidação de luminol (Figura 6.8). As concentrações de peróxido de hidrogénio ensaiadas variavam entre $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

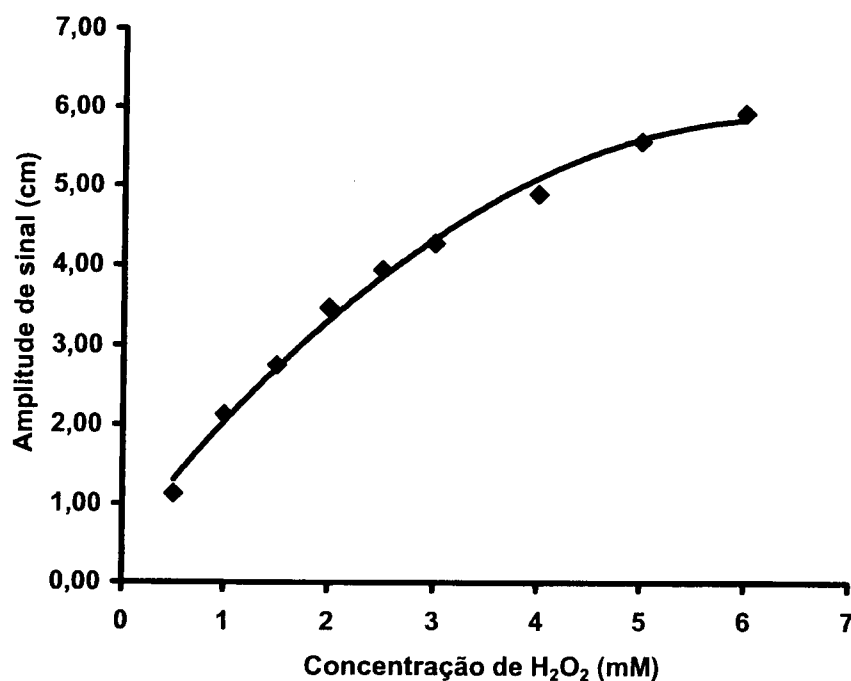


Figura 6.8

Influência no sinal analítico de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio entre $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Da observação dos resultados verifica-se que nesse intervalo de concentrações, a intensidade de sinal analítico aumenta sempre, mas no entanto, a variação de sinal

obtido para concentrações de peróxido de hidrogénio superiores a aproximadamente $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ não era tão acentuada como para as concentrações inferiores. Consequentemente, uma solução $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogénio foi utilizada para realizar as experiências seguintes.

Por último, foi verificada a influência no sinal analítico de diferentes concentrações de catião cobre (II) através do ensaio com soluções de catião cobre (II) com concentrações entre 1 mg L^{-1} e 19 mg L^{-1} (Figura 6.9).

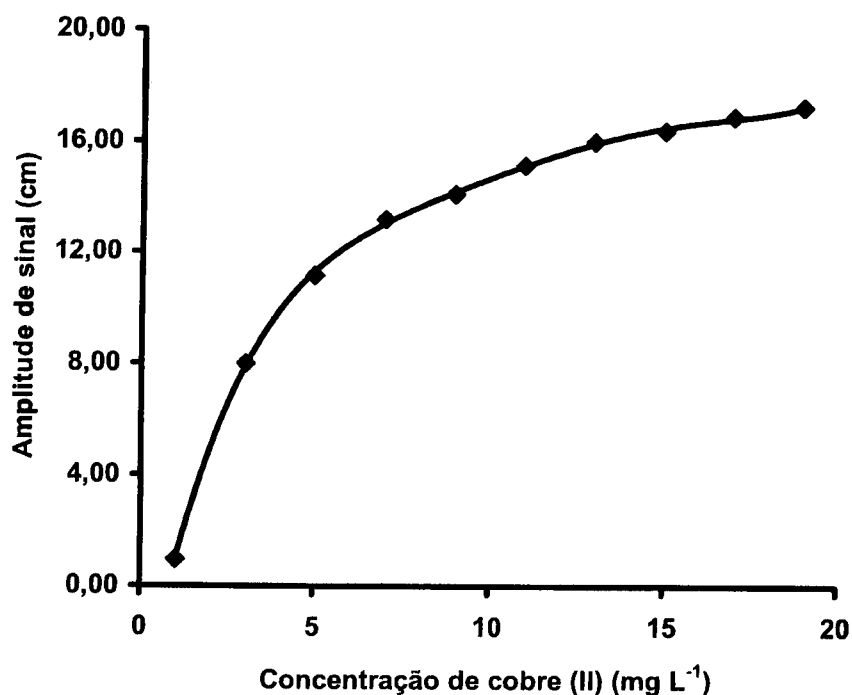


Figura 6.9

Influência no sinal analítico de diferentes concentrações de catião cobre (II) entre 1 mg L^{-1} e 19 mg L^{-1} .

Dos resultados obtidos verificou-se que até concentrações de 5 mg L^{-1} o sinal analítico aumentava, e que para concentrações superiores de catião cobre (II) a intensidade de sinal analítico obtida apresentava sinais de estabilização, pelo que para as posteriores determinações utilizou-se uma solução de catião cobre (II) com concentração 4 mg L^{-1} .

6.3.2 Optimização dos parâmetros do sistema de fluxo

Com vista a otimizar a intensidade de emissão de luz pela reacção de oxidação do luminol realizaram-se estudos da influência das dimensões dos reactores L_1 , L_2 e L_3 na amplitude de sinal analítico.

Teoricamente, o reactor L_1 tinha como função auxiliar a mistura dos reagentes e amostra promovida essencialmente pelo fluxo pulsado, imediatamente antes da detecção, influenciando deste modo, directamente a reacção de quimioluminescência, isto é, a oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogénio na presença do catião cobre (II).

Contudo, poderia pensar-se que a presença do reactor L_1 , colocado imediatamente antes da detecção, não se justificava, devido à eficiente mistura providenciada pelo movimento pulsado do fluxo, e porque a reacção de quimioluminescência utilizada neste trabalho é muito rápida, mas outros factores influenciavam a sua presença, como por exemplo, o caudal e a dispersão, que por sua vez dependem da estratégia de amostragem utilizada para a mistura das zonas de amostra/cobre com o fluxo de luminol/peróxido de hidrogénio (linha de base).

Sendo assim, realizou-se um estudo da influência que as dimensões do reactor L_1 exerciam na intensidade de luz detectada pelo fotomultiplicador (Figura 6.10). Dos dados obtidos verificou-se que um reactor L_1 de comprimento 15 cm

possibilitava a obtenção do mais elevado sinal analítico. Para outras dimensões do reactor L_1 , inferiores e superiores, verificou-se que o sinal analítico era menor que o obtido com 15 cm. Deste modo, fixou-se o valor de comprimento do reactor L_1 em 15 cm, e foi este comprimento de reactor o utilizado para os restantes ensaios.

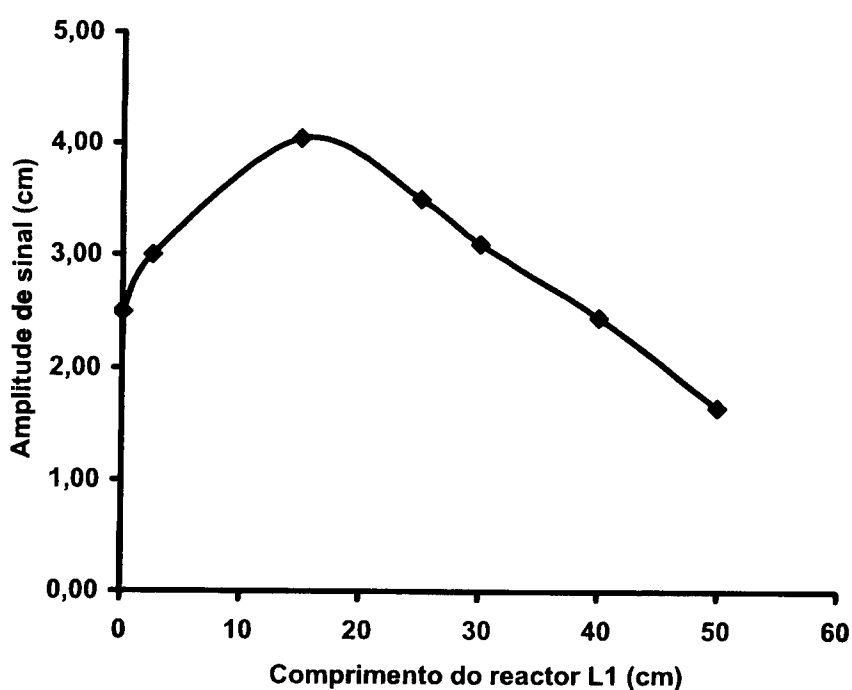


Figura 6.10

Influência no sinal analítico do comprimento do reactor L_1 entre 0 cm e 50 cm.

O reactor L_2 era unicamente responsável pela mistura adicional da solução de pirazinamida com a solução de catião cobre (II), sendo o fluxo resultante desta mistura inserido posteriormente no fluxo constituído pela mistura da solução de luminol com solução de peróxido de hidrogénio, para desenvolvimento da reacção de quimioluminescência.

Deste modo, para o reactor L_2 , assumiu-se que as melhores condições de resposta analítica seriam as que originavam a mais baixa intensidade de luz emitida pela reacção de quimioluminescência, porque assim confirmava-se uma eficiente mistura de solução de pirazinamida com solução de catião cobre (II) pelo reactor L_2 , o que resultava numa menor disponibilidade do catião cobre (II) para a reacção de oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogénio, após a mistura dos fluxos de soluções no ponto de confluência X da Figura 6.4.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 6.11), seleccionou-se um reactor L_2 com 25 cm de comprimento, tendo em conta que para maiores dimensões, o sinal analítico de quimioluminescência apresentava sinais de estabilização, indicando que com o reactor de 25 cm se obtinha um grau aceitável de mistura de soluções, para os parâmetros de funcionamento do sistema fixados para os ensaios.

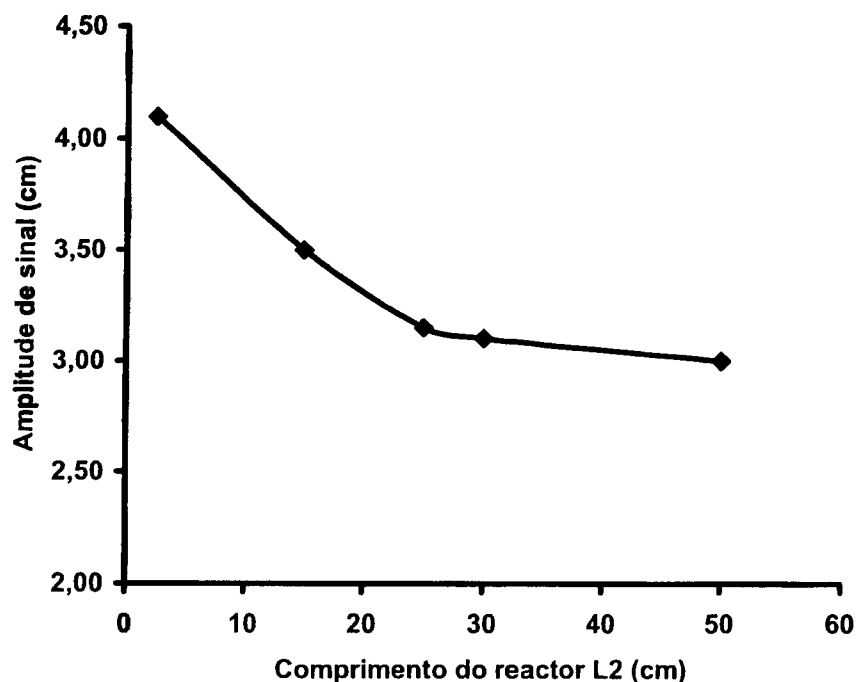


Figura 6.11

Influência do comprimento do reactor L_2 no sinal analítico entre 2,5 cm e 50 cm.

O reactor L_3 tinha como função facilitar o processo de mistura causado pelo fluxo pulsado, entre a solução de luminol e a solução de peróxido de hidrogénio, de modo a que quando se inseria a solução resultante da mistura de amostra e catião cobre (II) no fluxo de luminol/peróxido de hidrogénio, se obtinha uma mistura otimizada e rápida. Após avaliação da influência no sinal analítico das dimensões do reactor L_3 (Figura 6.12) verificou-se que o máximo de resposta analítica foi obtido com a utilização de um reactor L_3 com 25 cm de comprimento.

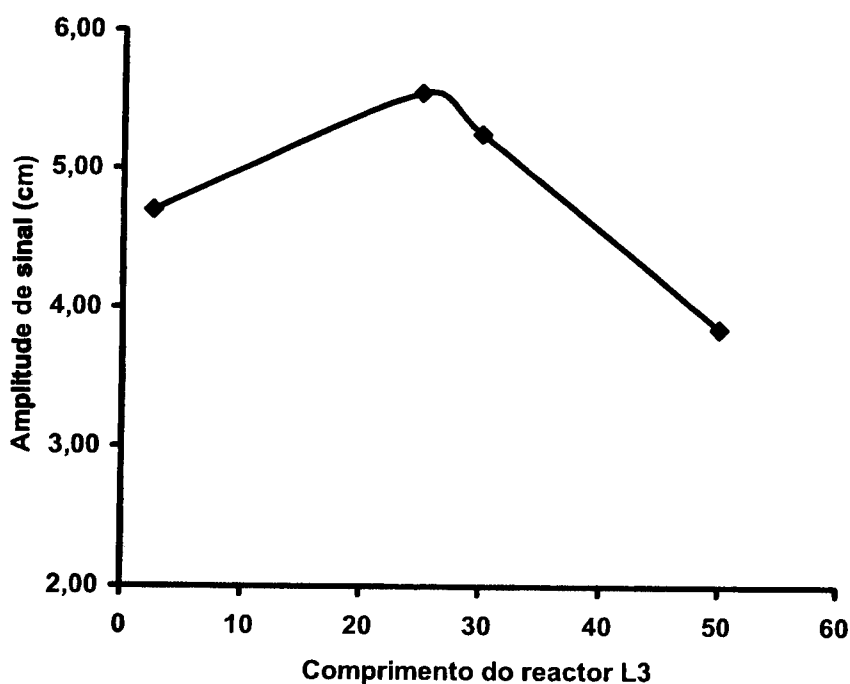


Figura 6.12

Influência do comprimento do reactor L_3 no sinal analítico entre 2,5 cm e 50 cm.

Nos sistemas de fluxo baseados no conceito de multi-impulsão, os caudais e os volumes de amostra e reagentes inseridos no sistema são definidos pelo volume

interno das micro-bombas utilizadas, e pelo número de pulsos e tempos de pulsos configurados, tal como já se referiu anteriormente.

O caudal é um parâmetro importante a considerar no desenvolvimento de um sistema de análise em fluxo acoplado a um sistema de detecção por quimioluminescência. As limitações associadas, por vezes, com o volume da célula de medição podem ser ultrapassadas através do controlo preciso dos caudais de cada fluxo de solução introduzido no sistema, como já referido em 6.2.2. O caudal originado por cada micro-bomba, que pode ser facilmente optimizado pelo operador, define o tempo de desenvolvimento da reacção, e também, o tempo de residência da zona de reacção dentro da célula de medição.

Os caudais a programar num sistema de fluxo dependem da velocidade das reacções de quimioluminescência exploradas. Conforme a velocidade da reacção aumenta, e com os restantes parâmetros fixos, o caudal deve ser aumentado igualmente, de modo a registar o máximo de intensidade de emissão de luz quando a zona de reacção passa pela célula de medida mas, ao mesmo tempo, aumenta o consumo de reagentes por determinação.

O caudal também influencia o perfil e altura dos picos de sinal analítico, assim como, o ritmo de amostragem. A maior parte dos trabalhos publicados que envolvem sistemas FIA acoplados a detectores de quimioluminescência são baseados em iguais valores de caudal para cada fluxo de solução de reagente envolvido na determinação, mas no entanto, no caso de se utilizar diferentes caudais, ocorreria possivelmente a deterioração da reprodutibilidade devido a processos de mistura incompletos e a características hidrodinâmicas anómalas [40].

A utilização de uma metodologia de fluxo baseada em multi-impulsão possibilita ultrapassar estes inconvenientes e dificuldades, devido ao controlo versátil, individual e independente dos caudais originados por cada micro-bomba, e à sua eficiente homogeneização das soluções devido ao fluxo pulsado.

Os volumes de reagentes e amostra introduzidos também afectam a amplitude de sinal analítico. Se os volumes de soluções inseridos no sistema aumentam muito, os processos de dispersão tornam-se limitados na zona central dos volumes inseridos, originando gradientes de concentração muito acentuados. O resultado final é valores elevados de dispersão nos extremos de uma zona de amostra e baixos valores na zona central. Numa situação extrema, podem surgir duplos picos no registo do sinal analítico. Uma vez mais, a utilização da multi-impulsão como metodologia de análise em fluxo, possibilita ultrapassar as situações referidas, devido ao controlo individualizado e independente de cada micro-bomba. Esse versátil controlo permite explorar diferentes estratégias de amostragem, como por exemplo, a amostragem binária ou a confluência de zonas, em combinação com o fluxo pulsado, de modo a otimizar o processo de mistura quando estão envolvidos volumes elevados de soluções introduzidos no sistema de fluxo.

O programa informático que definia o funcionamento do sistema possibilitava o controlo individual e independente de cada micro-bomba, e porque cada uma das micro-bombas era responsável pela inserção no sistema de uma determinada solução de reagente envolvido na reacção, então foi possível aplicar diferentes configurações para o controlo do sistema, unicamente através de alterações no programa de controlo.

Portanto, o controlo automático e individualizado das micro-bombas possibilitava diferentes combinações de activação, e deste modo, a execução de diferentes estratégias de amostragem. As diferentes estratégias de amostragem originam diferentes graus de dispersão, o que por sua vez, permite alterar os gradientes de concentração dos reagentes e amostra dentro dos tubos de fluxo, sem implicar modificações na estrutura física da montagem.

A fácil manipulação e controlo automático do sistema analítico por computador possibilitou efectuar um ensaio, descrito de seguida, e em que além de se efectuar

estudos da influência no sinal analítico das diferentes estratégias de amostragem, também se efectuou simultaneamente estudos que envolviam a influência do caudal e dos volumes de amostra introduzidos no sistema. A possibilidade de executar um procedimento de optimização conjunta dos parâmetros referidos revela-se como uma das vantagens intrínsecas da automatização dos sistemas de fluxo por multi-impulsão.

Nestes estudos, a estratégia de amostragem avaliada incidiu no ponto de confluência X da montagem analítica (Figura 6.4), a partir do qual ocorria a reacção de quimioluminescência inibida pela pirazinamida, sendo deste modo, mais relevante o estudo da inserção das soluções neste ponto da montagem. Portanto, um dos parâmetros avaliado, em termos de influência no sinal analítico, foi a estratégia de inserção do fluxo de amostra/cobre no fluxo de luminol/peróxido de hidrogénio, assistida pela natureza pulsada do fluxo.

A necessidade de fixar uma estratégia para a formação do fluxo de luminol/peróxido de hidrogénio e do fluxo de amostra/cobre, levou à utilização da inserção de soluções por confluência de zonas, porque esta estratégia providenciava um grau de mistura *à priori* aceitável, além de que a existência dos reactores L_2 e L_3 também promovia a mistura adicional das diferentes soluções.

Para esta finalidade, o fluxo resultante da mistura de solução de catião cobre (II) com solução de amostra foi originado através da activação simultânea das micro-bombas P_3 e P_4 , e igual procedimento foi adoptado para a formação do fluxo com a solução de luminol e peróxido de hidrogénio, em que as micro-bombas P_1 e P_2 foram activadas em simultâneo.

No estudo efectuado, foi também avaliada a influência no sinal analítico de diferentes caudais para cada estratégia de inserção. O caudal foi variado através da configuração de diferentes valores para o tempo de pulso das micro-bombas. Os tempos de pulso avaliados foram de 300, 500 e 700 ms, correspondendo a

aproximadamente, 2,13 mL min⁻¹, 1,48 mL min⁻¹ e 1,13 mL min⁻¹, respectivamente.

Para o cálculo dos caudais é necessário considerar que dada a estratégia de inserção utilizada são sempre activadas duas micro-bombas em simultâneo (com excepção para a estratégia de confluência de zonas em são activadas 4 micro-bombas), originando um segmento de 16 µL de volume de solução. Outros factores também importantes para o cálculo dos caudais são o tempo de activação e o tempo de pulso (frequência de pulso) das micro-bombas. Como já referido anteriormente em 6.2.3, os parâmetros de controlo das micro-bombas envolviam um tempo de activação de 150 ms, em que o solenóide estava activo e originava a entrada para a micro-bomba de uma alíquota de solução, e um tempo de pulso (300 ms, 500 ms e 700 ms, para o ensaio descrito), em que o solenóide estava desactivado e ocorria a impulsão da alíquota de solução no seu interior para o sistema de fluxo. Portanto, entre cada pulso (situação de entrada de alíquotas de solução no sistema) decorria um intervalo de tempo, correspondente ao somatório do tempo de activação com o tempo de pulso.

Outro parâmetro avaliado foi o volume de amostra. Por razões de simplicidade na explicação dos resultados apenas se utilizará o termo volume de amostra, mas no entanto, é importante referir que juntamente com cada pulso de solução de amostra inserido no sistema foi também inserido um pulso de solução de catião cobre (II), pois era deste modo formado o fluxo de amostra/cobre, através da estratégia de confluência de zonas.

Na Figura 6.13 encontram-se os resultados obtidos para este estudo. As estratégias de amostragem utilizadas para o ensaio foram a inserção de volumes únicos, a amostragem binária e a confluência de zonas.

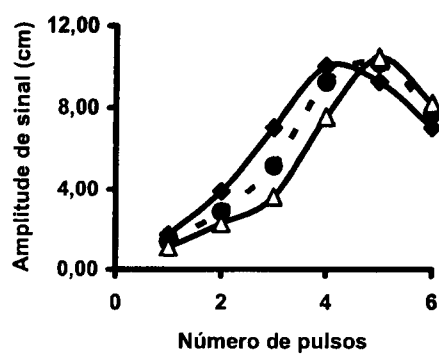
O gráfico 6.13(A) representa a influência no sinal da estratégia de inserção de volumes únicos, em função do volume de amostra e também em função do caudal. No gráfico 6.13(B) representa-se a influência da estratégia de inserção por

confluência de zonas, em função dos mesmos parâmetros referidos anteriormente, e no gráfico 6.13(C), a representação diz respeito à estratégia de inserção por amostragem binária, também em função dos parâmetros referidos acima.

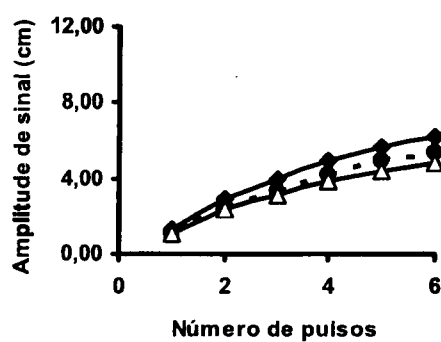
Para avaliar a influência no sinal analítico da estratégia de inserção de volumes únicos, uma alíquota de solução de amostra/cobre foi inserida no ponto de confluência X após a interrupção do fluxo de luminol/peróxido de hidrogénio, de modo a que se formassem duas interfaces de reacção entre amostra/cobre e luminol/peróxido de hidrogénio. Este ensaio foi efectuado para diferentes volumes inseridos de solução amostra/cobre, através do aumento do número de pulsos executados pelas micro-bombas P_3 e P_4 , em simultâneo. Os volumes de amostra/cobre inseridos no fluxo de luminol/peróxido de hidrogénio pela estratégia de inserção de volumes únicos corresponderam a uma variação de 1 a 6 pulsos executados pelas micro-bombas P_3 e P_4 .

A análise da Figura 6.13(A) revela que o sinal analítico mais elevado foi obtido para a situação de inserção de 4 pulsos de solução de amostra/cobre, para um tempo de pulso de 300 ms; um sinal analítico equivalente foi verificado para volumes de amostra /cobre correspondentes a 5 pulsos introduzidos no sistema, mas para tempos de pulso de 500 ms e 700 ms. Esta situação verifica-se porque para caudais menores, o tempo em que a zona de reacção demora a atingir o detector é menor, e portanto, o máximo de intensidade de luz emitida ocorre fora da célula de fluxo. Neste caso, o sinal analítico é compensado por um aumento da quantidade de reagentes introduzidos no sistema através do aumento do número de pulsos. Daí que seja obtido um sinal analítico equivalente na introdução de maiores volumes de amostra/cobre para caudais inferiores.

(A)



(B)



(C)

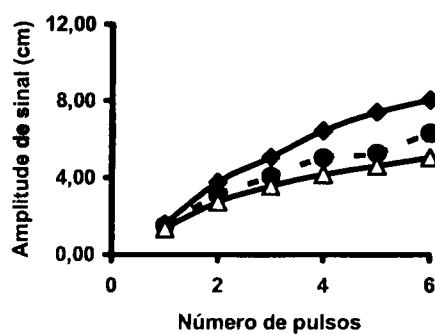


Figura 6.13

Influência no sinal analítico do caudal e da estratégia de amostragem.

◆ - 300 ms; ● - 500 ms; Δ - 700 ms; (A) - Estratégia de inserção de volumes únicos; (B) - Estratégia de confluência de zonas; (C) - Estratégia de amostragem binária.

Para a avaliação da influência no sinal analítico da estratégia de confluência de zonas, o fluxo de cobre e pirazinamida foi convergido no fluxo de luminol e peróxido de hidrogénio, enquanto este também era direccionada para o detector. Deste modo, na altura da inserção de amostra as 4 micro-bombas eram utilizadas simultaneamente. Para compensar o aumento do caudal durante a etapa de amostragem em X, devido à activação simultânea das 4 micro-bombas, o tempo de pulso das micro-bombas foi reduzido para metade durante a etapa de amostragem, de modo a manter o ensaio comparável com os restantes estudos da estratégia de amostragem.

A observação dos resultados obtidos, e representados na Figura 6.13(B), indica que para todos os volumes de amostra/cobre inseridos, se verificou uma diminuição do sinal analítico quando se diminuía o caudal. Isto significa que utilizando a estratégia de inserção por confluência de zonas do fluxo de amostra/cobre no fluxo de solução de luminol/peróxido de hidrogénio, ocorria um desenvolvimento muito rápido da reacção de quimioluminescência imediatamente após a inserção de cobre/amostra no ponto de confluência X, e portanto, qualquer diminuição no caudal determinava que a reacção ocorresse nas imediações da célula de fluxo.

Adicionalmente, deve ser considerado os efeitos de diluição gerados pela introdução simultânea de várias soluções, através da confluência de zonas. Daí que o sinal analítico registado seja também inferior quando comparado com os resultados obtidos pela inserção de volumes únicos.

O ensaio relativo ao estudo da influência no sinal analítico da estratégia de inserção por amostragem binária do fluxo amostra/cobre no fluxo de luminol/peróxido de hidrogénio foi realizado através da activação alternada das micro-bombas: pulsos de amostra/cobre foram alternados com pulsos de luminol/peróxido de hidrogénio. Os resultados obtidos estão representados na Figura 6.13(C).

A utilização da estratégia de inserção por amostragem binária originou resultados equivalentes aos obtidos com a estratégia de inserção por confluência de zonas. Verificou-se que para tempos de pulso superiores a 300 ms, isto é, para caudais inferiores a $2,13 \text{ mL min}^{-1}$, ocorria uma diminuição do sinal analítico para todos os volumes de amostra inseridos no ponto de confluência X. Isto significa que a estratégia por amostragem binária também originou um desenvolvimento rápido da reacção de quimioluminescência. Adicionalmente, devido à estratégia de inserção utilizada, também ocorriam fenómenos de diluição dos reagentes introduzidos no sistema, resultando num abaixamento do sinal registado pelo detector.

Quando se analisa este estudo comparativo das diferentes estratégias de inserção de amostra/cobre no fluxo de luminol/peróxido de hidrogénio, conclui-se que para a montagem analítica descrita em 6.2.3, e utilizada para a realização destes ensaios, a utilização da estratégia de inserção por volumes únicos no ponto de confluência X, originou o sinal analítico mais elevado, e que 4 pulsos de amostra introduzidos no sistema com um tempo de pulso de 300 ms, isto é, um caudal de $2,13 \text{ mL min}^{-1}$, possibilitou uma melhor sensibilidade de detecção.

Os resultados apresentados na Figura 6.13, demonstram que com a utilização das estratégias de inserção por confluência de zonas e por amostragem binária para a mistura do fluxo de amostra/cobre com o fluxo de luminol/peróxido de hidrogénio, o desenvolvimento da reacção de quimioluminescência ocorria mais rápido. Sendo assim, para se conseguir que a zona de reacção, na altura de tempo correspondente ao máximo de intensidade de emissão de luz, estivesse a percorrer a célula de fluxo, e portanto a passar em frente ao detector, seria necessário remover o reactor L_1 , ou alternativamente, realizar os ensaios de determinação com caudais muito elevados, ou seja, programando o funcionamento das microbombas com valores de tempo de pulso muito pequenos, ocorrendo o risco de

neste último caso ocorrer uma diminuição da reprodutibilidade dos tempos de inserção de reagentes.

Consequentemente, para realizar a análise de preparações farmacêuticas, utilizou-se a montagem analítica otimizada com a presença do reactor L₁ (15 cm), e através da estratégia de inserção de volumes únicos no ponto de confluência X, visto que com esta configuração obteve-se o sinal analítico mais elevado.

6.3.3 Análise de formulações farmacêuticas

Para avaliar a metodologia desenvolvida na determinação da pirazinamida em formulações farmacêuticas, foi realizado um estudo da influência de alguns compostos utilizados normalmente como excipientes. Um composto foi considerado como não interferente quando a variação de sinal analítico era $\pm 3\%$ quando comparado com o sinal analítico obtido na ausência do composto referido. Os resultados demonstraram que os excipientes celulose, lactose, amido de milho e estearato de cálcio não interferiram até 100 vezes a razão molar em relação à trimipramina.

O mecanismo para a determinação indirecta de um ligando orgânico através da complexação com um ião metálico foi estudado anteriormente [50], e desse trabalho concluiu-se que o perfil da variação da intensidade de luz em função do logaritmo da concentração do analito apresentava uma forma sigmoidal. Os resultados obtidos neste trabalho, de determinação da pirazinamida em formulações farmacêuticas estão de acordo com o trabalho de MacDonald *et. al.*, e deste modo, a representação gráfica da amplitude de sinal analítico em função do logaritmo da concentração do analito apresentava um perfil sigmoidal (Figura 6.14).

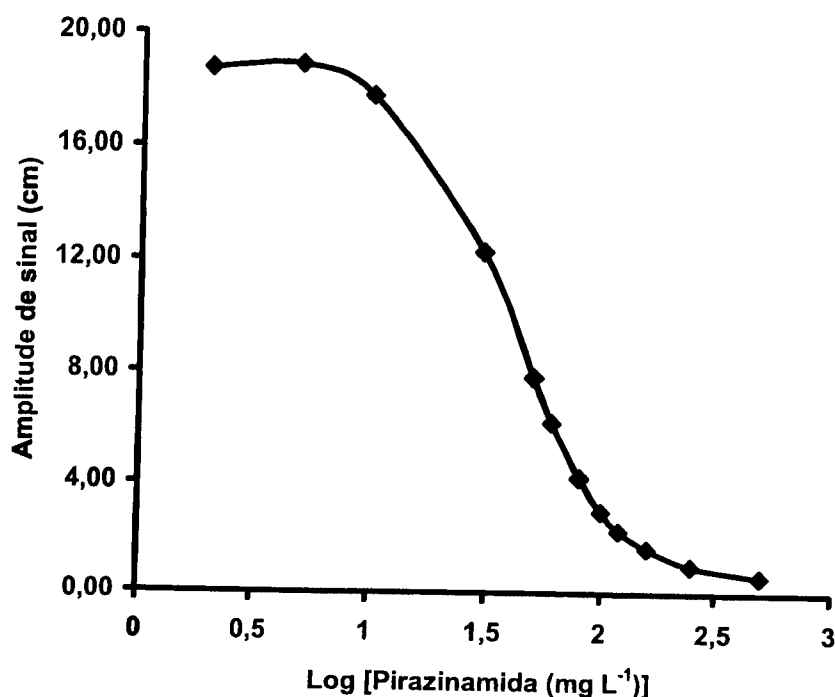


Figura 6.14

Perfil da variação do sinal analítico em função do logaritmo da concentração de pirazinamida.

O sistema de fluxo desenvolvido possibilitou obter-se uma zona de resposta linear para o intervalo de concentrações de pirazinamida entre 10 mg L⁻¹ e 70 mg L⁻¹. A curva analítica (Figura 6.15) foi representada por $A = -0,2055 C + 20,611$, em que A representa a amplitude de sinal analítico em cm, e C representa a concentração de pirazinamida em mg L⁻¹. O correspondente coeficiente de correlação foi -0,9965. Esse intervalo de resposta linear foi utilizado para efectuar a determinação de pirazinamida em formulações farmacêuticas.

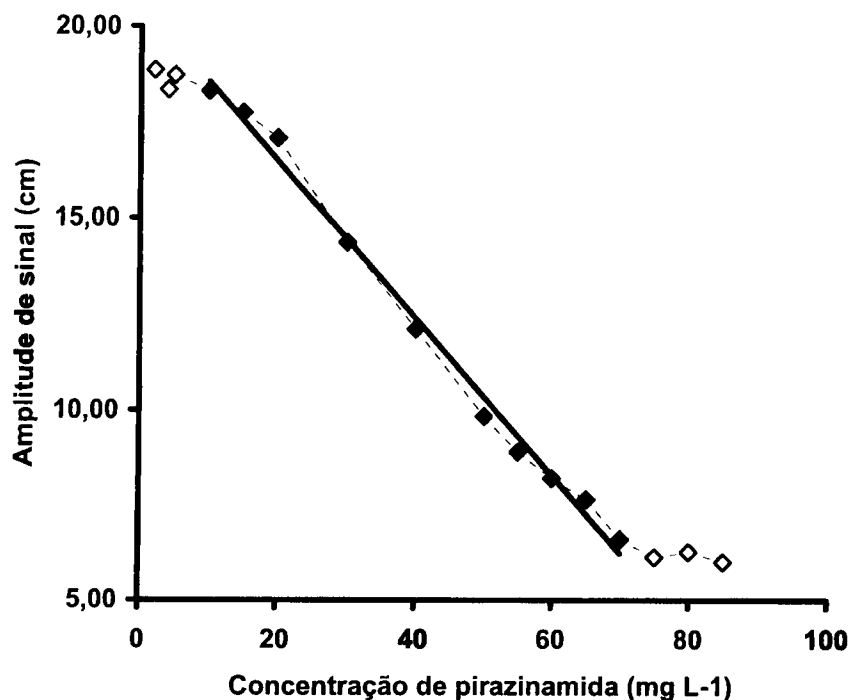


Figura 6.15

Curva de calibração obtida com soluções padrão de pirazinamida com concentrações de 10 até 70 mg L⁻¹. ◇, ♦ - pontos experimentais; ♦ - pontos experimentais da curva de calibração.

Para uma quantidade declarada de 500 mg de pirazinamida por comprimido (Pramide[®]), o resultado obtido após análise foi $499,5 \pm 0,20$ mg e com um erro de exactidão de 0,3% em relação ao resultado obtido pelo método de referência.

Para 21 determinações consecutivas numa amostra real, o desvio padrão relativo (em percentagem) foi 0,99%, e o ritmo de amostragem foi cerca de 150 determinações por hora.

6.3.4 Exploração do sistema de fluxo

Visando a possibilidade de executar determinações analíticas em amostras biológicas, como por exemplo a urina, realizaram-se ensaios para obter uma curva de calibração para valores inferiores de concentração de pirazinamida.

Através da alteração do esquema de actuação das micro-bombas, foi possível obter outra curva de calibração para um intervalo de concentrações entre 1 e 15 mg L⁻¹ de pirazinamida (Figura 6.16). A curva analítica foi representada por $A = -0,5807 C + 12,476$ (a representação das variáveis é equivalente à representação em 6.3.3), e o correspondente coeficiente de correlação foi -0,9982.

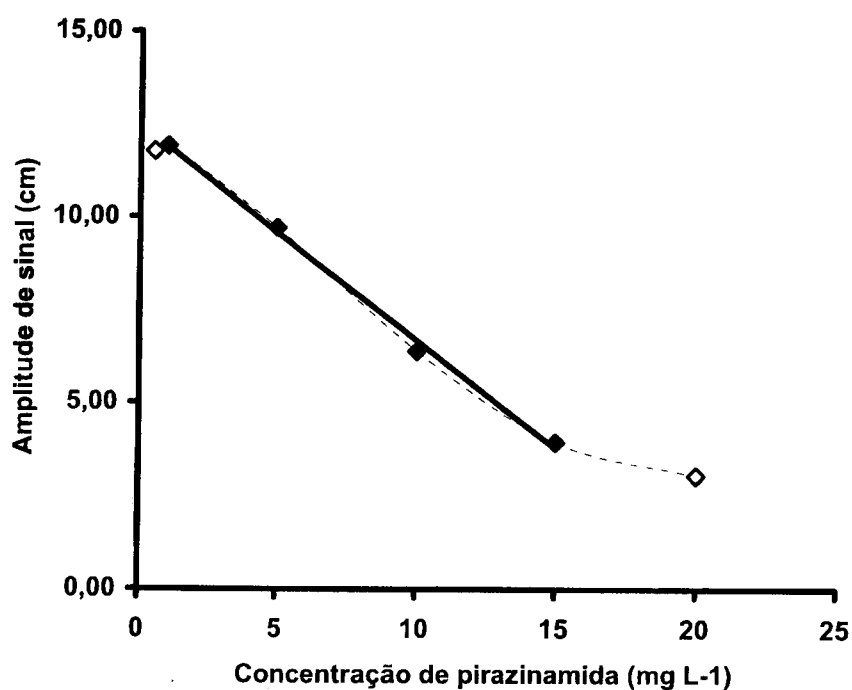


Figura 6.16

Curva de calibração obtida com soluções padrão de pirazinamida com concentrações de 1 até 15 mg L⁻¹. ◇, ♦ - pontos experimentais; ♦ - pontos experimentais da curva de calibração.

A razão entre os volumes de solução de catião cobre (II) e solução de pirazinamida, que foi inserida no fluxo de solução de luminol/peróxido de hidrogénio, foi modificada através do programa de controlo do sistema de fluxo, substituindo deste modo a necessidade de preparar novas soluções de reagentes com concentrações diferentes. O intervalo de concentrações de pirazinamida mais baixo para o qual se verificou linearidade entre a amplitude do sinal analítico e a concentração foi obtido através da inserção de 2 pulsos de solução de catião cobre (II) (16 μL) e 8 pulsos de solução de pirazinamida (64 μL), no fluxo de luminol/peróxido de hidrogénio, por intermédio da estratégia de inserção de volumes únicos, de acordo com a configuração descrita no esquema representativo dos parâmetros de configuração do programa de controlo do sistema e representado na Tabela 6.2.

Tabela 6.2

Esquema representativo dos parâmetros de configuração do programa de controlo do sistema, para obtenção de uma curva analítica com linearidade entre 1 e 15 mg L^{-1} .

Etapa	Estado de Impulsão				Número de pulsos	Tempo de pulso (ms)
	P1	P2	P3	P4		
1	ON	ON	OFF	OFF	10	300
2	OFF	OFF	ON	ON	1	300
3	OFF	OFF	OFF	ON	3	300
4	OFF	OFF	ON	ON	1	300
5	OFF	OFF	OFF	ON	3	300
6	ON	ON	OFF	OFF	30	300

Com este ensaio demonstrou-se que foi possível alterar a zona de resposta linear entre o sinal analítico e a concentração de solução de pirazinamida, através da execução de diferentes ordens de activação das micro-bombas, controlando os volumes intercalados no sistema. Deste modo, revelou-se a versatilidade do sistema de fluxo, que deste modo, poderia ser facilmente aplicado para a determinação analítica de outros compostos, cuja adaptação requeria unicamente alterações ao nível de programação do controlo do sistema.

No entanto, a diminuição da resposta linear obtida por reconfiguração do controlo do sistema não foi suficiente para poder efectuar determinações directas em urina, porque apenas cerca de 4% a 14% de pirazinamida não metabolizada é excretada pela urina no espaço de 24 horas [51]. Se for considerado a eliminação de 4% de uma dose administrada de pirazinamida de 20 a 25 mg Kg⁻¹, significa a eliminação de aproximadamente, 1,2 mg L⁻¹ a 2 mg L⁻¹ de pirazinamida não metabolizada na urina, no espaço de 24 horas.

6.4 Conclusões

A metodologia desenvolvida constitui uma estratégia para a determinação de pirazinamida em formulações farmacêuticas, e pode ser uma alternativa útil relativamente a outros procedimentos de análise disponíveis, porque exhibe um elevado grau de automação, é uma metodologia rápida, precisa, simples, origina um baixo volume de resíduos e requer pouca intervenção do operador na sua manutenção.

Deste modo, as características e potencialidades dos sistemas de fluxo por multi-impulsão fazem estes sistemas muito atractivos para a implementação de procedimentos analíticos automáticos, e exibem evidentes vantagens relacionadas

principalmente com as múltiplas tarefas conferidas às micro-bombas, nomeadamente, a inserção de soluções, o transporte e mistura das soluções e a comutação individualizada entre a introdução de soluções.

A multi-impulsão é uma metodologia em fluxo que possibilita a manipulação minuciosa e individual de cada solução envolvida, porque por cada solução de reagente envolvida existe uma micro-bomba responsável pela inserção e transporte dos fluidos. O controlo automático individual e independente de cada micro-bomba proporciona uma maior flexibilidade na montagem do sistema analítico, sendo esta característica dos sistemas de fluxo baseados no conceito de multi-impulsão aproveitada quando se pretende montar um sistema analítico que envolva um grande número de soluções na reacção química utilizada, e se pretenda ao mesmo tempo um controlo minucioso dos parâmetros de controlo que influenciam directa ou indirectamente a extensão da mistura, e portanto, o desenvolvimento da reacção.

Estes sistemas garantem igualmente um controlo minucioso do volume de amostra inserido, através de um controlo sobre o caudal debitado e também sobre o tempo de activação/pulso de cada micro-bomba. O controlo de um sistema de fluxo por multi-impulsão é realizado através da activação independente de cada micro-bomba, possibilitando um ajuste quase imediato do caudal associado a cada micro-bomba e portanto a cada ponto de inserção de soluções no sistema.

Este sistema de manipulação das soluções permite uma eficiente implementação de diferentes procedimentos analíticos sem implicar a modificação da configuração da montagem analítica.

Adicionalmente, os sistemas de fluxo por multi-impulsão possibilitam a realização de diferentes estratégias de inserção de soluções incluindo a inserção de volumes únicos, a confluência de zonas e a amostragem binária, que podem ser exploradas visando a manipulação da adição de reagentes e a homogeneização da amostra com os reagentes, e portanto, o desenvolvimento da reacção.

A utilização de micro-bombas para originar um fluxo pulsado possibilita uma melhor mistura amostra/reagentes, o que contribui para um desenvolvimento da reacção mais rápido. Este facto torna-se muito importante, por exemplo, nas situações em que se pretende efectuar medições de intensidade de luz emitida por uma reacção de quimioluminescência, que resulta da mistura de amostra e reagentes, e desenvolvimento da reacção na célula de fluxo.

Face aos aspectos descritos anteriormente resultantes de acoplar um detector de quimioluminescência a um sistema de fluxo por multi-impulsão, a metodologia desenvolvida demonstrou elevada versatilidade, possibilitando a obtenção de dois intervalos de calibração diferentes para a determinação de pirazinamida, sem implicar modificações na configuração física da montagem analítica, mas sim por intermédio de diferentes valores de parâmetros de controlo, o que possibilitou diferentes proporções de amostra e reagentes no sistema.

Portanto, a combinação de análise em fluxo baseado no conceito de multi-impulsão com o sistema de detecção por quimioluminescência resultou em algumas características atractivas para realizar determinações analíticas em formulações farmacêuticas: (i) baixo tempo de análise: o ritmo de amostragem de 150 amostras por hora, obtido neste trabalho por exemplo, demonstra a utilidade destes sistemas quando está envolvido um elevado número de análises; (ii) precisão: devido ao modo reprodutível da introdução das soluções; (iii) versatilidade: demonstrada pela elevada capacidade de manipulação da zona de amostra e zona de reacção, devido ao controlo individualizado e independente de cada micro-bomba responsável pela inserção de cada solução de reagente envolvido; (iv) automatização: o elevado grau de automatização associado aos sistema de fluxo por multi-impulsão possibilita que as medições de quimioluminescência possam ser realizadas muito rapidamente e com um mínimo de participação do operador. A automatização associada com a versatilidade, e também a estrutura modular destes sistemas, permitem que diversas soluções de

reagentes possam ser adicionadas à solução de amostra, através do recurso a diferentes e individuais linhas de fluxo, cujas condições de funcionamento devidamente optimizadas possibilitam as melhores condições para a obtenção do máximo de intensidade de luz emitida.

6.5 Referências bibliográficas

- 1 The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman's & Gilman's, 10th Ed., 2001, McGraw-Hill
- 2 The Index Merck, Thirteenth Edition, 5204 (2001)
- 3 V. Chorine, *Comp. Rend. Acad. Sci.*, 220, 150 (1945)
- 4 D. McKenzie, I. Malone, S. Kushner, J. J. Oleson, Y. Subbarow, *J. Lab. Clin. Med*, 33, 1249 (1948)
- 5 H. Fox, *Science*, 116, 129 (1952)
- 6 N. Rist, F. Grumbach, D. Libermann, *Am. Rev. Tuberc.*, 79, 1 (1959)
- 7 W. McDermott, R. Tompsett, *Am. Rev. Tuberc.*, 70, 748 (1954)
- 8 K. Konno, M. Feldman, W. McDermott, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 95, 461 (1967)
- 9 Y. Zhang, A. Scorpio, H. Nikaido, H. Sun, *J. Bacteriol*, 181, 2044 (1999)
- 10 Y. Zhang, S. Permar, H. Sun, *J. Med. Microbiol.*, 51, 42 (2002)
- 11 A. Scorpio, Y. Zhang, *Nature Med.*, 2, 662 (1996)
- 12 Y. Zhang, D. Mitchison, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 7, 6 (2003)
- 13 A. Brouard, H. Barreteau, H. Merdjan, M. Paillet, G. Fredj, M. Micoud, *J. Chromatr.*, 345, 453 (1985)
- 14 K. Chan, C. L. Wong, S. Lok, *J. Chromatr.*, 380, 367 (1986)
- 15 T. Yamamoto, Y. Moriwaki, S. Takahashi, T. Hada, K. Higashino, *J. Chromatr. Biomed.*, 413, 342 (1987)
- 16 S. Husain, P. N. Sarma, S. M. Sajjad, R. Narsimha, M. Subrahmanyam, *J. Chromatr.*, 513, 83 (1990)
- 17 C. Altomare, A. Carotti, S. Cellamare, G. Leogrande, D. Devito, *Farmaco*, 45, 1229 (1990)

- 18 N. Sadeg, N. Pertat, H. Duterte, M. Dumontet, J. Chromatr. Biomed., 675, 113 (1996)
 - 19 A. Mehmedagic, P. Verite, S. Menager, C. Tharasse, D. Andre, O. Lafont, J. Chromatr. B, 695, 365 (1997)
 - 20 Y. P. Patel, N. Shah, I. C. Bhoir, M. Sundaresan, J. Chromatr. A, 828, 287 (1998)
 - 21 P. J. Smith, J. van Dyk, A. Fredericks, Int. J. Tuberc. Lung D., 3, S325 (1999)
 - 22 J. E. Conte, E. Lin, E. Zurlinden, J. Chromatr. Sci., 38, 33 (2000)
 - 23 M. C. Gennaro, R. Calvino, C. Abrigo, J. Chromatr. B, 754, 477 (2001)
 - 24 B. Mohan, N. Sharda, S. Singh, J. Pharm. Biomed. Anal., 31, 607, (2003)
 - 25 J. W. Wu, H. H. Shih, S. C. Wang, T. H. Tsai, Anal. Chim. Acta, 522, 231 (2004)
 - 26 J. Woo, C. L. Wong, R. Teoh, K. Chan, J. Chromatr. Biomed., 420, 73 (1987)
 - 27 A. Walubo, P. Smith, P. I. Folb, J. Chromatr. Biomed., 658, 391 (1994)
 - 28 M. Y. Khuhawar, F. M. A. Rind, J. Chromatr. B, 766, 357 (2002)
 - 29 E. Calleri, E. Lorenzi, S. Furlanetto, G. Massolini, G. Caccialanza, J. Pharm. Biomed. Anal., 29, 1089 (2002)
 - 30 A. Espinosa-Mansilla, M. I. Acedo-Valenzuela, A. M. de la Pena, F. C. Canada, F. S. Lopez, Talanta, 58, 273 (2002)
 - 31 J. Roboz, Z. Israeli, P. G. Dayton, T. F. Yu, Fed. Proc., 33, 358 (1974)
 - 32 M. I. Acedo-Valenzuela, A. Espinosa-Mansilla, A. M. de la Pena, F. C. Canada, Anal. Bioanal. Chem., 374, 432 (2002)
 - 33 G. R. Svoboda, J. Am. Pharm. Assoc., 45, 405 (1956)
 - 34 M. A. A. Lomillo, O. D. Renedo, M. J. A. Martinez, Anal. Chim. Acta, 449, 167 (2001)
-

- 35 W. S. Allen, S. M. Aronovic, L. M. Brancone, J. H. Williams, *Anal. Chem.*, 25, 895 (1953)
- 36 P. A. Caccia, *Am. Rev. Tuberc. Pulm.*, 75, 105 (1957)
- 37 H.C. Goicoechea, A. C. Olivieri, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 20, 681 (1999)
- 38 A. Espinosa-Mansilla, M. I. Acedo-Valenzuela, A. M. de la Pena, F. Salinas, F. C. Canada, *Anal. Chim. Acta*, 427, 129 (2001)
- 39 J. Madan, A. K. Dwivedi, S. Singh, *Anal. Chim. Acta*, 538, 345 (2005)
- 40 A. M. Garcia-Campaña, W. R. G. Baeyens, "Chemiluminescence in Analytical Chemistry", Marcel Dekker, Inc., New York (2001)
- 41 H. D. Albrecht, *Z. Phys. Chem.*, 136, 330 (1928)
- 42 <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/fleming/mechanism.htm>
- 43 E. H. White, O. C. Zafiriou, H. H. Kagi, J. H. M. Hill, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 940 (1964)
- 44 E. H. White, M. M. Bursey, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 941 (1964)
- 45 J. L. F. C. Lima, J. L. M. Santos, A. C. B. Dias, M. F. T. Ribeiro, E. A. G. Zagatto, *Talanta*, 64, 1091 (2004)
- 46 S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, A. A. S. C. Machado, J. L. F. C. Lima, J. M. Paulís, *Quím. Anal.*, 6, 278 (1987)
- 47 *Farmacopeia Portuguesa VII*, Ed. Oficial, Lisboa, 1342 (2002)
- 48 J. Du, Y. Li, J. Lu, *Anal. Chim. Acta*, 448, 79 (2001)
- 49 A. Economou, P. D. Tzanavaras, M. Notou, D. G. Themelis, *Anal. Chim. Acta*, 505, 129 (2004)
- 50 A. MacDonald, T. A. Nieman, *Anal. Chem.*, 57, 936 (1985)
- 51 <http://www.rxlist.com>

CAPÍTULO

7

CONCLUSÕES FINAIS

Neste capítulo são apresentadas as conclusões finais, e é realizada uma avaliação geral do trabalho desenvolvido, sendo salientado os seus aspectos mais relevantes.

Com este trabalho pretendeu-se desenvolver metodologias analíticas automáticas baseadas em sistemas de fluxo, que contribuíssem para vincar as enormes potencialidades das técnicas de fluxo quando utilizadas como ferramentas para o desenvolvimento e implementação de sistemas automáticos de análise na execução de determinações analíticas.

Visto que ocorreu a nível mundial um aumento da procura da produção de formulações farmacêuticas, e consequentemente, do controlo de qualidade da sua produção, outro dos objectivos deste trabalho foi estender a aplicação dos sistemas automáticos de fluxo à análise de vários produtos farmacêuticos.

O desenvolvimento de sistemas de fluxo, para a avaliação de alguns parâmetros envolvidos no controlo da qualidade de formulações farmacêuticas, constitui uma alternativa, com vantagens, aos procedimentos reconhecidos internacionalmente nas mais diversas farmacopeias, nos quais se referem etapas fastidiosas e longas de pré-tratamento de amostras, e/ou a necessidade de recorrer a equipamento sofisticado e de operadores especializados para a sua utilização.

O trabalho realizado nesta dissertação envolveu o desenvolvimento de sistemas analíticos de fluxo baseados no conceito de multicomutação e de multi-impulsão. Os sistemas de fluxo desenvolvidos realçaram a elevada versatilidade associada aos sistemas baseados nos conceitos de fluxo referidos, sobretudo na selecção do percurso em que as soluções de amostra e reagentes podem ser direccionadas, e permitiram igualmente recorrer a variadíssimas estratégias de manipulação da zona de amostra, nomeadamente no que respeita à adição dos reagentes e ao controlo do seu transporte para o sistema de detecção.

Os sistemas automáticos desenvolvidos podem ser aplicados na análise de diferentes substâncias, recorrendo a distintas reacções químicas e envolvendo uma gama alargada de intervenções sobre a zona de amostra, sem que para isso seja necessário alterar significativamente a configuração física do sistema analítico, como por exemplo, através da utilização de reactores de diferentes dimensões ou

de câmaras de mistura, sendo suficiente apenas modificar os parâmetros de funcionamento do sistema através do programa de controlo, como os tempos e combinações de actuação dos distintos dispositivos de inserção ou comutação das soluções.

Os sistemas de fluxo multicomutado possibilitam um controlo preciso e versátil sobre o processo de inserção da amostra, devido à utilização de uma amostragem com base no tempo, o que permite a inserção reprodutível de alíquotas de amostra com diferentes volumes. Deste modo, permite a manipulação da dispersão em função dos volumes de soluções inseridos, obtendo-se diferentes valores de diluição, os quais podem ser adaptados à concentração da amostra, excluindo a necessidade de efectuar modificações na configuração da montagem de fluxo. Assim, estes sistemas permitem ampliar a gama de concentrações determinável, o que se revela vantajoso sempre que a análise envolva amostras com grande variabilidade nas concentrações.

O recurso à estratégia amostragem binária para a inserção de soluções, baseada na intercalação de pequenas alíquotas de amostra e reagente, possibilita uma mistura mais eficiente das soluções introduzidas no sistema de fluxo, em virtude de uma mais rápida homogeneização da zona de reacção, o que favorece o desenvolvimento da reacção. Deste modo, pode utilizar-se reactores de menores dimensões na montagem analítica, o que adicionalmente resulta na redução do efeito de dispersão.

A metodologia desenvolvida para a determinação de clomipramina em formulações farmacêuticas demonstrou ser, de facto, uma metodologia simples, rápida e facilmente automatizada, que pode ser aplicada vantajosamente em análises de rotina. Ao contrário da metodologia de referência, em que obrigatoriamente se dilui e filtra manualmente, o recurso à amostragem binária e a inclusão de um processo de filtração em linha na montagem de fluxo, melhora notoriamente o tempo requerido para análise. Esta metodologia de fluxo

combinou a capacidade de mistura homogénea rápida conferida pela amostragem binária com um controlo efectivo da dispersão, devido à versátil inserção de amostra com base no tempo, que possibilita a inserção alternada de alíquotas de reduzido volume de amostra e reagente, contribuindo significativamente para o aumento da extensão da mistura das soluções, dispensando deste modo, a obrigatoriedade de utilização de reactores de maiores dimensões para promover a mistura das soluções, o que originava inevitavelmente um aumento da dispersão.

A estratégia desenvolvida para a determinação de trimipramina em preparações farmacêuticas, através de um sistema de fluxo multicomutado, resultou numa metodologia que para além de envolver todas as vantagens citadas para o trabalho anterior, explora um novo procedimento de homogeneização, consistindo na combinação da estratégia de amostragem binária com a inversão de fluxo, sendo este último procedimento típico do conceito de SIA. Este novo procedimento de homogeneização das soluções num sistema de fluxo, resultou numa elevada eficiência de mistura, não sendo necessário recorrer a reactores de maiores dimensões para promover a mistura das soluções, o que permitiu reduzir a dispersão da amostra durante o transporte para o sistema de detecção, enquanto se assegurou um desenvolvimento conveniente da reacção química.

No sistema de fluxo para a determinação de isoniazida em formulações farmacêuticas, a utilização de buretas automáticas para efectuar simultaneamente diferentes tarefas, incluindo a inserção individual de soluções de amostra e reagentes, a comutação de fluxo e a propulsão das diferentes soluções envolvidas, demonstrou uma excelente precisão, exactidão e versatilidade, na execução dessas funções. Com este sistema, o controlo computadorizado das buretas automáticas assegura uma elevada versatilidade na manipulação de soluções, em que cada alíquota inserida de cada solução envolvida na determinação analítica é controlada em termos de número, volume e frequência de inserção. O sistema de fluxo desenvolvido pode constituir uma alternativa para a miniaturização dos sistemas

de fluxo contínuo, porque envolve a utilização de um reduzido número de componentes para realizar simultaneamente as tarefas de inserção, comutação e transporte de soluções, como já referido. Adicionalmente, a estratégia adoptada para a inserção das soluções neste sistema permitiu uma redução no consumo de soluções, porque as determinações eram realizadas com alíquotas de solução com baixo volume (1 a 4 μL).

Com a aplicação de sistemas de fluxo baseados no conceito de multi-impulsão é explorada uma nova característica hidrodinâmica, baseada num movimento caótico das soluções de amostra e reagentes durante o seu transporte para a detecção. O fluxo pulsado promove uma mistura rápida entre soluções de amostra e reagentes, mesmo em condições limitadas de dispersão, como por exemplo, quando na utilização nas montagens analíticas de reactores de pequenas dimensões.

A metodologia por multi-impulsão, aplicada para a determinação de pirazinamida em formulações farmacêuticas revelou-se rápida, simples e precisa, e exibiu um elevado grau de automação. O controlo de um sistema de fluxo baseado em multi-impulsão, sendo realizado através da activação independente de cada micro-bomba, possibilita um ajuste quase imediato do caudal de solução debitado por cada dispositivo, e portanto, em cada ponto de inserção de soluções no sistema de fluxo. Deste modo, estes sistemas garantem um controlo minucioso do volume de amostra inserido, através de um controlo preciso sobre a frequência de pulso de cada micro-bomba.

O controlo preciso sobre todos os parâmetros de configuração do sistema de fluxo para a determinação de pirazinamida em formulações farmacêuticas, definiram o elevado grau de versatilidade destes sistemas, traduzido pela obtenção de diferentes intervalos de calibração para a determinação do fármaco, por intermédio da simples alteração via computador dos parâmetros de controlo do sistema desenvolvido.

ANEXO

LISTA DE PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS:

4. Prior J. A. V., Santos J. L. M., Lima J. L. F. C., "Chemiluminometric determination of pyrazinamide in an automated multi-pumping flow system", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (submetido).

3. Prior J. A. V., Santos J. L. M., Lima J. L. F. C., "Trimipramine determination in pharmaceutical preparations with an automated multicommutated reversed-flow system", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33, 903 (2003).

2. Prior J. A. V., Santos J. L. M., Lima J. L. F. C., "Sampling strategies exploiting multi-pumping flow systems", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375, 1234 (2003)

1. Lima J. L. F. C., Prior J. A. V., Reis B. F., Santos J. L. M., Zagatto E. A. G., "Automated spectrophotometric determination of clomipramine on a multicommutated flow system", *Analytical Chimica Acta*, 467, 75 (2002).
