Karine Lopes Marques

NOVOS SISTEMAS DE FLUXO CONTÍNUO PARA A AUTOMATIZAÇÃO DA ANÁLISE QUIMILUMINOMÉTRICA DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

Universidade do Porto
Faculdade de Farmácia
Porto, 2006

Karine Lopes Marques

Licenciada em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Porto

Novos sistemas de fluxo contínuo para a automatização da análise quimiluminométrica de produtos farmacêuticos

Dissertação para Doutoramento apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

FACULDADE DE FARMACIA
U.P.
BIBLIOTECA
Data 15/12/2006
Reg. 4124
Cota

FFD
MAR
4124

Universidade do Porto

Faculdade de Farmácia

Porto, 2006

Trabalho realizado no serviço de Química-Física

da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

com o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia

Resumo

No âmbito desta dissertação foram desenvolvidos procedimentos analíticos automáticos, baseados nas técnicas de fluxo multicomutação e multi-impulsão, que visavam avaliar as potencialidades e versatilidade da associação deste tipo de técnicas à detecção por quimiluminescência. As metodologias desenvolvidas foram aplicadas à análise de produtos farmacêuticos.

Implementou-se um procedimento analítico para a determinação de propranolol baseado num sistema de fluxo multicomutado. A metodologia desenvolvida assegurava uma rápida homogeneização da zona de reacção e um controlo flexível da dispersão, por meio da inserção de amostra baseada no tempo e facilmente adaptável.

Foi igualmente concebido um sistema de fluxo multicomutado para a determinação de clomipramina, no qual a elevada versatilidade característica da multicomutação foi explorada implementando o conceito de amostragem binária e usando apenas uma bomba de pistão para a inserção e propulsão de todas as soluções.

A multi-impulsão foi pela primeira vez aplicada à quimiluminescência no desenvolvimento de uma metodologia para a determinação de metformina. As características hidrodinâmicas do fluxo pulsado proporcionam a rápida e eficiente mistura entre amostra e reagentes requerida pela quimiluminescência, de modo a que a emissão de radiação ocorra em frente ao fotomultiplicador.

Aproveitando a elevada versatilidade operacional proporcionada pela multi-impulsão, desenvolveu-se um sistema de fluxo para avaliação da actividade antioxidante através da capacidade "scavenging" do peróxido de hidrogénio, utilizando dois reagentes quimiluminogénicos diferentes, o luminol e a lucigenina, sem necessidade de reconfiguração física do sistema.

As vantagens da aplicação da multi-impulsão à quimiluminescência foram também avaliadas no desenvolvimento de metodologias para a determinação de fluoxetina e de carvedilol, destacando-se a facilidade de automação e controlo dos sistemas desenvolvidos resultante da utilização de um único tipo de dispositivo activo.

Combinando a multi-impulsão com a estratégia de paragem de fluxo desenvolveu-se um sistema de fluxo para a determinação simultânea de levodopa e benserazida, através da obtenção dos perfis de emissão versus tempo e efectuando o tratamento quimiométrico do sinal analítico.

A validação das metodologias desenvolvidas foi efectuada por comparação dos resultados obtidos com os fornecidos pelas metodologias de referência recomendadas pelas Farmacopeias e pela realização de ensaios de recuperação.

Abstract

In this work several automatic analytical methodologies based on multicommutation and multipumping flow techniques were developed. The aim of the developed systems was to evaluate the potentialities and versatility of the association of multicommutation and multipumping methodologies with chemiluminescence. The developed systems were applied in the analysis of pharmaceutical products.

An analytical procedure for the determination of propranolol based in a multicommutated flow system was implemented. The developed methodology assured a fast reaction zone homogenisation and a flexible control of dispersion, by means of the adaptable time-based sample insertion.

The high versatility of multicommutation was exploited in the flow system developed for clomipramine determination, by implementation of the binary sampling concept and by using a single automatic burette for solutions insertion and propulsion.

Multipumping was for the first time applied to chemiluminescence in the methodology developed for the determination of metformin. The hydrodynamic characteristics of the pulsed flow ensured the fast and efficient mixture of sample and reagents required by chemiluminescence, in a way that radiation emission occurred in front of the photomultiplier.

As a result of the high operational versatility provided by multi-pumping, a flow system for assesment of the antioxidant activity by the hydrogen peroxide scavenging capacity, was developed, using two different chemiluminogenic reagents, luminol and lucigenin, without requiring physical re-configuration of the system.

The advantages of multipumping application to chemiluminescence were also evaluated in the development of two methodologies for fluoxetine and carvedilol determination,

exhibiting easy of automation and control of the developed system as result of the use of solenoid micro-pumps as the only active components.

Combining the multi-pumping technique with the stop flow strategy a flow system was developed for simultaneous determination of levodopa and benserazide, by acquisition of the emission versus time profile, performing chemometric treatment of the analytical signal.

The validation of the developed methodologies was carried out by comparing the obtained results with those furnished by the reference procedures recommended by different Pharmacopoeia and performing recovery tests.

Résumé

L'élaboration de cette thèse repose sur des travaux qui ont mené au développement de méthodologies automatiques d'analyses, basées sur des techniques de flux de multicommutation et multi-impulsion, développées dans le but d'évaluer les potentialités et la versatilité de l'accouplement de ces types de méthodologie avec la chimiluminescence. Ces méthodologies on été appliquées à l'analyse de formulations pharmaceutiques.

Durant les travaux, il a été implémenté un procédé analytique pour la détermination du propranolol basé sur un système de flux multicommuté. La méthodologie développée assure un mélange et une homogénéisation rapide des réactifs ainsi qu'un contrôle flexible de la dispersion, à travers de l'insertion temporisé de l'échantillon.

La grande versatilité de la multicommutation a aussi été explorée durant le développement d'un système de flux multicommuté pour l'analyse de la clomipramine, utilisant une implémentation d'échantillonnage binaire et l'utilisation d'une burette automatique pour l'insertion et la propulsion de toutes les solutions.

Pour la première fois, la multi-impulsion a été appliqué à la chimiluminescence pour l'analyse de la metformine. Les caractéristiques hydrodynamiques du flux pulsé ont permis un rapide mélange des réactifs qui est une condition nécessaire à la détection par chimiluminescence, ainsi l'émission de lumière se produit devant le photomultiplicateur.

Grâce à la grande souplesse de la multi-impulsion, il a été développé un système de flux pour l'évaluation de l'activité antioxydante de certains produits, en contrôlant la capacité de captation du peroxyde d'hydrogène. Cette évaluation a été réalisée en utilisant deux réactifs chimiluminogénique différent, le luminol et la lucigénine, sans avoir recours à aucune reconfiguration physique du système.

Les avantages de l'application de la multi-impulsion à la chimiluminescence ont été appliqués au développement de deux méthodologies pour l'analyse de la fluoxétine et du carvedilol. Durant ces travaux, il a été constaté une automatisation et un contrôle des systèmes faciles, résultant de l'utilisation d'un seul type de dispositif actif.

En utilisant simultanément la multi-impulsion avec un arrêt de flux, il a été développé un système de flux pour l'analyse simultanée du lévodopa et de la benserazide, grâce à l'obtention de profils d'émission au long du temps et en effectuant un traitement chimiométrique du signal analytique.

La validation des systèmes analytiques a été réalisée par comparaison des résultats obtenus avec ceux fournis par les méthodes de référence recommandées par les Pharmacopées et par la réalisation d'essais de récupération.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, pela sua supervisão, orientação e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor João Luís Santos agradeço a sua orientação, apoio e disponibilidade na realização deste trabalho.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter aceite como aluna de doutoramento.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, pela bolsa de doutoramento que me foi atribuída no âmbito do programa POCI 2010 e do Fundo Social Europeu, e outros apoios financeiros, sem os quais não teria sido possível realizar este trabalho.

A todos os Professores do Serviço de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto por me terem recebido tão bem no laboratório.

Ao CENA, em particular ao Professor Doutor Elias Ayres Guidetti Zagatto, a quem agradeço a imensa hospitalidade aquando da minha estadia em Piracicaba.

Às minhas amigas Cristina, Marlene e Célia, por todos os momentos que passamos juntas, pelas horas de desabafo e pelas gargalhadas.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório: Ana, Christophe, David, Emília, Eunice, Helena, Hugo, João, Luís, Luísa, Marieta, Marta, Paula Jerónimo, Paula Pinto, Pedro, Rodrigo e Sofia; a todos agradeço a amizade e por terem tornado mais agradáveis estes quatro anos.

Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao Rui, a quem dedico esta tese, por estar sempre presente.

Ciência.Inovação 2010

Índice

Capítulo 1 **1-1**

1. Introdução geral 1-2

1.1 Aspectos gerais da quimiluminescência 1-3

1.2 Características da quimiluminescência 1-7

1.3 Espécies emissoras de quimiluminescência 1-9

1.3.1 Luminol 1-9

1.3.2 Lofina 1-10

1.3.3 Lucigenina 1-11

1.3.4 Tris (2,2'-bipiridil) ruténio (II) 1-12

1.3.5 Peroxioxalatos 1-13

1.4 Oxidantes 1-15

1.5 Automatização de determinações quimiluminométricas 1-17

1.6 Técnicas de fluxo contínuo não segmentado 1-21

1.6.1 Análise por injecção em fluxo (FIA) 1-22

1.6.2 Análise por injecção sequencial (SIA) 1-24

1.6.3 Multicomutação (MCFA) 1-26

1.6.4 Multiseringa (MSFIA) 1-32

1.6.5 Multi-impulsão (MPFS) 1-35

1.7 Objectivos da dissertação 1-40

1.8 Referências bibliográficas 1-41

Capítulo 2 **2-1**

2. Aspectos gerais da parte experimental

2.1 Introdução 2-2

2.2 Reagentes e soluções 2-3

2.3 Instrumentação 2-4

2.4 Componentes dos sistemas de fluxo 2-5

2.4.1 Dispositivos de propulsão 2-5

2.4.1.1 Bombas de pistão 2-5

2.4.1.2 Microbombas solenóides 2-6

2.4.2 Dispositivos de inserção 2-7

2.4.3 Tubagem e outros componentes das montagens 2-9
2.4.4 Dispositivos de detecção 2-9
2.4.5 Controlo informático dos sistemas 2-11
2.4.5.1 Aparelhagem 2-11
2.4.5.2 Software 2-11
2.5 Optimização e avaliação das montagens de fluxo 2-13
2.6 Tratamento estatístico 2-15
2.7 Referências bibliográficas 2-17

Capítulo 3 **3-1**
3. Determinação de propranolol
3.1 Introdução 3-2
3.2 Experimental 3-6
3.2.1 Reagentes e soluções 3-6
3.2.2 Equipamento 3-6
3.2.3 Montagem de fluxo 3-7
3.2.4 Método de referência 3-9
3.3 Resultados e discussão 3-11
3.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos 3-11
3.3.2 Avaliação de interferentes 3-18
3.3.3 Análise de formulações farmacêuticas 3-19
3.4 Conclusões 3-21
3.5 Referências bibliográficas 3-23

Capítulo 4 **4-1**
4. Determinação de clomipramina
4.1 Introdução 4-2
4.2 Experimental 4-6
4.2.1 Reagentes e soluções 4-6
4.2.2 Equipamento 4-6
4.2.3 Montagem de fluxo 4-8
4.2.4 Método de referência 4-10

4.3 Resultados e discussão 4-11
4.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos 4-12
4.3.2 Avaliação de interferentes 4-21
4.3.3 Análise de formulações farmacêuticas 4-21
4.4 Conclusões 4-23
4.5 Referências bibliográficas 4-24

Capítulo 5 **5-1**
5. Determinação de metformina
5.1 Introdução 5-2
5.2 Experimental 5-6
5.2.1 Reagentes e soluções 5-6
5.2.2 Equipamento 5-6
5.2.3 Montagem de fluxo 5-8
5.2.4 Método de referência 5-9
5.3 Resultados e discussão 5-11
5.3.1 Avaliação preliminar 5-11
5.3.2 Optimização dos parâmetros físico-químicos 5-13
5.3.3 Avaliação de interferentes 5-20
5.3.4 Análise de formulações farmacêuticas 5-21
5.4 Conclusões 5-23
5.5 Referências bibliográficas 5-25

Capítulo 6 **6-1**
6. Avaliação da capacidade antioxidante através da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio
6.1 Introdução 6-2
6.2 Experimental 6-7
6.2.1 Reagentes e soluções 6-7
6.2.2 Equipamento 6-8
6.2.3 Montagem de fluxo 6-8
6.3 Resultados e discussão 6-11

6.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos 6-11
6.3.2 Análise de formulações farmacêuticas 6-20
6.4 Conclusões 6-22
6.5 Referências bibliográficas 6-23

Capítulo 7 **7-1**
7. Determinação de fluoxetina
7.1 Introdução 7-2
7.2 Experimental 7-6
7.2.1 Reagentes e soluções 7-6
7.2.2 Equipamento 7-6
7.2.3 Montagem de fluxo 7-7
7.2.4 Método de referência 7-9
7.3 Resultados e discussão 7-11
7.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos 7-11
7.3.2 Avaliação de interferentes 7-19
7.3.3 Análise de formulações farmacêuticas 7-20
7.4 Conclusões 7-22
7.5 Referências bibliográficas 7-23

Capítulo 8 **8-1**
8. Determinação de carvedilol
8.1 Introdução 8-2
8.2 Experimental 8-6
8.2.1 Reagentes e soluções 8-6
8.2.2 Equipamento 8-7
8.2.3 Montagem de fluxo 8-8
8.3 Resultados e discussão 8-10
8.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos 8-10
8.3.2 Avaliação de interferentes 8-17
8.3.3 Análise de formulações farmacêuticas 8-17
8.4 Conclusões 8-19

8.5 Referências bibliográficas 8-21

Capítulo 9 **9-1**

9. Determinação simultânea de levodopa e benserazida com tratamento quimiométrico do sinal analítico

9.1 Introdução 9-2

9.2 Métodos de calibração multivariada 9-6

9.2.1 Análise em componentes principais 9-7

9.2.2 Regressão por mínimos quadrados parciais 9-8

9.2.3 Redes neuronais 9-9

9.3 Experimental 9-11

9.3.1 Reagentes e soluções 9-11

9.3.2 Equipamento e software 9-11

9.3.3 Montagem de fluxo 9-13

9.3.4 Processamento de dados 9-14

9.3.5 Calibração multivariada 9-16

9.4 Resultados e discussão 9-18

9.4.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos 9-18

9.4.2 Optimização do modelo quimiométrico 9-23

9.4.3 Avaliação de interferentes 9-34

9.4.4 Análise de formulações farmacêuticas 9-35

9.5 Conclusões 9-36

9.6 Referências bibliográficas 9-37

Capítulo 10 **10-1**

10. Conclusões finais 10-2

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1. Introdução geral

Apesar do fenómeno da luminescência datar de 300 A.C., as primeiras observações de quimiluminescência ocorreram em finais do século XIX e só recentemente se verificou a expansão das aplicações analíticas da quimiluminescência graças ao desenvolvimento da instrumentação, ao aparecimento de detectores (fotomultiplicadores, fotodiodos, etc.) mais sensíveis, mais económicos e também ao aparecimento de novas reacções de quimiluminescência. De facto, o equipamento de medição simples e a elevada versatilidade para a determinação de uma ampla variedade de espécies permitiu que a detecção por quimiluminescência se tornasse numa técnica analítica altamente sensível e de elevada utilidade.

Inicialmente a investigação que envolvia o uso de quimiluminescência era direccionada para a elucidação dos mecanismos reaccionais envolvidos e para a procura de espécies que afectassem a quimiluminescência. As aplicações analíticas aparecem na literatura no início dos anos 70 e a introdução da análise por injecção em fluxo, permitindo uma mistura rápida e reprodutível de amostra e reagentes muito próximo do detector, foi responsável por um elevado crescimento do trabalho de investigação relacionado com esta área da química analítica.

De facto, a fácil implementação da quimiluminescência como técnica de detecção em sistemas de fluxo em conjunto com a facilidade de automação abriu novas e interessantes perspectivas no campo da análise quimiluminométrica.

1.1 Aspectos gerais da quimiluminescência

O fenómeno da luminescência é conhecido na natureza desde a Antiguidade, encontrando-se descritas, na literatura da época, observações deste fenómeno, as quais estavam relacionadas principalmente com organismos vivos que emitem luz tais como pirilampos, bactérias, fungos, peixes ou insectos.

Historicamente, a primeira observação de quimiluminescência como emissão de luz produzida por um composto orgânico sintético, ocorreu em 1877 por Radziszewski, ao descobrir que a lofina emitia luz verde por reacção com o oxigénio na presença de uma base forte. No entanto o termo quimiluminescência só foi introduzido em 1888 por Wiedemann que classificou o fenómeno de luminescência em seis tipos diferentes de acordo com a forma de excitação [1].

A quimiluminescência é definida como a emissão de radiação electromagnética (ultravioleta, visível ou infravermelho) resultante de uma reacção química. Um dos intermediários ou produtos da reacção é formado num estado electronicamente excitado, emitindo radiação ao regressar ao estado fundamental. Quando a emissão de radiação resulta de um organismo vivo ou de uma reacção enzimática, o fenómeno é denominado bioluminescência [2].

A emissão de radiação pode também, ser resultado de reacções electroquímicas, fenómeno que é conhecido por electroquimiluminescência. Neste caso, as espécies reactivas são formadas electroquimicamente e difundem do eléctrodo reagindo entre si ou com outras substâncias que se encontram em solução, produzindo quimiluminescência na proximidade do eléctrodo [3].

De uma forma geral a quimiluminescência pode ser gerada segundo dois mecanismos básicos (Figura 1.1). Na quimiluminescência directa, dois reagentes, geralmente um substrato e um oxidante na presença de um co-factor, reagem formando um produto, do

qual uma fracção será formada num estado electronicamente excitado e que vai regressar ao estado fundamental com emissão de um fotão. Por outro lado a quimiluminescência indirecta é baseada num processo de transferência de energia da espécie excitada para um fluoróforo que depois emite luz. Este processo possibilita que moléculas incapazes de produzir quimiluminescência directamente, transfiram o seu excesso de energia para um fluoróforo que por sua vez fica num estado electronicamente excitado, regressando ao estado fundamental por emissão de um fotão.

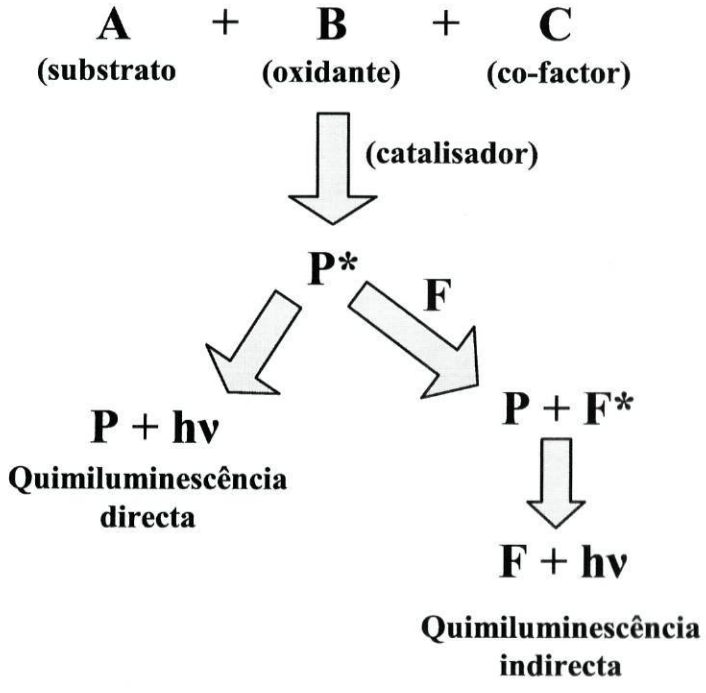


Figura 1.1 – Tipos de reacções quimiluminométricas.

Para que uma reacção química apresente a capacidade de produzir luz é necessário que preencha alguns requisitos [4]. Em primeiro lugar a reacção deve ser exotérmica de modo a produzir energia suficiente para formar o estado electronicamente excitado. Uma vez que a criação do estado excitado e a geração de quimiluminescência na região

do visível requer energias com valores entre 40 a 70 Kcal mol^{-1}, a ocorrência de quimiluminescência está ligada a processos exotérmicos, estando limitada a reacções que preenchem este requisito, tais como reacções redox que usam oxigénio e peróxido de hidrogénio ou oxidantes de força similar [5]. Além disso o caminho reaccional mais favorável deve ser a formação de um estado electronicamente excitado. Por fim o processo preferencial de desactivação do produto excitado deve ser a emissão de um fotão em detrimento de outros processos não radiantes que podem surgir em pequena extensão. No caso da quimiluminescência indirecta, quer a eficiência de transferência de energia das espécies excitadas para o fluoróforo quer a eficiência de fluorescência devem ser elevadas.

Em todos os processos luminescentes, a intensidade de emissão depende da eficiência na geração de moléculas no estado excitado, a qual é representada pelo rendimento quântico ou eficiência quântica e pela velocidade de reacção. No caso das reacções de quimiluminescência a intensidade pode ser expressa como:

$$I_{CL} = \Phi_{CL} \frac{-dA}{dt}$$

Sendo I_{CL} a intensidade de emissão (fotões/segundo), Φ_{CL} o rendimento quântico e dA/dt a velocidade à qual o percursor A é consumido. O rendimento quântico é expresso como o produto de duas eficiências:

$$\Phi_{CL} = \Phi_{ex}\, \Phi_{L}$$

Onde Φ_{ex} é a eficiência de produção de espécies no estado excitado e Φ_{L} é a eficiência de luminescência das espécies luminescentes. Para a quimiluminescência indirecta o Φ_{ex}

também inclui a eficiência do processo de transferência de energia. Os valores mais elevados de rendimento quântico estão geralmente associados a reacções bioluminescentes (até cerca de 0,9), enquanto que na maioria das reacções de quimiluminescência usadas com fins analíticos o Φ_{CL} varia entre 0,001 e 0,1.

As medições de quimiluminescência são fortemente influenciadas por factores experimentais que afectam o rendimento quântico e a velocidade de reacção, tais como: a estrutura química do percursor quimiluminogénico, a temperatura, o pH, a força iónica, o solvente e a composição da solução.

Uma vez que a intensidade de emissão é linearmente proporcional à concentração de qualquer reagente envolvido na reacção, a medição da intensidade pode ser utilizada para análise quantitativa de uma vasta variedade de espécies que podem participar no processo de quimiluminescência. Assim é possível determinar: (i) substratos ou percursores de quimiluminescência responsáveis pela ocorrência do estado excitado; (ii) o reagente necessário à reacção quimiluminescente (geralmente um oxidante); (iii) algumas espécies que afectam a velocidade ou eficiência da reacção de quimiluminescência, podendo ser activadores como os catalisadores (enzimas e catiões metálicos) e co-factores, ou inibidores como as substâncias redutoras que inibem a emissão de radiação; (iv) fluoróforos no caso da quimiluminescência indirecta; (v) também algumas espécies que não estão directamente envolvidas na reacção quimiluminescente mas que podem reagir com outras substâncias em reacções conjugadas para gerar um produto que é reagente na reacção de quimiluminescência; (vi) espécies que podem ser derivatizadas com alguns percursores quimiluminogénicos ou fluoróforos podendo ser determinadas directamente ou por quimiluminescência indirecta.

1.2 Características da quimiluminescência

Um dos grandes interesses analíticos da quimiluminescência reside na capacidade de produzir moléculas que emitem luz sem que estas sejam previamente expostas a uma radiação, o que permite evitar todo um conjunto de problemas associados a fenómenos de dispersão da radiação incidente, instabilidade da fonte de radiação e a interferências provocadas pela excitação não selectiva.

As vantagens da quimiluminescência incluem a possibilidade de alcançar uma elevada sensibilidade (baixos limites de detecção) e um amplo intervalo de aplicação usando um equipamento simples.

Os baixos limites de detecção dependem essencialmente do facto de não ser necessária fonte de radiação o que elimina os fenómenos de dispersão de Raman e Rayleigh e o ruído de fundo associado à fonte. A ausência de ruído de fundo possibilita a utilização de fotomultiplicadores de elevada voltagem resultando numa melhoria significativa na razão sinal/ruído relativamente à detecção fluorimétrica convencional [6], sendo possível obter limites de detecção na região dos fentomole (10^{-15}) e ocasionalmente na região dos atomole (10^{-18}) [7]. Quando comparada com outras técnicas espectroscópicas a quimiluminescência pode ser 10^5 vezes mais sensível do que a espectrometria de absorção e 10^3 vezes mais sensível do que a fluorimetria.

Os intervalos de aplicação (frequentemente linearidade) obtidos em quimiluminescência podem abranger várias ordens de magnitude como por exemplo o caso da determinação de morfina em que o intervalo de aplicação obtido é de 10^{-4} a 10^{-10} mol l^{-1} (gráfico de calibração log da intensidade de emissão versus log da concentração) [8].

O equipamento usado nas determinações quimiluminométricas é simples e de baixo custo. Devido à ausência de fonte de radiação referida anteriormente o sistema óptico utilizado é muito simples e uma vez que normalmente só está presente uma espécie

emissora não é necessário monocromador para discriminar os diferentes comprimentos de onda.

A quimiluminescência é ainda caracterizada por uma elevada versatilidade, pois como já foi referido permite a determinação das várias espécies que participam directa ou indirectamente, no processo quimiluminométrico. Dependendo da natureza do analito e da reacção, o aumento ou a diminuição da intensidade de quimiluminescência é directamente relacionada com a concentração do analito.

É de salientar que as reacções de quimiluminescência podem ser acopladas como técnica de detecção em cromatografia, electroforese capilar ou imunoensaios, combinando a elevada selectividade destas técnicas (associada à separação), com os excelentes limites de detecção da quimiluminescência, alargando ainda mais o seu campo de aplicação.

Contudo algumas limitações devem ser consideradas na análise quimiluminométrica, tal como a dependência da emissão de quimiluminescência dos factores ambientais, referida anteriormente, que devem ser controlados; e a pouca selectividade, porque um reagente de quimiluminescência não está limitado a um único analito. Considerando a natureza transiente do sinal, uma vez que a emissão de radiação sofre um aumento após a mistura do reagente, passando por um máximo, depois diminuindo para a linha de base, e que este perfil de emissão versus tempo pode variar largamente nos diferentes sistemas quimiluminométricos (dependendo do tempo de semi-vida do estado excitado que pode variar entre décimas de segundo até minutos), é necessário garantir que a detecção é efectuada durante um período de tempo rigorosamente definido e reprodutível.

1.3 Espécies emissoras de quimiluminescência

A investigação em quimiluminescência resultou numa variedade de reacções básicas que têm sido usadas para a determinação de um grande número de substâncias tanto de natureza orgânica como inorgânica, cuja presença se repercute sobre a intensidade de radiação emitida como resultado da participação do analito no processo global que conduz à quimiluminescência.

As reacções de quimiluminescência mais comuns envolvem espécies como o luminol, a lofina, a lucigenina, o tris(2,2'-bipiridil)ruténio (II) e os peroxioxalatos, as quais são descritas seguidamente.

1.3.1 Luminol

A reacção de quimiluminescência directa melhor conhecida é a oxidação de luminol (5-amino-2,3-di-hidroftalazina-1,4-diona) (Figura 1.2) em meio alcalino, sendo também uma das reacções quimiluminescentes mais eficientes.

A emissão de luz pelo luminol foi descrita pela primeira vez por Albrecht em 1928 [9]. A reacção envolve a oxidação do luminol em meio alcalino, produzindo 3-aminoftalato no estado excitado o qual emite radiação. A radiação emitida pelo 3-aminoftalato é azul em meio aquoso, a emissão ocorre próximo dos 425 nm que é idêntico ao comprimento de onda de emissão da sua fluorescência.

Na reacção de quimiluminescência do luminol o oxidante mais utilizado é o peróxido de hidrogénio, no entanto oxidantes como o permanganato, hipoclorito ou iodo também podem ser usados. A reacção é catalisada por iões metálicos como Fe (II), Cu (II), Co (II), ferricianeto, alguns metalocomplexos (hemina, hemoglobina) e enzimas (peroxidases).

Considerando a variedade de possíveis intervenientes, esta reacção tem sido aplicada na determinação de catalisadores como iões metálicos [10-12] ou enzimas, oxidantes [13,14] e inibidores ou substâncias que são facilmente oxidadas sendo determinadas indirectamente pela medição da diminuição da intensidade de quimiluminescência [15-17].

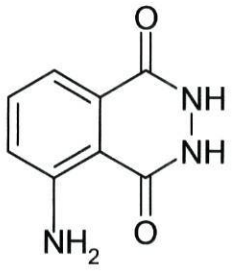


Figura 1.2 – Estrutura do luminol.

1.3.2 Lofina

A lofina (2,4,5-trifenilimidazol) foi a primeira substância produtora de quimiluminescência que foi descrita (Figura 1.3). A lofina é oxidada por oxigénio molecular ou pelos pares peróxido de hidrogénio-hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogénio-hexacianoferrato (III) de potássio, em meio alcalino produzindo uma luz amarela. Pensa-se que a oxidação da lofina resulte num radical livre que é posteriormente oxidado a hidroperóxido, que é a espécie emissora de radiação. A lofina tem sido utilizada na determinação de vários iões metálicos, como o Co (II), Cr (III) e Cu (II), que catalizam a sua oxidação pelo peróxido de hidrogénio [18,19].

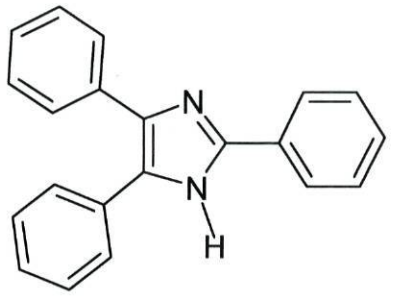


Figura 1.3 – Estrutura da lofina

1.3.3 Lucigenina

A lucigenina (nitrato de 10,10'-dimetil-9,9'-bisacridina) é uma das substâncias quimiluminescentes mais eficientes (Figura 1.4), que emite uma intensa radiação verde quando oxidada pelo peróxido de hidrogénio em meio alcalino, a qual foi descrita pela primeira vez por Glue e Petsch em 1935 [20]. A oxidação da lucigenina ocorre via um intermediário dioxetano, sendo o produto final a N-metilacridona a qual se pensa ser o composto emissor [21]. Esta reacção é catalisada por vários iões metálicos, alguns dos quais tais como o Pb (II), Bi (III), Tl (III) e Hg (I) não catalizam a quimiluminescência do luminol. Outros derivados da acridina demonstraram produzir quimiluminescência por oxidação com o peróxido de hidrogénio em meio alcalino. Devido ao facto do produto de reacção ser insolúvel em água, a adição de uma pequena quantidade de surfactante, como o dodecil sulfato de sódio, previne a precipitação [22]. A aplicação desta reacção permitiu a determinação de vários iões [23], oxidantes e redutores [17,24] como o ácido ascórbico. A lucigenina é também muito utilizada na medição de espécies reactivas de oxigénio a nível celular e na avaliação da capacidade antioxidante [25].

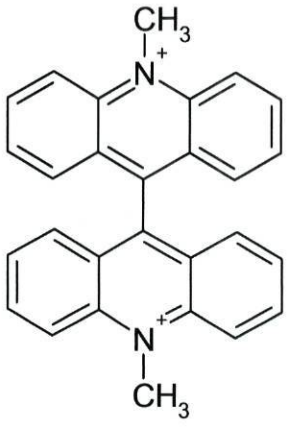


Figura 1.4 – Estrutura da lucigenina

1.3.4 Tris(2,2'-bipiridil) ruténio (II)

Outro sistema frequentemente utilizado em quimiluminescência, envolve o uso de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ o qual emite radiação laranja a 610 nm pelo estado excitado $[Ru(bpy)_3^{2+}]^*$. A espécie excitada pode ser obtida por diferentes reacções que implicam transferência de electrões e regeneração das espécies de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, como a reacção do $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ com o $[Ru(bpy)_3]^{+}$, ou destas espécies com vários redutores ou oxidantes.

$[Ru(bpy)_3]^{2+}$é o composto inorgânico usado em electroquimiluminescência mais estudado. Tal como foi referido anteriormente, a electroquimiluminescência é baseada na produção de radiação directa ou indirectamente como resultado de reacções electroquímicas que podem, por exemplo, gerar o agente oxidante.

Os estudos estão centrados no $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ou nos seus derivados devido às suas características intrínsecas, nomeadamente a capacidade de emitir luminescência à temperatura ambiente em solução aquosa, a qual é relativamente insensível à presença de oxigénio e a capacidade de sofrer reacções reversíveis de transferência de electrões, a

potenciais facilmente alcançáveis, resultando em espécies oxidadas ou reduzidas estáveis.

Assim, a importância analítica dos complexos de ruténio é demonstrada pelo número de trabalhos referidos em artigos de revisão [26,27], tendo sido utilizado na determinação de aminoácidos, proteínas, aminas alifáticas e cíclicas e vários produtos farmacêuticos.

1.3.5 Peroxioxalatos

No que concerne à quimiluminescência indirecta, um dos sistemas não biológicos mais frequentemente utilizado é baseado na reacção do peroxioxalato, a qual envolve a oxidação de um derivado do ácido oxálico pelo peróxido de hidrogénio, na presença de um fluoróforo. O nome peroxioxalato provém do facto da luminescência resultar de estados excitados formados por decomposição de peróxidos cíclicos de derivados do ácido oxálico. O intermediário vai transferir a energia formada na oxidação para um fluoróforo, levando-o ao estado excitado que vai emitir radiação ao regressar ao estado fundamental. Os derivados do ácido oxálico mais utilizados são o bis-(2,4,6-triclorofenil)oxalato (TCPO) e o bis-(2,4-dinitrofenil)oxalato (DNPO) (Figura 1.5).

Os sistemas de peroxioxalato têm algumas vantagens relativamente ao luminol. A sua eficiência e por conseguinte a sua sensibilidade são maiores, apresentam um rendimento quântico de cerca de 0,5 e são menos afectados pelas condições experimentais. A principal desvantagem deste sistema reside na insolubilidade e fácil hidrólise dos compostos acima referidos em água, contudo a solubilidade e estabilidade dos peroxioxalatos pode ser melhorada usando solventes orgânicos como o acetonitrilo, dioxano, tert-butanol e acetato de etilo.

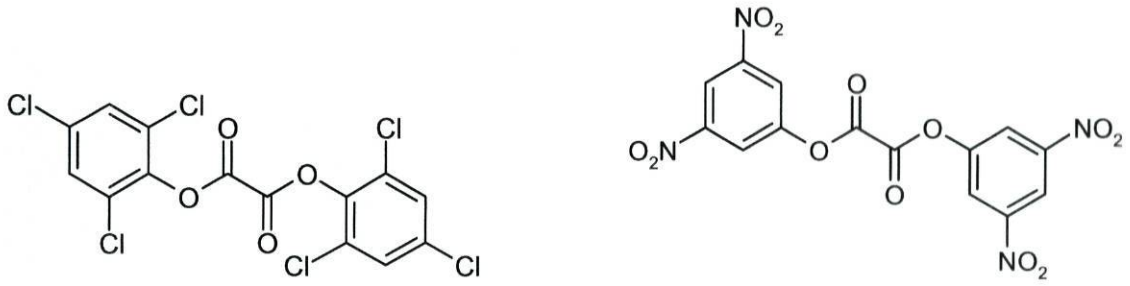


Figura 1.5 – Estrutura do TCPO e do DNPO

Esta reacção tem sido usada para determinar um grande número de espécies [28,29], como o peróxido de hidrogénio, compostos que são altamente fluorescentes ou compostos que não exibem fluorescência nativa mas que podem ser derivatizados quimicamente usando fluorescamina ou cloreto de dansilo.

A utilização de solventes orgânicos como meio reaccional dos sistemas de peroxioxalato torna-os adequados para associar a cromatografia líquida [30], já que uma das principais dificuldades da associação entre a detecção por quimiluminescência e a cromatografia líquida é o facto da maior parte das reacções quimiluminométricas ocorrer em meio aquoso. Contudo, na utilização dos sistemas de peroxioxalato em cromatografia líquida podem ocorrer problemas quando se usam os ésteres hidrofóbicos originais em combinação com os eluentes hidrofílicos de fase-reversa, uma vez que pode ocorrer precipitação.

1.4 Oxidantes

Geralmente são descobertas novas reacções de quimiluminescência testando o analito com uma vasta gama de oxidantes fortes e redutores, sob diferentes condições químicas. Existem algumas indicações que podem ajudar a prever a possibilidade de um analito produzir quimiluminescência. Geralmente se uma molécula apresenta fluorescência nativa ou se o produto da sua oxidação é fluorescente, existe a possibilidade da sua oxidação resultar na emissão de quimiluminescência. Contudo muito frequentemente, as reacções de quimiluminescência descobertas em ensaios de rastreio não podem ser previstas, e reacções de quimiluminescência que seriam previsíveis, verifica-se que não emitem radiação.

Os oxidantes mais utilizados em reacções de quimiluminescência directa são o permanganato de potássio e o Ce (IV).

O anião permanganato tem sido aplicado à determinação de várias espécies por quimiluminescência [31,32], principalmente em meio ácido. O mecanismo de emissão de radiação não está totalmente esclarecido, mas vários estudos apontam para a formação de espécies Mn (II) de constituição desconhecida como espécies responsáveis pela emissão de radiação [33]. A maioria das determinações quimiluminométricas usando o permanganato são reacções directas que envolvem a determinação de moléculas orgânicas que possuem grupos amina ou fenol. Contudo algumas reacções envolvem o uso de fluoróforos como o sulfato de quinina [34] ou o formaldeído [35] para aumentar a intensidade de radiação emitida.

O Ce (IV) é também bastante utilizado, sendo que a oxidação ocorre em meio ácido, geralmente ácido sulfúrico. A maioria das determinações com o Ce (IV) como oxidante envolvem a utilização de um fluoróforo, sendo os mais utilizados o sulfato de quinina [36] e as rodaminas B e 6G [37,38]. Pode ainda ser utilizado o Ce (IV) como oxidante e

o sulfito de sódio como espécie excitada, actuando, neste caso, o analito como promotor de quimiluminescência, aceitando a energia transferida pelo sulfito oxidado e depois emitindo radiação [39,40].

A N-bromossuccinimida, o hexacianoferrato (III) de potássio e o peróxido de hidrogénio são menos utilizados do que o permanganato de potássio e o Ce (IV), e são sempre utilizados em meio alcalino.

1.5 Automatização de determinações quimiluminométricas

Tal como se referiu anteriormente, as aplicações analíticas tradicionais da quimiluminescência envolvem reacções altamente sensíveis, com elevados rendimentos quânticos e com tempos de semi-vida variáveis (desde décimas de segundo até alguns minutos) o que possibilita a monitorização das reacções com equipamentos simples.

Até recentemente a maioria dos luminómetros disponíveis comercialmente era baseado num procedimento discreto em que a amostra é colocada na célula que é acomodada numa câmara do luminómetro em frente à janela do fotomultiplicador e os reagentes são adicionados sucessivamente, por exemplo, por meio de uma seringa, medindo-se a intensidade de radiação emitida em função do tempo. Desta forma, o equipamento utilizado é muito simples, contudo estas determinações apresentam como desvantagem o facto de serem morosas e de estarem sujeitas a erros operacionais.

Nas determinações quimiluminométricas, usando métodos discretos, a qualidade dos resultados depende, em grande parte dos casos da experiência do operador. Um dos requisitos dos métodos quimiluminométricos é que a amostra e os reagentes sejam misturados de forma reprodutível. Geralmente a mistura entre a amostra e o reagente é obtida pela força da injecção, que no caso de ser efectuada de forma manual, não garante uma mistura reprodutível, podendo-se diminuir o problema usando um agitador magnético, que contudo, não é totalmente eficaz. Outro aspecto importante é o controlo entre o tempo em que é efectuada a mistura e o início da detecção. Principalmente quando se trata de reacções rápidas, nem sempre é fácil ao operador efectuar a sincronização da recolha de dados em relação ao início da reacção.

Outra desvantagem dos procedimentos discretos é a necessidade de uma célula independente para cada amostra e da câmara do luminómetro ter de ser aberta para

inserir cada célula, sendo necessários cuidados especiais para proteger o fotomultiplicador e impedir a sua destruição por sobre-excitação.

Devido a todas as desvantagens apresentadas pelos métodos discretos referidas anteriormente recorreu-se à automatização como forma de retirar partido das vantagens analíticas da quimiluminescência, minimizando as dificuldades associadas à sua implementação prática. Por um lado efectuou-se a mecanização e automação dos sistemas de amostragem e de adição de reagentes, desenvolveram-se leitores de placas e recorreu-se ao tratamento de dados computorizado. Com esta abordagem resolveu-se o problema da análise de um elevado número de amostras e obtiveram-se ritmos de amostragem mais elevados não alterando as vantagens decorrentes do processo de medida.

O aparecimento dos sistemas de fluxo contínuo que se dividem em segmentados e não segmentados, introduziu um novo conceito de manuseamento das soluções baseado na realização de toda a análise em fluxo, sugerindo uma nova perspectiva para ultrapassar as dificuldades das medidas por quimiluminescência anteriormente referidas.

Os métodos de fluxo contínuo segmentado não se adequam à detecção quimiluminométrica, uma vez que a necessidade de retirar a bolhas de ar antes da entrada na célula resulta num intervalo de tempo entre a mistura e a detecção, por vezes maior do que o tempo necessário para atingir o máximo de emissão de radiação.

Os métodos de fluxo contínuo não segmentado são baseados na inserção da amostra no interior de uma tubagem de dimensões reduzidas entrando em contacto com o reagente num ponto de confluência, que no caso da detecção quimiluminométrica, deve estar o mais próximo possível do fotomultiplicador, dando origem à zona reaccional. Esta zona de reacção é encaminhada para a célula de fluxo que se encontra em frente à janela do fotomultiplicador para detecção da emissão de radiação. A utilização dos métodos de

fluxo contínuo permite que a amostra sofra o tratamento químico e físico no interior do sistema de fluxo de modo a obter as espécies adequadas para a detecção quimiluminométrica e a radiação emitida pode ser medida poucas décimas de segundo após a mistura, o que é particularmente útil na monitorização de cinéticas rápidas.

De um modo geral, as técnicas de fluxo contínuo caracterizam-se por uma elevada reprodutibilidade nos processos de amostragem e de detecção, não sendo normalmente necessário atingir condições de equilíbrio físico ou químico. Efectivamente, sendo as montagens de fluxo sistemas fechados, possibilitam a reprodução das condições da análise, sendo a detecção baseada na aquisição de sinais transientes, o que resulta numa redução considerável do tempo de análise.

A possibilidade de controlo automático, de forma precisa, dos parâmetros analíticos que condicionam uma análise, proporciona a obtenção de resultados mais exactos e precisos, de forma mais rápida e segura.

Os sistemas de fluxo apresentam baixo custo de instalação e operação, com uma flexibilidade acrescida por força duma estrutura modular que permite a sua reconfiguração de forma simplificada e uma readaptação simples a novas situações analíticas e também por uma maior facilidade de operação e controlo.

A associação da detecção quimiluminométrica às metodologias de fluxo permite ultrapassar as limitações apresentadas pelos métodos discretos, nomeadamente em termos de mistura, através da implementação de sistemas analíticos automáticos e perfeitamente autónomos, que asseguram uma mistura rápida da amostra e reagentes, em condições inteiramente reprodutíveis, diminuindo a influência do operador e minimizando simultaneamente os volumes consumidos na análise.

Assim podemos concluir que as potencialidades evidenciadas pelos métodos de fluxo contínuo permitiram obviar as dificuldades apresentadas pelos métodos discretos, e

consequentemente um maior aproveitamento das características vantajosas das metodologias analíticas baseadas na quimiluminescência.

1.6 Técnicas de fluxo contínuo não segmentado

As técnicas de fluxo contínuo não segmentado caracterizadas por um escoamento contínuo, no espaço e no tempo, das soluções, são as mais divulgadas e as mais amplamente aplicadas na implementação de metodologias analíticas automáticas.

A principal inovação apresentada por este tipo de estratégia de gestão de fluidos foi o facto de não ser necessário que as medidas se efectuem em condições de equilíbrio químico, o que resulta da sua elevada reprodutibilidade nos processos de amostragem e detecção e de um controlo da dispersão da amostra.

Outra das principais vantagens exibidas pelas metodologias de fluxo contínuo não segmentado está relacionada com a sua elevada versatilidade. De facto, com o mesmo equipamento base é possível idealizar um número considerável de montagens, que se adaptam assim às necessidades de cada determinação, o que se traduz numa redução de custos.

O aparecimento da análise por injecção em fluxo (FIA) em 1975 [41] evidenciou as potencialidades deste tipo de técnica, provocando uma autêntica revolução na automatização de ensaios químicos. Desde então têm sido desenvolvidas outras técnicas de fluxo alternativas para a manipulação de soluções e controlo da dispersão das mesmas. Nos anos 90, surgiu a análise por injecção sequencial [42], tornado possível a automatização de procedimentos mais complexos, que envolvem um maior número de reagentes. Posteriormente surgiu a multicomutação [43] e a multiseringa [44], as quais se baseiam na utilização de válvulas solenóides para a criação de redes de fluxo. Mais recentemente surgiu a técnica multi-impulsão [45], cujo funcionamento se baseia na utilização de microbombas solenóides responsáveis pela criação de um fluxo pulsado.

1.6.1 Análise por injecção em fluxo (FIA)

A técnica FIA, introduzida por Ruzicka *et al* em 1975 [41], baseia-se na injecção de uma alíquota de amostra num fluxo transportador, não segmentado. Um volume de amostra definido em função das dimensões da alça (loop) de amostragem do dispositivo de injecção, normalmente uma válvula rotativa ou um injector-comutador, é introduzido num fluxo transportador e encaminhado para detecção. Durante este percurso a amostra pode ser sujeita a um conjunto de reacções e ou processos de separação.

O sistema (Figura 1.6) compreende habitualmente um dispositivo de propulsão (P), uma válvula injectora (VI) cuja alça define o volume de amostra a injectar e um dispositivo detector (D) que monitoriza a espécie a medir.

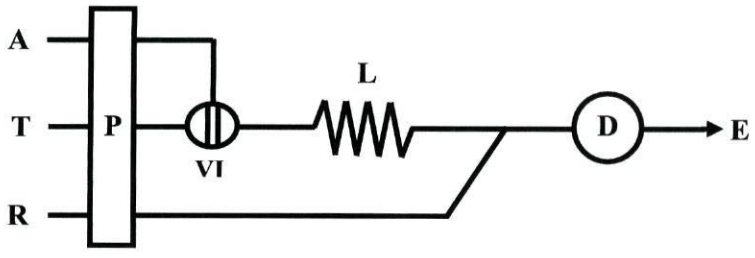


Figura 1.6 – Representação esquemática de uma montagem FIA. P – dispositivo de propulsão (bomba peristáltica); VI – válvula de injecção; L – reactor; D – detector; E – esgoto; A – amostra; T – transportador; R – reagente.

À medida que a amostra injectada se movimenta no sistema, sofre dispersão gerando-se um gradiente de concentrações, baseando-se esta metodologia de fluxo no controlo da

dispersão do segmento de amostra, no fluxo transportador. Ao atingir o detector o gradiente de concentrações é monitorizado resultando numa curva de resposta em forma de pico característica de um sistema FIA.

Os sistemas FIA caracterizam-se por montagens de fluxo de configuração simples, as quais exibem simultaneamente uma grande versatilidade e flexibilidade para adaptação a objectivos específicos. Por outro lado, as montagens FIA utilizam normalmente componentes de baixo custo e permitem um menor consumo de amostra e reagente relativamente à análise por fluxo segmentado, ao mesmo tempo que exibem uma boa reprodutibilidade.

É de ressalvar que esta técnica não implica obrigatoriamente a informatização do controlo das montagens, o que permite a sua utilização em qualquer laboratório, facto que a distingue das restantes técnicas de fluxo contínuo não segmentado, que surgiram nas três décadas seguintes.

Estas vantagens, associadas ao facto da análise requerer pequenos volumes de amostra e permitir a detecção em condições de ausência de equilíbrio químico e físico, justificam a larga utilização da técnica FIA na automatização de procedimentos analíticos nas mais diversas áreas.

As principais desvantagens da técnica FIA consistem no elevado consumo de reagentes, relativamente às técnicas de fluxo que surgiram posteriormente, ocasionado pela circulação contínua dos mesmos nas montagens, e na necessidade de reconfigurar os sistemas de forma a adaptá-los a diferentes determinações analíticas.

A aplicação do conceito de análise por injecção em fluxo na determinação por quimiluminescência foi efectuada por Rule e Seitz em 1979 [46] para determinação de peróxido de hidrogénio com luminol na presença de Cu(II) como catalisador. Desde então, e devido às potencialidades que apresenta, verificou-se um crescimento

acentuado da aplicação da FIA à detecção por quimiluminescência, como é notório pelo elevado número de trabalhos referenciados nos artigos de revisão publicados sobre detecção por quimiluminescência em FIA [47-50].

1.6.2 Análise por injecção sequencial (SIA)

A análise por injecção sequencial surgiu em 1990 [42] como forma de implementação de sistemas mais flexíveis, capazes de serem aplicados em distintas situações analíticas sem ser necessário a reconfiguração na montagem de fluxo.

A análise por injecção sequencial baseia-se na aspiração sequencial de volumes precisos de amostra e reagentes para um tubo de armazenamento, que são posteriormente dispensados para a detecção por reversão do fluxo. A aspiração das diferentes soluções é efectuada a partir de uma válvula selectora e por selecção do canal correspondente. A amostra é aspirada para o tubo de armazenamento durante um tempo preciso. De seguida a válvula selectora muda para a posição de reagente e uma alíquota deste é aspirada para o tubo de armazenamento. Finalmente a válvula selectora muda para a posição do detector e revertendo o fluxo propulsiona as zonas de amostra e reagente através do reactor para a detecção. Durante a fase de transporte e através da inversão do sentido do fluxo, ocorre a sobreposição reprodutível das zonas de amostra e reagente, originando-se assim uma zona reaccional resultante da penetração mútua das duas zonas. Um sistema SIA típico (Figura 1.7) compreende um dispositivo propulsor e uma válvula selectora de fluidos, conectados entre si por tubagem de diâmetro reduzido.

O funcionamento da montagem é controlado por computador, de forma a que o dispositivo de propulsão e a válvula selectora funcionem de modo sincronizado, sendo possível definir o volume, o sentido e a velocidade de escoamento das diferentes

soluções, o que torna possível a aplicação de uma mesma montagem para diferentes determinações, sem necessidade de reconfigurar fisicamente o sistema.

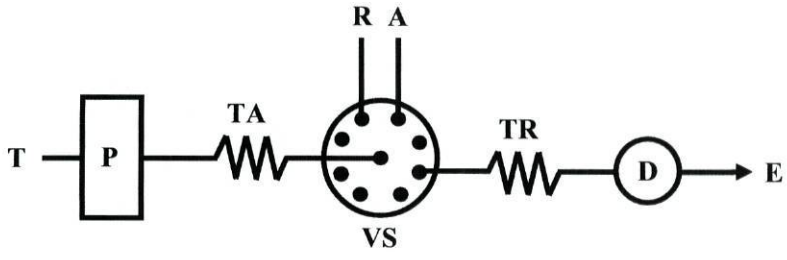


Figura 1.7 – Representação esquemática de uma montagem SIA. T – transportador; P – dispositivo de propulsão; VS – válvula selectora; TA – tubo de armazenamento; TR – tubo reactor; D – detector; E – esgoto; A – amostra; R – reagente.

De um modo geral, a elevada versatilidade deste tipo de montagem, associada a um controlo do volume de amostragem numa base temporizada, a utilização eficiente das soluções, com reduzido consumo de amostra e reagentes e baixa produção de efluentes, constituem as principais vantagens da técnica SIA relativamente à FIA.

Como desvantagens, quando comparada com a FIA, destaca-se o custo superior dos sistemas SIA, até porque a válvula selectora é mais dispendiosa que a válvula convencional utilizada em FIA, e o ritmo de amostragem mais baixo devido ao armazenamento das soluções no reactor de armazenamento e ao tempo que a válvula selectora necessita para fazer a comutação entre as diferentes posições.

A aplicabilidade da SIA à detecção por quimiluminescência foi demonstrada pela primeira vez, por Tucker *et al* na determinação de peróxido de hidrogénio e glucose

usando a reacção do luminol [51]. Contudo importa salientar que a associação da SIA à detecção por quimiluminescência é limitada devido à extensão e forma da mistura entre amostra e reagentes e também pela necessidade de armazenar a amostra e reagentes no reactor de armazenamento antes de dispensar as soluções para a célula de fluxo, o que explica a escassez de trabalhos publicados nesta área, a maioria aplicados à determinação de fármacos [52-56].

1.6.3 Multicomutação (MCFA)

A multicomutação [43,57] surgiu da necessidade crescente de sistemas de fluxo caracterizados por uma flexibilidade acrescida, facilidade de operação e versatilidade. Os sistemas de fluxo multicomutado são constituídos por redes de fluxo formadas por válvulas electromecânicas activadas por um solenóide, que actuam como monocomutadores independentes (Figura 1.8).

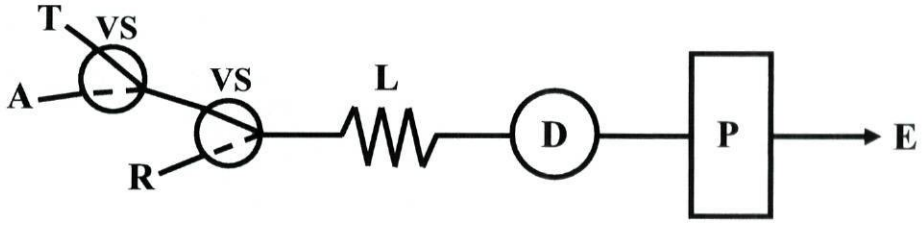


Figura 1.8 – Representação esquemática de um sistema de fluxo multicomutado típico. VS – válvula solenóide; L – reactor; D – detector; P – sistema de propulsão; E – esgoto; A – amostra; T – transportador; R – reagente.

As válvulas podem ser dispostas em distintas configurações, e actuar individualmente ou de forma combinada permitindo a criação de uma rede de fluxo com uma elevada direccionalidade, possibilitando uma grande versatilidade em termos de manipulação da zona de amostra.

A inserção da amostra no interior da montagem é efectuada por comutação das válvulas para a posição da solução de amostra, sendo o volume de amostra inserido definido em função do tempo de abertura da válvula e do caudal. A inserção das soluções numa base temporizada e o controlo electrónico do tempo de abertura da válvula assegura uma inserção de volumes de amostra reprodutíveis da ordem dos μl.

As válvulas solenóides apresentam uma grande rapidez de comutação, o que possibilita alterar e ajustar facilmente a inserção de amostra e reagentes. As alterações podem ser efectuadas simplesmente por reposição do tempo que as válvulas estão na posição aberta ou fechada ou alterando a sua sequência de comutação.

A utilização das válvulas solenóides, devido à rápida comutação entre as duas posições (mais que 10 x por segundo) permitiu a implementação prática de um conceito inovador de gestão de fluidos, denominado de amostragem binária, que consiste na intercalação de pequenas alíquotas de amostra (da ordem dos μl) com pequenas alíquotas de reagente (Figura 1.9), definidas em função de um controlo temporizado, o que proporciona uma mais rápida homogeneização da zona de amostra [58].

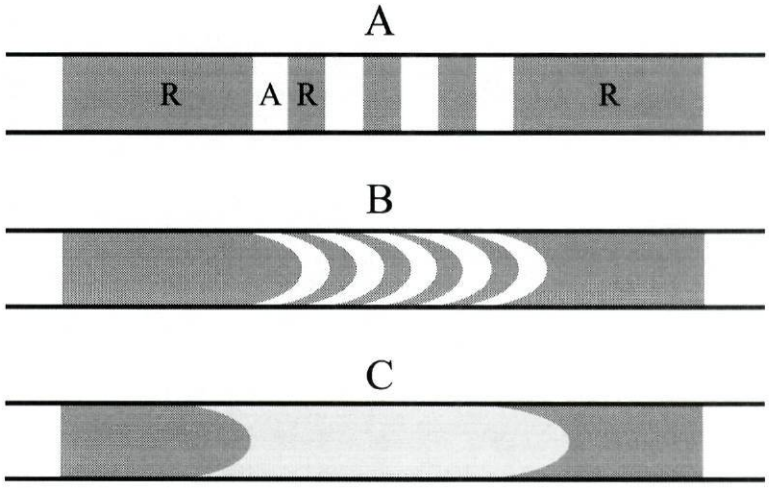


Figura 1.9 – Representação esquemática de amostragem binária. A – intercalação de pequenos segmentos de amostra e reagente; B – transporte das duas soluções; C – homogeneização da zona de amostra.

Na amostragem binária a inserção da amostra é efectuada por comutação da válvula solenóide entre as posições activada e desactivada, responsáveis pela inserção da amostra e do reagente, com tempos de comutação extremamente curtos, o que permite a intercalação de pequenas alíquotas de ambas as soluções, que ao serem transportadas para o detector sofrem dispersão mútua das interfaces resultando na rápida obtenção de uma mistura homogénea com baixa dispersão da amostra. A eficiência da mistura é largamente afectada pelo tamanho das alíquotas, quanto menor o volume das alíquotas mais eficiente é a mistura. As alíquotas inseridas podem ser todas do mesmo volume ou podem ter volumes diferentes, o que é utilizado por exemplo quando se pretende efectuar titulações com este tipo de sistema.

O controlo computorizado do processo de amostragem binária através da selecção do volume de amostra adequado assim como da razão entre as alíquotas de amostra e

reagente permite o controlo da dispersão e consequentemente da reacção química, desta forma tudo se passa como se fosse possível um controlo electrónico da dispersão.

Comparativamente às montagens FIA, que recorrem à inserção da amostra sob a forma de um volume único, a amostragem binária, favorecendo o desenvolvimento da reacção, possibilita a utilização de reactores de menores dimensões, o que por sua vez reduz a dispersão e aumenta a sensibilidade da determinação. Além disso o consumo de reagentes é acentuadamente reduzido uma vez que só é aspirada a quantidade de reagente estritamente necessária, reduzindo consequentemente, o volume de efluentes indesejáveis produzidos durante a análise.

Os sistemas multicomutados exibem como principal vantagem a sua extrema flexibilidade, uma vez que permitem a implementação de procedimentos diversos recorrendo apenas a válvulas solenóides, podendo reunir num só sistema conceitos explorados pelas diferentes técnicas de fluxo [59].

A elevada versatilidade característica da multicomutação resulta da possibilidade de alterar todas as variáveis que incidem directamente nos perfis de dispersão, sem a necessidade de reconfiguração física da montagem. Este facto representa uma grande vantagem relativamente às montagens FIA as quais são geralmente concebidas para fins específicos.

A multicomutação é capaz de um desempenho analítico semelhante ao da SIA, com a vantagem de permitir uma mistura entre amostra e reagente mais rápida e eficiente, e uma velocidade de comutação superior, em virtude das características operacionais das válvulas de inserção normalmente utilizadas. Além disso a multicomutação apresenta ritmos de amostragem mais elevados e custos inferiores da montagem analítica.

Outra vantagem da multicomutação, é que nestes sistemas a reacção química tem início durante a fase de amostragem, o que se traduz num aumento significativo do ritmo de

amostragem, enquanto que em outros sistemas de fluxo, nomeadamente nos sistemas FIA, o reagente é adicionado à amostra após a inserção desta no percurso analítico, não sendo por isso o intervalo de amostragem aproveitado para o desenvolvimento da reacção.

Uma das vantagens da multicomutação relativamente à FIA e à SIA é a possibilidade de miniaturização dos sistemas. Efectivamente o tamanho reduzido das válvulas solenóides permite a implementação de sistemas compactos e de equipamentos portáteis para efectuar análises "in situ".

Conceptualmente, a topologia de uma montagem de fluxo multicomutado pode assumir configurações distintas, assim, as válvulas solenóides podem ser colocadas em série, numa configuração linear [60], a qual pode por sua vez ser fechada resultando numa configuração circular [61]. Por outro lado as válvulas podem ser dispostas numa configuração em estrela [62], ou pode mesmo adoptar-se uma topologia hierarquizada. Podem também utilizar-se combinações de configurações, o que será sempre condicionado pela análise a realizar.

O posicionamento em linha permite reduzir o número de válvulas a utilizar, para a mesma aplicação (Figura 1.8), enquanto que a utilização de uma configuração em estrela obriga à inclusão de mais válvulas e de um ponto de confluência. Outra particularidade deste tipo de sistema consiste no facto de, na maior parte das montagens, a unidade de propulsão se encontrar posicionada após o detector, sendo as soluções aspiradas por um único canal, havendo uma redução do consumo de reagentes. A colocação do dispositivo de propulsão, antes da rede de válvulas solenóides, aumenta a complexidade do sistema, uma vez que obriga a utilizar um canal por cada solução e recomenda a recirculação das soluções, de modo a reduzir o seu consumo. No entanto esta configuração contribui para a redução do aparecimento de bolhas no sistema.

O controlo da dispersão e a maior versatilidade associada à multicomutação possibilita uma fácil implementação de estratégias de gradiente como por exemplo a amostragem de zonas [60], e o desenvolvimento de procedimentos para determinações multiparamétricas [58]. A facilidade de automação das válvulas solenóides permite ainda desenvolver métodos de análise totalmente automatizados.

Uma limitação da multicomutação é a pouca disponibilidade comercial dos dispositivos de controlo quer a nível de interfaces electrónicas, quer a nível de software para o controlo das válvulas, o que resulta no facto da maior parte dos trabalhos publicados em multicomutação serem realizados recorrendo a dispositivos construídos no próprio laboratório. No entanto esta limitação não é exclusiva da multicomutação, de facto é uma desvantagem comum às técnicas de fluxo automatizadas.

Sendo uma técnica bastante mais recente do que a FIA e a SIA, a multicomutação tem vindo a ganhar o seu próprio espaço entre as metodologias de fluxo. Considerando que as reacções quimiluminométricas requerem uma rápida mistura entre a amostra e o reagente e próximo do fotomultiplicador, a possibilidade da aplicação do conceito de amostragem binária resultando numa homogeneização rápida e eficiente da zona reaccional proporcionada pela multicomutação torna-a interessante para associar à detecção por quimiluminescência. Assim entre as várias aplicações dos sistemas de fluxo multicomutado à determinação quimiluminométrica podemos encontrar a determinação de fenóis em águas [63] a determinação de ácido láctico em iogurte [64], a determinação de glucose [65], a determinação de vários pesticidas [66-68] e de hidroquinona [69].

No trabalho desenvolvido e agora apresentado nesta dissertação foram também exploradas as vantagens da associação da multicomutação com a quimiluminescência

para a determinação de propranolol (Capítulo 3) [70] e clomipramina (Capítulo 4) [71] em formulações farmacêuticas.

1.6.4 Multiseringa (MSFIA)

A técnica de fluxo multiseringa foi descrita em 1999, por Cerdà *et al* [44] e caracteriza-se pela utilização de seringas como dispositivo de propulsão. A técnica apresenta assim como elemento básico uma multiseringa (Figura 1.10), que permite o movimento simultâneo de 4 seringas, que podem ter capacidades diferentes permitindo que os diferentes canais apresentem diferentes caudais, uma vez que são accionadas simultaneamente e à mesma velocidade.

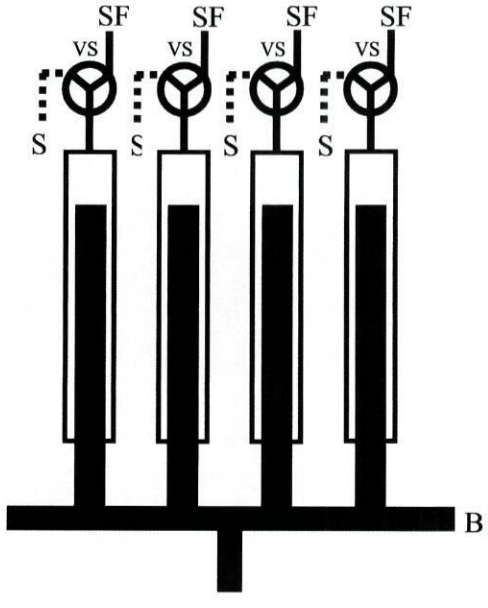


Figura 1.10 – Representação esquemática de uma multiseringa. B. – barra condutora dos pistões; S – reservatório de solução; SF – Sistema de fluxo; VS – válvula solenóide.

As seringas encontram-se ligadas em bloco a um único motor de uma bureta automática convencional e possuem um êmbolo responsável pelo seu enchimento e esvaziamento. À saída de cada seringa foi incorporada uma válvula solenóide de 3 vias que permite ligar a seringa ao sistema ou ao reservatório da solução que contém, independentemente do deslocamento do êmbolo.

A multiseringa abre assim novas possibilidades em termos de sistemas de fluxo, já que combina um modo de operação multicanal, com uma elevada precisão, associada à dispensa de volumes pelas seringas. Adicionalmente, a presença de uma válvula solenóide, na extremidade de cada seringa, traduz-se num acréscimo de flexibilidade dos sistemas e resulta numa redução considerável do consumo de reagentes. De facto, apesar do movimento das seringas ocorrer de forma sincronizada, cada uma delas encontra-se conectada através da válvula solenóide, alternativamente ao sistema e ao reservatório de solução que comporta, funcionando sem interferir com os outros canais, quando tal é necessário. No entanto, o funcionamento com base em seringas de pistão requer o seu reenchimento periódico, com as soluções respectivas entretanto consumidas, facto que pode comprometer o ritmo de amostragem.

Neste tipo de sistema, a introdução da amostra faz-se recorrendo a dispositivos adicionais já que a utilização de uma seringa como reservatório de amostra, resultaria em fenómenos de contaminação das amostras seguintes, implicando um procedimento de lavagem muito rigoroso e demorado, que comprometeria o ritmo de amostragem. Deste modo, para a introdução da amostra no sistema são utilizadas válvulas de injecção, válvulas de selecção ou válvulas solenóides, podendo a quantidade de amostra ser definida quer em termos de tempo quer em termos de volume [72].

A definição da quantidade de amostra em termos de tempo reside na aspiração de um determinado volume de amostra, definido pelo caudal e pelo tempo durante o qual o

dispositivo propulsor está activado, para um reactor de armazenamento. De seguida por reversão do fluxo e após comutação da válvula, a amostra é impulsionada pelo transportador para o percurso analítico (Figura 1.11 A). No caso da definição da quantidade de amostra em termos de volume é baseada na retenção de um determinado volume numa porção de tubo bem definida, entre duas válvulas solenóides, que posteriormente e após comutação das válvulas, é impulsionado pelo transportador (Figura 1.11 B) para o percurso analítico.

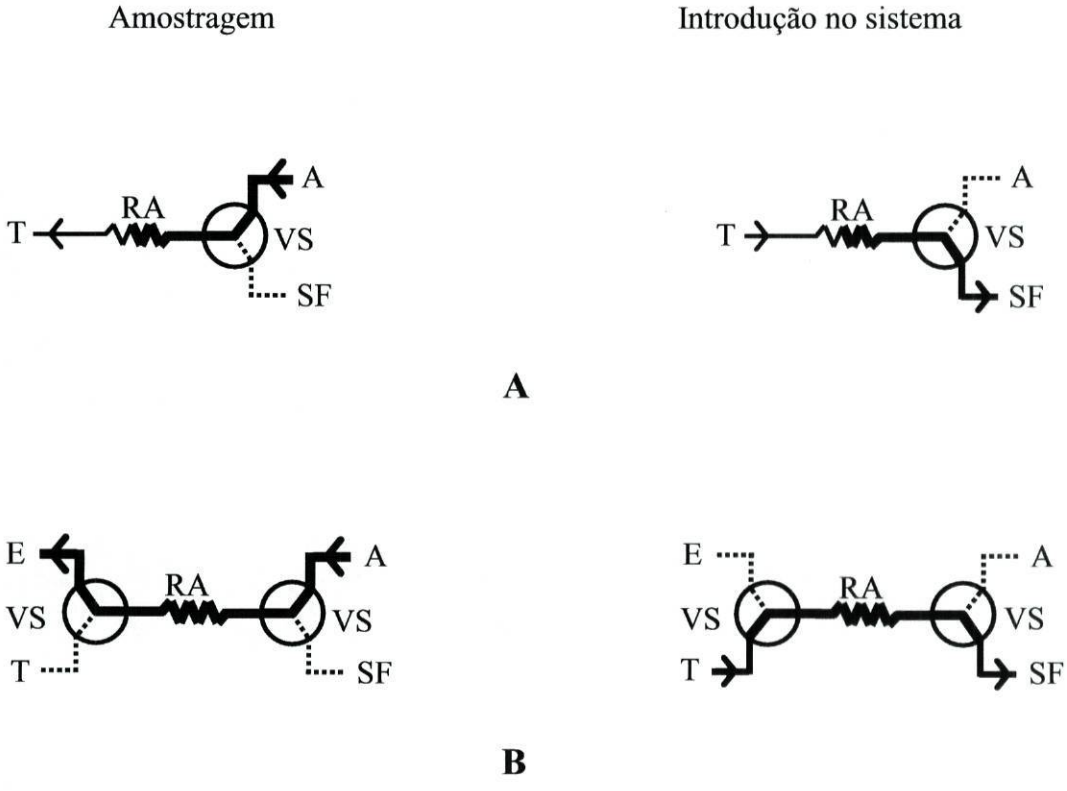


Figura 1.11 – Introdução da amostra em termos de tempo (A) e em termos de volume (B). As linhas contínuas correspondem às soluções em fluxo e as linhas a tracejado correspondem às soluções paradas. VS – válvulas solenóides; RA – reactor de armazenamento; A – amostra; T – transportador; SF – sistema de fluxo; E – esgoto.

A MSFIA foi pela primeira vez associada à detecção quimiluminométrica por Pizà *et al* [73] para estudos de degradação da vitamina B_{12}, através da oxidação do luminol catalizada pelo Co (II). Posteriormente foi aplicada à determinação de ortofosfatos em águas [74], de glucose em bebidas não alcoólicas, sumos de fruta e urina [75,76]. Apesar de ser uma técnica ainda muito recente já demonstrou ser atractiva para a aplicação a reacções de quimiluminescência e as potencialidades desta associação foram recentemente referenciadas por Miró et al num artigo de revisão [77].

1.6.5 Multi-impulsão (MPFS)

A análise em fluxo contínuo recorrendo a sistemas multi-impulsão constitui um desenvolvimento bastante recente em termos de técnicas de fluxo, distinguindo-se das anteriores por ser baseada em fluxos pulsados e por não requerer válvulas de injecção e dispositivos específicos de comutação [45,78]. De facto, os sistemas de fluxo multi-impulsão (Figura 1.12) são baseados na utilização de bombas solenóides de reduzidas dimensões, que actuam simultaneamente como portas de inserção de amostra e reagentes, dispositivos de propulsão de soluções e elementos monocomutadores, criando um conceito de manipulação de soluções que torna desnecessária a utilização de dispositivos adicionais.

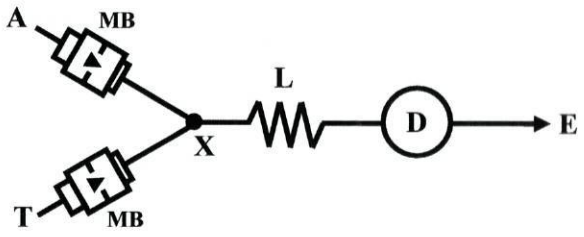


Figura 1.12 – Representação esquemática de um sistema multi-impulsão típico. MB – microbomba solenóide; X – ponto de confluência; L – reactor; D – detector; E – esgoto; T – transportador; A – amostra.

A actuação das microbombas origina um fluxo turbulento, causado pelo deslocamento repentino do diafragma da microbomba resultando num movimento caótico das soluções em todas as direcções, o que torna a mistura entre amostra e reagentes mais rápida e eficaz do que a obtida em condições de fluxo laminar típicas das metodologias anteriormente referidas. Deste modo, em situações de fluxo pulsado a eficiência da mistura é bastante superior, obtendo-se sinais analíticos mais elevados para idênticos volumes de amostra e reagentes, mesmo em situações de limitada dispersão. Este aspecto é tão mais evidente quanto maior é o volume de amostra, uma vez que, em virtude de uma mistura mais eficiente, se obtém uma maior extensão da reacção. Por outro lado há que considerar também a menor dispersão axial da zona de amostra e maior reprodutibilidade do sinal analítico.

A eficiente mistura obtida com os sistemas de fluxo multi-impulsão é ainda confirmada pela semelhança de sinal obtida quando se usam diferentes estratégias de amostragem

como amostragem binária e confluência de zonas, uma vez que a natureza pulsante do fluxo promove uma extensa mistura no ponto onde ocorre a confluência das soluções.

O grau de mistura obtido depende também do volume de pulso, para um volume de pulso maior o contacto entre as soluções de amostra e reagente é mais difícil do que para um volume menor. De facto a utilização de microbombas com pequeno volume de pulso torna possível uma mistura quase imediata entre a amostra e o reagente permitindo uma redução do comprimento dos reactores.

Nos sistemas de fluxo multi-impulsão o volume de amostra é definido pelo número de pulsos usados para operar a bomba solenóide e pelo volume de pulso da bomba solenóide em utilização. Assim é possível um controlo efectivo do volume de amostra e reagentes inseridos no sistema não sendo afectado por variações no caudal ou na contagem do tempo, e ainda uma elevada versatilidade na selecção do volume de amostra inserida, sendo a única limitação o facto de que o volume seleccionado deve ser um múltiplo do volume de pulso.

O volume de pulso em conjunto com a frequência de pulso define o caudal das soluções proporcionando um controlo efectivo do mesmo, possibilitando também uma monitorização efectiva da posição da zona de amostra no interior do sistema, o que faz com que os sistemas multi-impulsão possam constituir uma alternativa a outras técnicas de fluxo na aplicação em determinações cinéticas, com detecção de zonas definidas da amostra por paragem de fluxo para desenvolvimento da reacção.

As excelentes características de mistura dos sistemas de fluxo multi-impulsão possibilitam ainda minimizar a distorção dos sinais analíticos originados pelas diferenças de índice de refracção (efeito Schlieren) de soluções intercaladas no sistema e misturar eficientemente soluções com diferentes viscosidades [45], tornando viável a

realização das determinações usando sistemas de fluxo muito simples, sem a necessidade de recorrer a estratégias complementares para compensar este fenómeno.

Uma vez que incorporam dispositivos monocomutadores autopropulsores, os sistemas de fluxo multi-impulsão possibilitam a implementação de sistemas versáteis e de fácil controlo em que é possível incorporar uma bomba por solução, o que permite que as soluções sejam introduzidas no sistema apenas quando necessário, o que se traduz num baixo consumo de amostra e reagentes. Considerando que cada bomba actua individualmente, são facilmente implementadas diferentes estratégias de inserção da amostra tais como a inserção por volume único, amostragem binária ou por confluência de zonas, sem alteração da montagem de fluxo.

A fácil combinação de microbombas e válvulas solenóides resulta em vantagens acrescidas em termos de versatilidade e capacidade analítica, através da sinergia entre as capacidades propulsoras e comutadoras das bombas e a facilidade de direccionamento das soluções proporcionada pelas válvulas solenóides.

O facto de incorporarem apenas um tipo de dispositivo, torna os sistemas multi-impulsão muito robustos, viabilizando a sua implementação na automatização de procedimentos analíticos. Adicionalmente, as reduzidas dimensões das microbombas solenóides facilitam a implementação de sistemas analíticos miniaturizados embora sem perda de uma elevada capacidade analítica.

O fluxo pulsado foi já aplicado à detecção quimiluminométrica por Lewis et al [79,80] contudo os trabalhos propostos diferem da multi-impulsão não só em termos da estratégia usada para produzir os pulsos, mas também porque cada pulso é seguido de uma pausa relativamente longa, enquanto que na multi-impulsão o fluxo pulsado é contínuo.

O conceito de multi-impulsão foi pela primeira vez aplicado à detecção por quimiluminescência no trabalho desenvolvido e agora apresentado nesta dissertação (Capítulos 5-9) [81-83], onde são exploradas as potencialidades do fluxo pulsado na obtenção de uma mistura rápida e eficiente, a qual constitui um ponto crucial das determinações quimiluminométricas.

1.7 Objectivos da dissertação

Sendo uma das indústrias mais importantes a nível mundial, a indústria farmacêutica está também sujeita a uma elevada regulamentação. Nos últimos anos as normas relacionadas com o controlo de qualidade dos produtos farmacêuticos têm-se tornado mais restritas, levando a um desenvolvimento quer de novas metodologias analíticas quer a automatização dos procedimentos já existentes.

De facto a análise de fármacos, quer na forma de preparação farmacêutica quer como matéria-prima para a sua produção, e a sua determinação, conjuntamente com a dos seus metabolitos, em amostras biológicas, constitui grande parte da actividade desenvolvida pelos laboratórios farmacêuticos e clínicos.

A precisão e a sensibilidade das análises estão fortemente relacionadas com a técnica de medida e o sistema reaccional empregados. Têm sido efectuados grandes esforços no sentido de optimizar sistemas convencionais e encontrar novos sistemas, visando atender às novas e crescentes necessidades do mercado. Neste contexto, a quimiluminescência destaca-se por apresentar características de grande aplicabilidade analítica.

A associação da quimiluminescência com a técnica FIA resultou num acentuado crescimento das suas aplicações na análise farmacêutica evidenciado pela enorme quantidade de trabalhos publicados. A técnica SIA tem sido também utilizada na análise farmacêutica por quimiluminescência, embora de uma forma mais reduzida devido às limitações referidas anteriormente neste capítulo. As técnicas mais recentes como a multicomutação, a multiseringa e a multi-impulsão têm um campo de aplicação por enquanto bastante limitado, contudo as perspectivas futuras, suportadas por um grande potencial analítico, são muito positivas, como se demonstra no trabalho realizado no âmbito desta dissertação.

1.8 Referências bibliográficas

[1] A.M. Garcia-Campaña, W.R.G. Baeyens, Chemiluminescence in Analytical Chemistry, Marcel Dekker, New York, 2001.

[2] K. Robards, P.J. Worsfold, Anal. Chim. Acta 266 (1992) 147.

[3] A.W. Knight, G.M. Greenway, Analyst 119 (1994) 879.

[4] G.B. Schuster, S.P. Schmidt, Adv. Phys. Org. Chem. 18 (1982) 187.

[5] L.J. Kricka, G.H.G. Thorpe, Analyst, 108 (1983) 1274.

[6] R. Weinberger, C.A. Mannan, M. Cerchio, M.L. Grayeski, J. Chromatogr. A 288 (1984) 445.

[7] K.W. Sigvardson, J.M. Kennish, J.W. Birks, Anal Chem. 56 (1984) 1096.

[8] R.W. Abbott, A. Townshend, R. Gill, Analyst 111 (1986) 635.

[9] H.O. Albrecht, Z. Phys. Chem. 136 (1928) 321.

[10] W.R. Seitz, W.W. Suydam, D.M. Hercules, Anal. Chem. 44 (1972) 957.

[11] W.R. Seitz, D.M. Hércules, Anal. Chem. 44 (1972) 2143.

[12] B. Yan, P.J. Worsfold, Anal. Chim. Acta 236 (1990) 287.

[13] K. Hool, T.A. Nieman, Anal. Chem. 60 (1988) 834.

[14] D. Gonzalez-Robledo, M. Silva, D. Pérez-Benedito, Anal. Chim. Acta 228 (1990) 123.

[15] P. Viñas, I.L. Garcia, J.A.M. Gil, J. Pharm. Biomed. Anal. 11 (1993) 15.

[16] H. Cui, Q. Li, R. Meng, H. Zhao, C. He, Anal. Chim. Acta 362 (1998) 151.

[17] H. Cui, R. Meng, H. Jiang, Y. Sun, X. Lin, Luminescence 14 (1999) 175.

[18] D.F. Marino, J.D. Ingle, Jr, Anal. Chem. 53 (1981) 294.

[19] K. Nakashima, H. Yamasaki, R. Shimoda, N. Kuroda, S. Akiyama, W.R.G. Baeyens, Biomed. Chromatogr. 11 (1997) 63.

[20] K. Glue, W. Petsch, Angew. Chem. 48 (1935) 57.

[21] L.A. Montano, J.D. Ingle Jr, Anal. Chem. 51 (1979) 919.

[22] L.L. Klopf, T.A. Nieman, Anal. Chem. 56 (1984) 1539.

[23] L.A. Montano, J.D. Ingle Jr., Anal. Chem. 51 (1979) 926.

[24] R.L. Veazey, T.A. Nieman, Anal. Chem. 51 (1979) 2092.

[25] D. Yao, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis, Anal. Chim. Acta 467 (2002) 133.

[26] R.D. Gerardi, N.W. Barnett, S.W. Lewis, Anal. Chim. Acta 378 (1999) 1.

[27] K.A. Fähnrich, M. Pravda, G.G. Guilbault, Talanta 54 (2001) 531.

[28] P.A. Sherman, J. Holzbecher, D.E. Ryan, Anal. Chim. Acta 97 (1978) 21.

[29] M. Tsunoda, K. Imai, Anal. Chim. Acta 541 (2005) 13.

[30] P.J.M. Kwakman, U.A.Th. Brinkman, Anal. Chim. Acta 266 (1992) 175.

[31] T. Nakagama, M. Yamada, S. Suzuki, Anal. Chim. Acta 217 (1989) 371.

[32] B.J. Hindson, N.W. Barnett, Anal. Chim. Acta 445 (2001) 1.

[33] N.W. Barnett, B.J. Hindson, P. Jones, T.A. Smith, Anal. Chim. Acta 451 (2002) 181.

[34] F.A. Aly, N.A. Alarfaffj, A.A. Alwarthan, Talanta 47 (1998) 471.

[35] N.T. Deftereos, A.C. Calokerinos, C.E. Efstathiou, Analyst 118 (1993) 627.

[36] Y. Zhao, W.R.G. Baeyens, X. Zhang, A.C. Calokerinos, K. Nakashima, G. Van der Weken, Analyst 122 (1997) 103.

[37] A.A. Al-Warthan, Anal. Sci. 10 (1994) 919.

[38] Y. Rao, X. Zhang, G. Luo, W.R.G. Baeyens, Anal. Chim. Acta 396 (1999) 273.

[39] I.I. Koukli, A.C. Calokerinos, Analyst 115 (1990) 1553.

[40] Y. Rao, Y. Tong, X. Zhang, G. Luo, W.R.G. Baeyens, Anal. Chim. Acta 416 (2000) 227.

[41] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Anal. Chim. Acta 78 (1975) 145.

[42] J. Ruzicka, G.D. Marshall, Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329.

[43] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, Anal. Chim. Acta 293 (1994) 129.

[44] V. Cerda, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra; P. Altimira, P. Sitjar; Talanta 50 (1999) 695.

[45] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Anal.Chim. Acta 466 (2002) 125.

[46] G. Rule, W.R. Seitz, Clin. Chem. 25 (1979) 1635.

[47] A. Nabi, M. Yaqoob, M. Anwar, Lab. Robotics Automat. 11 (1998) 91.

[48] P. Fletcher, K.N. Andrew, A.C. Calokerinos, S. Forbes, P.J. Worsfold, Luminescence 16 (2001) 1.

[49] Y.F. Mestre, L.L. Zamora, J.M. Calatayud, Luminescence 16 (2001) 213.

[50] O. Solich, H. Sklenářová, M. Polášek, R. Karliček, J. Flow Injection Anal. 18 (2001) 13.

[51] D.J. Tucker, B. Toivola, C.H. Pollema, J. Ruzicka, G.D. Chirstian, Analyst 119 (1994) 975.

[52] R.W. Min, J. Nielsen, J. Villadsen, Anal. Chim. Acta 312 (1995) 149.

[53] N.W. Barnett, C.E. Lenchan, S.W. Lewis, D.J. Tucker, K.M. Essery, Analyst 123 (1998) 601.

[54] H. Paseková, M. Polášek, Talanta 52 (2000) 67.

[55] H. Paseková, M. Polášek, J.F. Cigarro, J. Dolejšová, Anal. Chim. Acta 438 (2001) 165.

[56] N. Anastos, N.W. Barnett, B.J. Hindson, C.E. Lenehan, S.W. Lewis, Talanta 64 (2004) 130.

[57] F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, Anal. Chim. Acta 468 (2002) 119.

[58] P.B. Martelli, B.F. Reis, E.A.M. Kronka, H. Bergamin Fº, M. Korn, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, A.N. Araújo, Anal. Chim. Acta 308 (1995) 397.

[59] E.A.G. Zagatto, B.F. Reis, C.C. Oliveira, R.P. Sartini, M.A.Z. Arruda, Anal. Chim. Acta 400 (1999) 249.

[60] A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 310 (1995) 447.

[61] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, Anal. Chim. Acta 377 (1998) 103.

[62] E.A.M. Kronka, B.F. Reis, M. Korn, H. Bergamin Fº, Anal. Chim. Acta 334 (1996) 287.

[63] J. Michalowski, P. Halaburda, A. Kojlo, Anal. Lett. 33 (2000) 1373.

[64] P.B. Martelli, B.F. Reis, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, Talanta 54 (2001) 879.

[65] C.K. Pires, P.B. Martelli, B.F. Reis, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, J. Autom. Method. Manag. 25 (2003) 109.

[66] M. Palomeque, J.A.G. Bautista, M.C. Icardo, J.V.G. Mateo, J.M. Calatayud, Anal. Chim. Acta 512 (2004) 149.

[67] A. Chivulescu, M.C. Icardo, J.V.G. Mateo, J.M. Calatayud, Anal. Chim. Acta 519 (2004) 113.

[68] J.R. Albert-Garcia, M.C. Icardo, J.M. Calatayud, Talanta 69 (2006) 608.

[69] B.G.T. Corominas, M.C. Icardo, L.L. Zamora, J.V.G. Mateo, J.M. Calatayud, Talanta 64 (2004) 618.

[70] K.L. Marques, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005) 886.

[71] K.L. Marques, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 518 (2004) 31.

[72] M.A. Segundo, H.M. Oliveira, J.L.F.C. Lima, M.I.G.S. Almeida, A.O.S.S. Rangel, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 207.

[73] N. Pizà, M. Miró, G. Armas, E. Becerra, J.M. Estela, V. Cerdà, Anal. Chim. Acta 467 (2002) 155.

[74] I.P.A. Morais, M. Miró, M. Manera, J.M. Estela, V. Cerdà, M.R.S. Souto, A.O.S.S. Rangel, Anal. Chim. Acta 506 (2004) 17.

[75] N. Pizà, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, Anal. Chem. 76 (2004) 773.

[76] M. Manera, M.Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, Anal. Chim. Acta 508 (2004) 23.

[77] M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, Anal. Chim. Acta 541 (2005) 57.

[78] J.L.F.C. Lima, J.L.M. Santos, A.C.B. Dias, M.F.T. Ribeiro, E.A.G. Zagatto, Talanta 64 (2004) 1091.

[79] S.W. Lewis, P.S. Francis, K.F. Lim, G.E. Jenkins, X.D. Wang, Analyst 125 (2000) 1869.

[80] S.W. Lewis, P.S. Francis, K.F. Lim, G.E. Jenkins, Anal. Chim.Acta 461 (2002) 131.

[81] K.L. Marques, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 452.

[82] S.R.P. Meneses, K.L. Marques, C.K. Pires, J.L.M. Santos, E. Fernandes, J.L.F.C. Lima, E.A.G. Zagatto, Anal. Biochem. 345 (2005) 90.

[83] C.K. Pires, K.L. Marques, J.L.M. Santos, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, E.A.G. Zagatto, Talanta 68 (2005) 239.

CAPÍTULO 2

Aspectos gerais da parte experimental

2. Aspectos Gerais da Parte Experimental

2.1 Introdução

Neste capítulo são abordados os aspectos gerais comuns aos diversos trabalhos apresentados em cada um dos capítulos seguintes.

São assim descritos os procedimentos utilizados na preparação das soluções, nomeadamente em termos de padrões e amostras, bem como os materiais, técnicas e produtos usados. São também referidos os equipamentos utilizados no decurso dos trabalhos, salientando-se as suas características e modo de funcionamento. Destacar-se-á neste contexto, o equipamento de uso geral utilizado na concepção das montagens de fluxo desenvolvidas.

É ainda apresentado o procedimento de optimização seguido no desenvolvimento das metodologias propostas e o tratamento estatístico usado na generalidade dos capítulos, para avaliação da qualidade dos resultados obtidos. Dada a singularidade do tratamento dos dados apresentados no Capítulo 9, os procedimentos utilizados foram referenciados próprio capítulo.

2.2 Reagentes e soluções

Em todos os trabalhos desenvolvidos a água utilizada na preparação das soluções era bidesionizada, com uma conductividade específica inferior a 0,1 $\mu S\ cm^{-1}$, obtida a partir de um dispositivo da marca Millipore modelo Milli-Q.

Os reagentes usados na preparação das soluções eram de qualidade analítica e foram utilizados sem qualquer tratamento de purificação adicional.

As soluções padrão concentradas eram obtidas por pesagem rigorosa do respectivo sólido em balança analítica da marca Mettler Toledo, modelo AG285 com sensibilidade de 0,00001 g, e dissolução em solvente apropriado, em material de vidro classe A, adequadamente lavado. As soluções padrão de trabalho eram obtidas por diluição rigorosa da solução mais concentrada usando pipetas automáticas LabMate HTL modelos LM100, LM1000 e LM5000 de volume variável e com capacidades máximas de 100, 1000 e 5000 µl, respectivamente. As pipetas automáticas eram regularmente calibradas por medição de água e pesagem.

Para preparação das amostras das formulações farmacêuticas a submeter a análise recorria-se ao procedimento descrito na Farmacopeia Portuguesa VII [1]. Numa primeira fase pesavam-se 20 comprimidos que eram de seguida pulverizados. Posteriormente, tomava-se uma quantidade do sólido rigorosamente pesado e procedia-se à sua dissolução com um solvente adequado. Quando a forma farmacêutica a analisar era líquida (injectável ou solução oral) tomava-se um volume rigorosamente medido e diluía-se com o solvente apropriado.

2.3 Instrumentação

As determinações espectrofotométricas realizadas para implementação dos métodos de referência, nas determinações de propranolol, clomipramina e metformina, com o objectivo de avaliar comparativamente os resultados fornecidos pelas metodologias desenvolvidas, foram realizadas num espectrofotómetro de UV/VIS, de feixe duplo, da marca Perkin Elmer, modelo Lambda 45.

As determinações cromatográficas, utilizadas como método de referência na determinação de fluoxetina foram realizadas num cromatógrafo da marca Merck Hitachi Lachrom, equipado com um detector L-7455, uma bomba L-7100 e uma interface D-7000. Neste equipamento foram usadas colunas Waters Symmetry C_{18} (150-mm x 3,9-mm d.i., com partículas de 5 μm de diâmetro).

Quando necessário, o pH das soluções usadas nos vários trabalhos, era medido num milivoltímetro da marca Crison, modelo GLP 22 equipado com um eléctrodo de vidro combinado de AgCl/Ag e solução KCl 3 mol l^{-1} saturada com AgCl, da mesma marca modelo 52-02.

2.4 Componentes dos sistemas de fluxo

O desenvolvimento das metodologias analíticas propostas foi baseado na implementação de montagens de fluxo, com uma caracterização e um desempenho condicionados aos objectivos pretendidos, e que, embora divergindo nos princípios gerais de funcionamento, exibiam recursos e componentes comuns, nomeadamente no que diz respeito aos dispositivos de propulsão, dispositivos de inserção da amostra, dispositivos de detecção e sistema de controlo, que constituíam os componentes básicos dos sistemas analíticos cujo desenvolvimento se refere nesta dissertação.

2.4.1 Dispositivos de propulsão

A escolha do dispositivo de propulsão a utilizar em cada montagem de fluxo, foi condicionado pelo tipo de metodologia de fluxo pretendida. Assim os sistemas de fluxo multicomutado desenvolvidos para as determinações de propranolol e clomipramina utilizaram como sistema de propulsão a bomba de pistão. Os sistemas de fluxo multi-impulsão desenvolvidos para as restantes determinações usaram como sistema de propulsão microbombas solenóides.

2.4.1.1 Bombas de pistão

As bombas de pistão eram da marca Crison modelo Micro BU 2031 equipadas com seringas de volume variável. O funcionamento das bombas de pistão era baseado no movimento de um pistão ou êmbolo que era operado por um motor passo-a-passo, o qual era controlado externamente por um microcomputador. O curso do êmbolo da

seringa correspondia a 2500 passos dependendo o volume por passo do volume da seringa acoplada.

No sistema de fluxo desenvolvido para a determinação de propranolol foram utilizadas duas bombas de pistão equipadas com seringas de 5,0 e 2,5 ml o que correspondia a um volume por passo de 2 e 1 µl respectivamente. Nesta montagem uma das bombas era responsável pela propulsão de duas soluções tendo sido utilizada no modo impulsão e de aspiração, enquanto a outra bomba era responsável pela propulsão de apenas uma solução, tendo sido usada no modo de impulsão.

No sistema de fluxo desenvolvido para a determinação de clomipramina foi utilizada apenas uma bomba de pistão equipada com uma seringa de 10 ml, o que correspondia a um volume por passo de 4 µl, a qual era responsável pela propulsão de todas as soluções, tendo sido usada no modo de impulsão e aspiração.

2.4.1.2 Micro-bombas solenóides

As microbombas solenóides utilizadas eram da marca BIOCHEMvalve Inc., modelo 090SP12-8 de pulso fixo de 8 µl.

O funcionamento das bombas era baseado no deslocamento de um diafragma por acção de um solenóide. Na posição de repouso o diafragma da bomba encontrava-se na posição fechada. Quando a voltagem era aplicada o solenóide era activado puxando o diafragma, isto permitia que o fluído entrasse na câmara da bomba. Quando a voltagem era retirada, o solenóide era desactivado voltando à sua posição inicial e deste modo forçava o diafragma a voltar à posição fechada, dispensando o fluído que se encontrava no interior da câmara.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

As microbombas solenóides apresentavam elevada precisão nos volumes dispensados; elevada resistência química; reduzido volume interno; alimentação a 12 V e podiam atingir frequências de pulso de 250 min^{-1}. Para cada solução, a frequência de pulso determina o caudal, enquanto o número de pulsos define o volume inserido no percurso analítico.

2.4.2 Dispositivos de inserção

Nas montagens dos sistemas de fluxo multicomutado para as determinações de propranolol e clomipramina um dos elementos fundamentais são as válvulas solenóides que permitem a inserção da amostra no percurso analítico. A inserção das amostras era efectuada por comutação das válvulas para a posição da solução de amostra, permanecendo nesta posição durante um intervalo de tempo definido, denominado tempo de amostragem (t_a) que permitia estabelecer, em função do caudal utilizado, o volume amostrado.

As válvulas solenóides (válvulas com activação electromecânica por solenóide) eram da marca NResearch Inc.. Foram utilizados dois tipos fundamentais de válvulas solenóides: válvulas de 3 vias (uma entrada/duas saídas) modelo 161 T031 (Figura 2.1) e válvulas de 2 vias (uma entrada/uma saída) modelo 161 T011 (normalmente fechada).

O funcionamento das válvulas era condicionado pela direcção da pressão exercida sobre uma membrana em teflon, que define o percurso das soluções: no caso das válvulas de 3 vias, o accionamento do núcleo do solenóide empurrava a membrana de teflon, estabelecendo um dos percursos; após o desligar da válvula, uma mola helicoidal recolocava a membrana de teflon na sua posição inicial estabelecendo o percurso alternativo. No caso das válvulas de 2 vias, uma mola exercia pressão sobre a membrana

de teflon obstruindo o percurso (válvulas normalmente fechadas) e quando a válvula era accionada, o núcleo do solenóide pressionava a membrana na direcção contrária, promovendo a abertura da válvula.

Por vezes, quando se usam válvulas solenóides de 3 vias e a força exercida pelo dispositivo propulsor é elevada, forma-se um diferencial de pressão, de modo que a membrana não consegue manter um dos percursos totalmente fechado, verificando-se movimento das soluções pelas duas vias, causando irreprodutibilidade do sinal analítico. Uma alternativa para resolver este problema é a utilização de duas válvulas de 2 vias em vez de uma válvula de 3 vias.

As válvulas apresentavam reduzidos volumes mortos; reduzido volume interno; pressão máxima de funcionamento de 30 psi; curto tempo de resposta, permitindo frequências de comutação de 10 Hz; elevada resistência química (revestimento em PTFE); baixo custo e alimentação a 12 V.

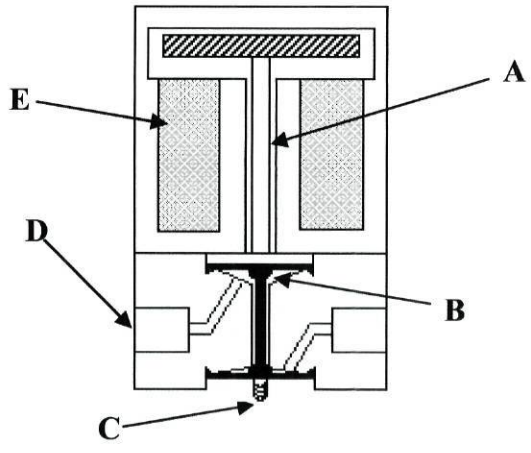


Figura 2.1 – Representação esquemática da válvula solenóide de 3 vias: A – solenóide; B – membrana de teflon; C – mola helicoidal; D – corpo em teflon para ligação das tubagens; E – coil (bobina)

2.4.3 Tubagem e outros componentes das montagens

Os diferentes elementos dos sistemas de fluxo desenvolvidos estavam conectados entre si por tubagens em teflon (PTFE) da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm. A geometria dos reactores foi estabelecida por entrelaçamento das tubagens sobre uma malha de plástico de forma a intensificar o transporte radial e diminuir o transporte laminar das soluções ao longo do percurso. As confluências utilizadas eram de construção laboratorial e fabricadas em perspex, com diferentes configurações.

2.4.4 Dispositivos de detecção

O dispositivo de detecção incorporado nas montagens de fluxo era um luminómetro da marca Camspec modelo CL-2 equipado com uma célula de fluxo com um volume óptico de 60 µl e um percurso óptico de 5 mm. A detecção da radiação emitida era efectuada através de um fotomultiplicador, o qual apresentava uma zona de resposta para comprimentos de onda no intervalo de 320 a 600 nm.

A célula de fluxo possuía 2 portas de entrada e uma de saída e apresentava uma configuração que favorecia a mistura de reagentes no seu interior.

Assim utilizando as duas portas de entrada para a inserção de amostra e reagente é possível efectuar a mistura das soluções no ponto X, mesmo à entrada da célula de fluxo que se encontra em frente ao fotomultiplicador (Figura 2.2 I), o que permite a detecção do máximo de radiação emitida no caso de reacções de cinética rápida.

No caso de uma reacção de quimiluminescência mais lenta, é possível utilizar apenas uma das entradas da célula, fechando a outra, efectuando-se a mistura antes da célula de fluxo, colocando uma confluência (ponto Y) junto ao luminómetro (Figura 2.2 II). Variando o comprimento do reactor entre a confluência e o detector é possível controlar

o tempo de reacção e a extensão da mistura entre a amostra e o reagente. A amostra e o reagente entram em contacto no ponto Z e são transportados ao longo do reactor até à célula de fluxo onde ocorre a detecção da radiação emitida (Figura 2.2 III).

Os sinais analíticos fornecidos pelo luminómetro eram registados num registador da marca Linseis, modelo L250E, que se encontrava conectado ao sistema de detecção.

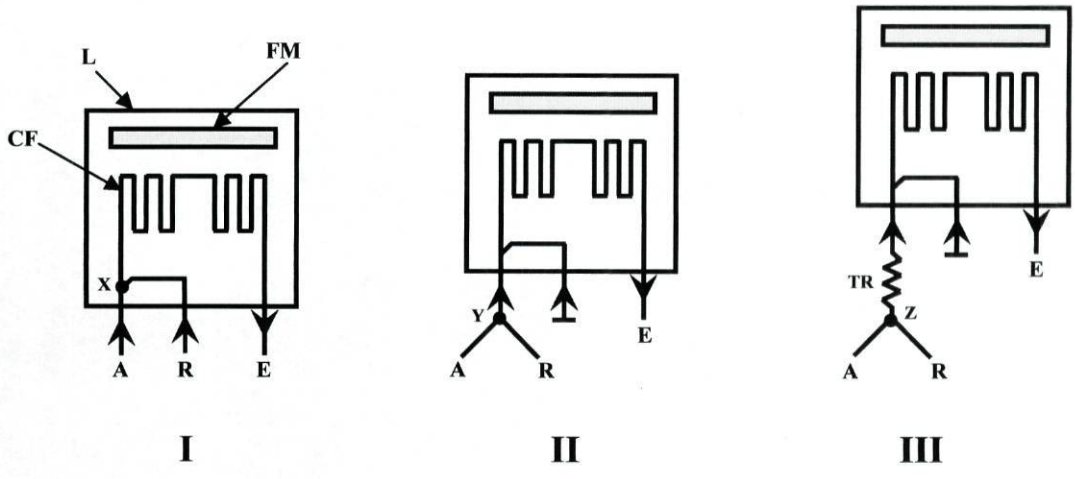


Figura 2.2 – Representação esquemática do luminómetro e dos possíveis pontos de mistura das soluções. L – luminómetro; FM – fotomultiplicador; CF – célula de fluxo; TR – tubo reactor; X, Y e Z – pontos de confluência; A – amostra; R – reagente; E – esgoto.

2.4.5 Controlo informático dos sistemas

2.4.5.1 Aparelhagem

Como unidade central de aquisição e processamento de dados e de controlo do equipamento componente dos sistemas de fluxo desenvolvidos, foi utilizado um microcomputador Pentium I. A comunicação entre o microcomputador e os diversos componentes das montagens de fluxo, nomeadamente o sistema de propulsão (bombas de pistão e microbombas solenóides) e o sistema de inserção (válvulas solenóides) foi efectuada através de interfaces da marca Advantech, modelos PC-LABCard PCL-711B e PCL-818L.

Para actuação das bombas de pistão e válvulas solenóides foi desenvolvido um circuito de potência de construção própria baseado num circuito integrado ULN2003 [2]. As microbombas solenóides eram controladas por sinais TTL através do mesmo circuito utilizado para as bombas de pistão e válvulas solenóides ou através de um circuito CoolDrive™ (NResearch Inc.).

As bombas de pistão eram controladas por comunicação série usando o padrão RS-232C.

2.4.5.2 Software

O software de controlo, aquisição e tratamento de dados, foi efectuado com recurso a uma linguagem de alto nível, BASIC, implementada em ambiente DOS (QuickBasic 4.5), tendo em atenção diversos factores, nomeadamente os objectivos do trabalho, a funcionalidade e versatilidade previstas e as características do microcomputador utilizado.

De um modo geral, cada programa permitia definir a sequência de etapas para cada determinação. Em cada caso particular as instruções dadas referiam-se à activação das bombas de pistão, ao tempo de activação e sentido de funcionamento aspiração/propulsão; à activação das microbombas solenóides, tempo de activação e frequência de pulso e ainda à posição das válvulas solenóides.

2.5 Optimização e avaliação das montagens de fluxo

No desenvolvimento e optimização dos sistemas apresentados, foram tidos em conta parâmetros como a sensibilidade, precisão, exactidão, ritmo de amostragem e consumo de reagentes.

A selecção do valor mais adequado para cada um dos parâmetros que afectam o desempenho da montagem analítica foi efectuada com base numa análise univariante, isto é, por variação do valor de cada um dos parâmetros, mantendo os restantes com um valor constante. Em determinadas situações foi necessário estabelecer uma posição de compromisso entre as várias vertentes que caracterizavam o desempenho do sistema, de forma a maximizar a eficiência analítica.

O intervalo de concentrações em que se verificava uma relação linear entre a concentração da espécie e a medida a efectuar, era determinado através do traçado de curvas de calibração, com soluções de concentração crescente da espécie a determinar, e pelo estabelecimento do intervalo de concentrações no qual se observa uma relação linear do sinal analítico com a concentração do analito.

O limite de detecção, definido como o valor mínimo de concentração que pode ser determinado com certeza pelo método desenvolvido, foi calculado de acordo com as especificações da IUPAC [3], a partir dos sinais analíticos de 10 determinações consecutivas do branco.

O ritmo de amostragem, expresso em número de determinações por hora, era calculado tendo em conta o tempo necessário para a realização de um ciclo analítico.

A precisão da metodologia foi expressa em termos de repetibilidade, ou seja, a precisão obtida por ensaio de uma ou mais amostras durante um processo analítico [4]. Para tal foram realizadas 10 determinações consecutivas de uma amostra, com nível de

concentração situado aproximadamente a meio da zona de linearidade, e foi determinado o desvio padrão relativo.

2.6 Tratamento estatístico dos resultados

As concentrações das espécies farmacêuticas analisadas foram obtidas, em termos de registo gráfico, em função da amplitude dos sinais analíticos originados na análise de cada amostra. A intensidade de sinal, correspondente à concentração da espécie, foi calculada em função da média de 3 determinações obtidas por inserções consecutivas da mesma amostra. A concentração final de cada uma das espécies analisadas foi calculada por interpolação da intensidade de sinal obtida, na recta de calibração estabelecida para cada metodologia, utilizando-se a regressão entre os valores de intensidade e de concentração pelo método dos mínimos quadrados dos desvios [4].

Na metodologia referente à determinação simultânea de benserazida e levodopa, a concentração das espécies a analisar foi obtida recorrendo a métodos de calibração multivariada. Foram utilizados os métodos de regressão de mínimos quadrados parciais e redes neuronais artificiais [5].

A exactidão de cada metodologia era avaliada por comparação dos resultados obtidos com os fornecidos por metodologias de referência. Em todos os capítulos, aos resultados da análise pelos métodos propostos e de comparação encontra-se associado o desvio padrão de 3 determinações (Resultado ± Desvio Padrão).

Para cada determinação calcularam-se os desvios relativos para cada par de resultados obtidos (DR%) com base na expressão $(C_{fluxo} - C_{ref}) \times 100/C_{ref}$.

Nos casos em que houve comparação dos resultados com um método de referência, foi ainda aplicado um teste de *t-Student* emparelhado (paired t-test) aos valores obtidos pelas duas metodologias. O valor de t foi calculado com base na expressão $t = \frac{\overline{X}}{S}\sqrt{n}$, com n-1 graus de liberdade e onde $\overline{X}$ é média da diferença entre cada par de valores, S é o desvio padrão e n o número de medidas. O valor calculado ($t_{calculado}$) quando

comparado com o valor tabelado ($t_{tabelado}$), para um nível de significância de 95%, permite confirmar a concordância entre os dois métodos quando se verifica a hipótese nula [4,6].

Nas metodologias referentes à determinação de carvedilol e à determinação simultânea de levodopa e benserazida, a exactidão foi avaliada através de ensaios de recuperação, uma vez que nas várias farmacopeias não se encontram metodologias de referência para a determinação destas espécies [7]. Estes ensaios foram conduzidos de forma que a cada amostra fossem adicionadas quantidades de solução padrão concentrada do elemento a dosear em dois níveis de concentração. O índice de recuperação foi calculado com base na expressão $(C_{a+p} - C_a) \times 100 / C_p$, em que C_{a+p} é a concentração encontrada para a amostra adicionada de padrão, C_a é a concentração encontrada para a amostra e C_p é a concentração de elemento na amostra resultante da adição de padrão.

2.7 Referências bibliográficas

[1] Farmacopeia Portuguesa VII, Edição Oficial, INFARMED, Lisboa, 2002.

[2] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 351 (1997) 223.

[3] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Anal. Chem. 48 (1976) 2294.

[4] J.C. Miller, J.N. Miller, Estadística para Química Analítica, Addison-Wesley Iberoamericana, Segunda Edição, Wilmington, Delaware, EUA (1988).

[5] B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B, Elsevier Science B.V., Amesterdão, Holanda (1998).

[6] J.N. Miller, Analyst 116 (1991) 3.

[7] Eurachem, The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Methods Validation and Related Topics (1998).

CAPÍTULO 3

Determinação de propranolol

3. Determinação de propranolol

3.1 Introdução

O propranolol (cloridrato de propranolol), cloridrato de (2RS)-1-[(metiletil)amino]-3-(1-naftaleniloxi)-propan-2-ol (Figura 3.1), é um bloqueador β-adrenérgico não selectivo [1], pertencente à classe II dos antiarrítmicos que existe como mistura racémica, mas apenas o enantiómero (S)-(-) é biologicamente activo. Como bloqueador-β é um inibidor competitivo do efeito das catecolaminas nos receptores β-adrenérgicos, sendo este efeito não selectivo, pois tanto actua ao nível dos receptores β-1 (coração) como β-2 (músculo liso). Apresenta propriedades estabilizadoras da membrana, mas não possui actividade simpaticomimética intrínseca.

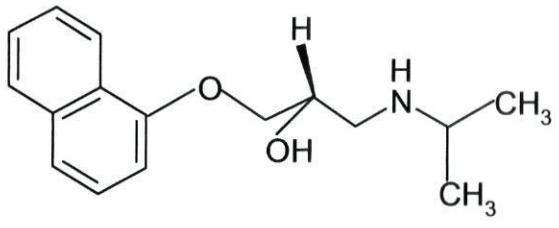


Figura 3.1 – Estrutura do propranolol

O propranolol é usado no tratamento de hipertensão, feocromocitoma, angina de peito, enfarte do miocárdio, arritmias cardíacas e cardiomiopatia hipertrófica obstrutiva. É também utilizado no controlo dos sintomas causados pela hiperactividade simpaticomimética no tratamento de hipertiroidismo, ansiedade e tremor.

Muitos desportistas usam o propranolol em actividades que exigem muita concentração e pouco esforço físico como: bilhar, xadrez, tiro com arco, aeronáutica, motociclismo, etc, o que levou a que este fosse incluído na lista das substâncias proibidas pelo Comité Olímpico Internacional [2].

A importância terapêutica do propranolol levou ao desenvolvimento de inúmeras metodologias para a sua determinação quer em amostras biológicas (plasma, urina, saliva, etc), quer em formulações farmacêuticas. A Farmacopeia Portuguesa [3] recomenda a titulação potenciométrica do propranolol com hidróxido de sódio na substância pura e a determinação por espectrofotometria a 290 nm para as formulações farmacêuticas.

Foram propostas metodologias para a determinação de propranolol que consistiam na titulação com N-bromosuccinimida, com detecção visual [4] ou térmica [5] do ponto final da titulação.

Entre as metodologias analíticas envolvendo técnicas espectrofotométricas, encontram-se: a reacção com nitrato de potássio e ácido sulfúrico com determinação da absorvência do produto formado a 360 nm [6]; a reacção com cloreto de ferro (III) na presença de tiocianato de amónio em meio ácido com determinação da absorvência do produto formado a 477 nm [7] e reacções com aceitadores ρ e π (7,7,8,8-tetracianoquinodimetano, tetracianoetileno, 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona, ácido cloranílico) [8,9]. A reacção com dissulfureto de carbono e posterior complexação com iões Cu (II) permite a determinação de propranolol por espectrofotometria de UV/Vis ou por espectroscopia de absorção atómica (AAS) indirecta [9].

É ainda possível a determinação de propranolol por AAS indirecta por reacção com tetratiocianatodiaminocromato de amónio e cobaltonitrito de sódio [10] ou por reacção com tiocianato de manganês e hexacianoferrato (III) de potássio [11].

Outras metodologias analíticas tais como fluorimetria [12,13], potenciometria [14], polarografia [15] e condutimetria [16] foram também utilizadas na determinação de propranolol.

As técnicas cromatográficas estão entre as mais divulgadas na determinação de propranolol, tendo sido aplicada a cromatografia de elevada eficiência com detecção ultra-violeta [17] e com detecção fluorimétrica [18,19]. A cromatografia de elevada eficiência foi também combinada com microextração em fase sólida [20]. Encontram-se ainda descritas metodologias que visam a utilização de espectroscopia de massa associada quer a cromatografia líquida [21], quer a cromatografia gasosa [22].

Tal como já se referiu no Capítulo 1 desta dissertação, os métodos quimiluminométricos têm suscitado um interesse crescente, tendo sido utilizados na determinação de uma grande variedade de espécies em diferentes tipos de amostra, incluindo a análise de produtos farmacêuticos, como se pode ver pelo número de trabalhos referenciados em artigos de revisão publicados sobre quimiluminescência [25,26].

Contudo, a quimiluminescência foi pouco aplicada à determinação de propranolol, tendo sido descritos, até ao momento, apenas dois procedimentos analíticos baseados na análise por injecção em fluxo [23,24].

Assim, no trabalho desenvolvido procede-se à determinação quimiluminométrica de propranolol por reacção com o permanganato de potássio. O uso do permanganato de potássio como reagente de quimiluminescência tem sido largamente investigado [27,28]. A maioria das aplicações envolve a determinação de moléculas orgânicas que possuem grupos amina ou fenol. O propranolol possui um grupo amina passível de sofrer oxidação sendo previsível que a sua reacção com o permanganato originasse quimiluminescência. A redução do permanganato de potássio em meio ácido originando a emissão de luz requer uma rápida mistura amostra/reagente e apresentação imediata da

zona de reacção ao detector, o que pode ser facilmente obtido num sistema de fluxo multicomutado.

Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento automático baseado num sistema de fluxo multicomutado para a determinação quimiluminométrica de propranolol. A utilização de válvulas solenóides criando uma rede de fluxo, característica dos sistemas de fluxo multicomutados [29,30], permite uma elevada versatilidade em termos de formação de zona de reacção a qual é particularmente vantajosa em reacções de quimiluminescência. O sistema de fluxo multicomutado desenvolvido para determinação quimiluminométrica de propranolol baseado na sua oxidação pelo permanganato de potássio foi avaliado na análise de formulações farmacêuticas.

3.2 Experimental

3.2.1 Reagentes e soluções

Uma solução 1,0 g l^{-1} de cloridrato de propranolol era preparada dissolvendo de 100 mg em 100 ml de ácido sulfúrico 1,5 mol l^{-1} e mantida no frigorífico. As soluções padrão, utilizadas para estabelecer as curvas de calibração, eram obtidas por diluição rigorosa da solução mais concentrada, com ácido sulfúrico 1,5 mol l^{-1}.

Diariamente era preparada uma solução de cerca de 2,5 x 10^{-3} mol l^{-1} de permanganato de potássio dissolvendo 98,78 mg do sólido em ácido sulfúrico 0,1 mol l^{-1}, completando o volume até 250 ml com a mesma solução ácida.

3.2.2 Equipamento

A montagem de fluxo multicomutado desenvolvida para a determinação de propranolol (Figura 3.2) era constituída por duas válvulas solenóides de 2 vias, NResearch, modelo 161 T 011, as quais foram já caracterizadas no Capítulo 2.

As tubagens em teflon utilizadas para estabelecer as ligações entre as válvulas solenóides, o detector e o sistema de propulsão, possuíam um diâmetro interno de 0,8 mm.

A propulsão das soluções foi realizada por acção de duas bombas de pistão da marca Crison, modelo Micro BU 2031, equipadas com seringas de vidro com uma capacidade de 5 e 2,5 ml.

A determinação de propranolol nas formulações farmacêuticas pelo método de referência sugerido pela Farmacopeia Portuguesa VII [3] foi efectuada num espectrofotómetro UV/Vis (290 nm) já referido no Capítulo 2.

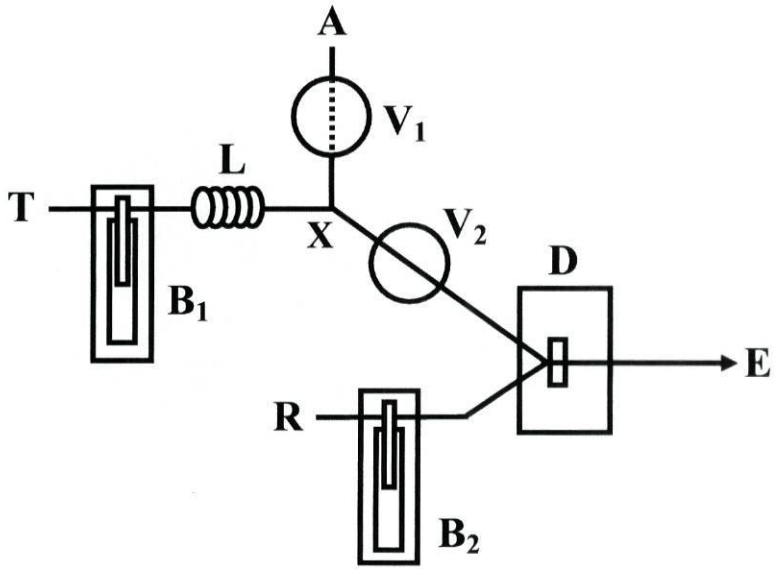


Figura 3.2 – Esquema da montagem de fluxo multicomutado usada na determinação de cloridrato de propranolol em formulações farmacêuticas. V_1 e V_2 – válvulas solenóides de 2 vias: linha a tracejado corresponde à posição fechada e linha contínua corresponde à posição aberta; D – detector; B_1 e B_2 – bombas de pistão (5 e 2,5 ml respectivamente); L – reactor (1 m); A – amostra; T – solução transportadora de ácido sulfúrico; R – solução de permanganato de potássio; X – confluência; E – esgoto.

3.2.3 Montagem de fluxo

O sistema de fluxo multicomutado era constituído por duas válvulas solenóides de duas vias (normalmente fechadas) (V_1 e V_2) e duas bombas de pistão (B_1 e B_2) (Figura 3.2). As válvulas solenóides V_1 e V_2 eram utilizadas para estabelecer dois percursos analíticos diferentes, um para a inserção da amostra e outro para a detecção. A bomba de pistão B_1 era operada no modo de aspiração e propulsão e era responsável pela

inserção no percurso analítico quer da amostra (modo de aspiração) quer do ácido sulfúrico usado como transportador (modo de propulsão); a bomba B_2 era responsável pela introdução da solução de permanganato de potássio.

Durante o ciclo analítico (Figura 3.3), V_1 estava inicialmente fechada enquanto V_2 estava aberta permitindo que a solução de transportador, propulsionada por B_1, fluísse para o detector de modo a estabelecer a linha de base. Para inserção da amostra, V_1 era activada e a amostra era aspirada por B_1 para o reactor L durante um tempo de amostragem (t_a) pré-definido, o qual dependendo do caudal, determinava o volume de amostra. Durante a aspiração da amostra, V_2 era fechada de modo a impedir o refluxo da solução que se encontrava no interior da célula do detector, que ocorria devido à força exercida pela bomba de pistão durante a aspiração. De seguida, B_1 voltava ao modo de propulsão transportando a amostra para o detector durante um tempo de transporte pré-definido (t_t), para tal V_1 era fechada, enquanto V_2 era activada de modo a permitir a passagem da amostra. Quando a secção frontal da zona de amostra estava próxima da célula de fluxo do detector, a solução de permanganato de potássio era inserida pela bureta B_2 e confluía com a amostra durante um tempo de inserção de reagente (t_r) que coincidia com a passagem da zona de amostra. Desta forma e uma vez que a reacção de quimiluminescência entre o propranolol e o permanganato ocorre rapidamente, as suas soluções misturavam-se apenas no interior da célula de fluxo onde a reacção tinha lugar. Após a detecção da amostra, V_1 e V_2 voltavam às suas posições iniciais e uma nova inserção de amostra ocorria, começando um novo ciclo. Não era necessário incluir uma fase de limpeza uma vez que durante a fase de transporte o reactor L era preenchido com solução de transportador, ficando pronto para a inserção de uma nova amostra.

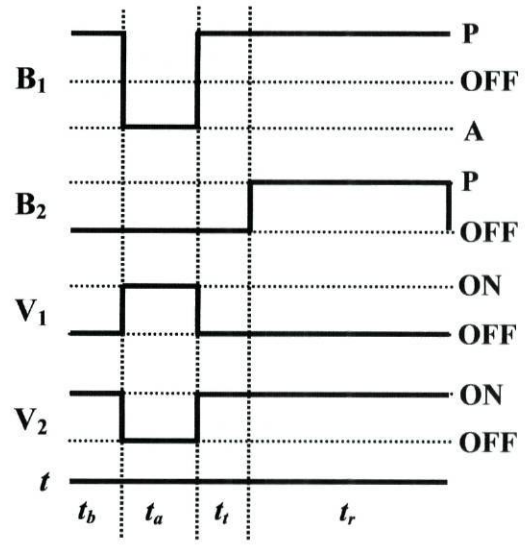


Figura 3.3 – Representação esquemática da posição das bombas de pistão e das válvulas solenóides durante o ciclo analítico. B_1 e B_2 (bombas de pistão): P – modo de propulsão, A – modo de aspiração, OFF – repouso; V_1 e V_2 (válvulas solenóides): ON – válvula activada, OFF – válvula desactivada; t – tempo; t_b – definição da linha de base; t_a – tempo de amostragem (30 s); t_t – tempo de transporte (20 s); t_r – tempo de inserção de reagente (80 s).

3.2.4 Método de referência

Para efeito de validação do procedimento automático proposto, as formulações farmacêuticas foram também analisadas pelo método de referência sugerido pela Farmacopeia Portuguesa VII [3] que recomenda a determinação espectrofotométrica do propranolol.

A preparação das soluções de amostra foi efectuada por pesagem e pulverização em almofariz de porcelana de 20 comprimidos de cada uma das formulações analisadas. Calculava-se a quantidade correspondente ao peso médio de uma unidade, de cada formulação e dissolvia-se em 20 ml de água desionizada uma quantidade referente a 20 mg de cloridrato de propranolol. Após agitação durante 10 min, adicionava-se 50 ml de metanol e após novo período de agitação de 10 min completava-se o volume de 100 ml com metanol. Finalmente procedia-se à filtração e diluição do filtrado. A concentração de propranolol era avaliada por medição da absorvência da solução final a 290 nm.

A formulação injectável era preparada por diluição do volume referente a 20 mg de cloridrato de propranolol em água e metanol, sendo a concentração de propranolol avaliada, também por medição da absorvência a 290 nm.

As soluções de amostra, para análise pela metodologia desenvolvida, eram preparadas por pesagem e dissolução da quantidade correspondente a 10 mg de cloridrato de propranolol de formulação pulverizada, obtida como já foi descrito anteriormente para os procedimentos de referência, em ácido sulfúrico 1,5 mol l^{-1}.

No caso da formulação injectável, a solução de amostra era preparada por diluição do volume correspondente a 1 mg de cloridrato de propranolol em ácido sulfúrico 1,5 mol l^{-1}.

3.3 Resultados e Discussão

Como já foi referido anteriormente, a metodologia desenvolvida neste trabalho foi baseada na reacção de quimiluminescência entre o propranolol e o permanganato de potássio, o qual é um oxidante forte largamente utilizado em reacções de quimiluminescência.

Estudos preliminares efectuados com base em resultados recolhidos na literatura, revelaram que a oxidação do propranolol pelo permanganato de potássio em meio ácido, resulta na emissão de radiação. O mecanismo da reacção de quimiluminescência ainda não é bem conhecido, mas alguns trabalhos referidos na literatura indicam que a espécie emissora é o produto da redução do permanganato, provavelmente espécies Mn (II) de constituição desconhecida no estado excitado [27,28].

A intensidade de radiação emitida está obviamente, directamente relacionada com a concentração de propranolol na amostra e é afectada por vários parâmetros químicos e instrumentais, tendo a optimização do sistema de fluxo multicomutado desenvolvido, sido efectuada usando como critério a obtenção de maior amplitude do sinal analítico.

3.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos

Um dos parâmetros que afecta a intensidade da radiação emitida é a concentração de permanganato de potássio, já que a espécie emissora de radiação é produto da redução do permanganato. Deste modo, o efeito da concentração de permanganato de potássio na intensidade de radiação emitida foi estudado, avaliando o efeito da variação da concentração no intervalo de $5{,}0 \times 10^{-4}$ até $1{,}0 \times 10^{-2}$ mol l^{-1}. Verificou-se que o sinal analítico aumentava até à concentração de $2{,}5 \times 10^{-3}$ mol l^{-1}, aumento este resultante do aumento das espécies disponíveis para participar na reacção (Figura 3.4). Para

concentrações de permanganato de potássio superiores a 2,5 x 10^{-3} mol l^{-1} verificou-se uma ligeira diminuição da intensidade de radiação emitida, tendendo para a estabilização, o que provavelmente estará relacionado com o efeito de filtro, comum nos processos de luminescência, que significa que para concentrações elevadas a solução torna-se menos transparente, podendo absorver parte da radiação que é emitida na reacção quimiluminométrica. Assim a concentração de cerca de 2,5 x 10^{-3} mol l^{-1} foi escolhida para ensaios posteriores.

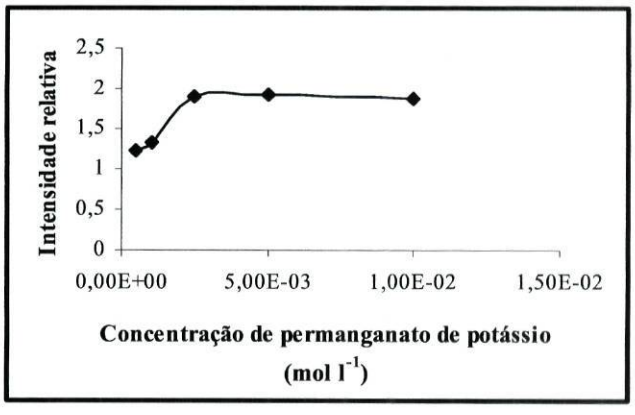


Figura 3.4 – Influência da concentração de permanganato de potássio na intensidade de radiação emitida.

Uma vez que a reacção quimiluminométrica ocorre em meio ácido, a concentração de ácido sulfúrico, usado como transportador e na preparação das soluções de amostra e permanganato, é também um parâmetro importante. A solução de ácido sulfúrico usada como transportador foi avaliada para concentrações no intervalo de 0,1 a 2,0 mol l^{-1}. Observou-se que a intensidade de radiação emitida permanecia estável até 0,5 mol l^{-1} e

depois diminuía à medida que a concentração de ácido aumentava, tendo sido seleccionada para posteriores ensaios a concentração de ácido sulfúrico de 0,1 mol l^{-1}. Um resultado semelhante foi obtido para a concentração de ácido usada para preparar a solução de permanganato de potássio. Em contraste, quando se testou o efeito da concentração de ácido sulfúrico usada para preparar a amostra, foi obtida maior emissão de radiação para uma concentração de ácido sulfúrico de cerca de 1,5 mol l^{-1}. O que se justifica pelo facto das soluções de propranolol serem mais estáveis em soluções com pH ácido decompondo-se rapidamente a pH alcalino [1].

As reacções de quimiluminescência devem ocorrer em frente ao fotomultiplicador de modo a permitir a detecção do máximo de radiação emitida, o que resulta numa dispersão limitada, de forma que o desempenho do sistema analítico deve garantir uma mistura entre a amostra e o reagente rápida e eficiente. Neste sentido, são importantes os parâmetros analíticos como o volume de amostra, volume de reagente, caudal, etc.

Num sistema de fluxo multicomutado, o volume de amostra inserido é definido em termos de tempo de amostragem (t_a) e não com base no volume interno da alça de amostragem como acontece num sistema de FIA convencional. O volume de amostra é definido pelo intervalo de tempo em que a válvula responsável pela inserção da amostra permanecia aberta, o que permite, para um dado caudal, a selecção de uma quase ilimitada gama de volumes de amostra que podem ser introduzidos no sistema analítico. Consequentemente, ajustando apenas o volume de amostragem é possível manipular a dispersão da amostra sem necessidade de reconfigurar fisicamente o sistema.

Aumentando os tempos de amostragem (para um caudal fixo de 0,3 ml min^{-1}), observou-se um aumento do sinal analítico até um t_a de 30s (correspondendo a um volume de amostra de cerca de 150 µl) e subsequente estabilização.

Posteriormente à inserção, a alíquota de amostra era transportada para a célula do detector, onde se misturava com a solução de permanganato. Uma vez que esta solução não era continuamente adicionada, mas apenas introduzida quando a alíquota de amostra chegava ao detector, era necessário estabelecer um tempo de transporte (t_t) para a amostra, com o propósito de assegurar uma confluência das soluções sincronizada e reprodutível. Desta forma a mistura entre amostra e reagente e o desenvolvimento da reacção não seriam comprometidos e era reduzida a quantidade de reagente consumido. A definição de um tempo de transporte deveria considerar não só o caudal mas também o comprimento do tubo que ligava a confluência X ao detector e a extensão da zona de amostra. Verificou-se que, como não havia reacção entre o transportador e a amostra, o caudal durante a fase de transporte não interferia significativamente no sinal analítico, pois a sua influência na dispersão da amostra é irrelevante, no entanto o caudal afectava o ritmo de amostragem.

Assim sendo, a selecção do tempo de transporte com respeito ao ponto de início da confluência das duas soluções (que coincide com o início da inserção do permanganato) revelou-se crucial para atingir uma elevada intensidade de radiação emitida. Similar importância foi dada à selecção do tempo de inserção de reagente (t_r) que corresponde ao tempo durante o qual a solução de permanganato é inserida, sendo o volume de reagente consumido na análise determinado por este período de tempo e pelo caudal. Usando um caudal de 0,3 ml min^{-1}, e um tempo de amostragem de 30 s foram avaliados tempos de transporte entre 0 e 20 s e tempos de inserção de reagente no intervalo de 40 a 100 s. Quando o tempo durante o qual se inseria a solução de permanganato era de 40 a 60 s, e para tempos de transporte menores, verificou-se que os sinais analíticos obtidos com inserções consecutivas de amostras apresentavam dois picos (excepto para o primeiro sinal que consistia apenas num pico). Este facto verificava-se porque devido ao

reduzido tempo de transporte, apenas a porção frontal da alíquota de amostra inserida reagia com o permanganato, enquanto a porção final da alíquota de amostra permanecia no reactor. No ciclo analítico seguinte, tanto a porção final de amostra que se encontrava no reactor como a porção frontal da nova alíquota de amostra inserida reagiam com o permanganato, originando dois picos por detecção. A utilização de um tempo de transporte de 20s e o aumento do tempo de reagente para 80 s permitia a análise de toda a alíquota de amostra e a obtenção de um só pico.

Uma característica vantajosa dos sistemas de fluxo multicomutados já anteriormente referida e evidenciada por estes resultados, que está relacionada com a sua versatilidade, é a possibilidade de utilização de diferentes estratégias de mistura de amostra e reagente e formação da zona de reacção, como é o caso das estratégias de confluência de zonas, volume único e amostragem binária. A utilização de volume único resulta em sinais analíticos de menor amplitude porque a existência de apenas duas interfaces de contacto entre a amostra e reagente e o curto tempo de residência resultam numa mistura ineficiente não permitindo um desenvolvimento adequado da reacção. Assim, além da confluência de zonas de amostra e reagente foi também avaliada a estratégia de amostragem binária consistindo na intercalação (por actuação alternada de B_1 e B_2) de pequenas alíquotas de amostra e permanganato de potássio, as quais devido ao seu volume reduzido, sofrem rápida homogeneização. Os resultados obtidos eram semelhantes aos fornecidos por confluência de zonas, a qual foi seleccionada uma vez que o ritmo de amostragem é ligeiramente superior, visto que o caudal resultante é mais elevado do que no caso da amostragem binária e por isso a amostra é detectada mais rapidamente.

Outro parâmetro a estudar era o comprimento dos reactores. O reactor L para onde a amostra era aspirada possuía uma função de armazenamento e deveria ter um

comprimento que impedisse a amostra de contaminar a solução transportadora presente na seringa. Assim foi seleccionado um reactor de 1 m, uma vez que com este comprimento era garantido que a amostra nunca atingiria a bomba de pistão. Foi também avaliado o efeito do comprimento do reactor que efectuava a ligação entre a confluência X e o detector, verificando-se que a intensidade de radiação emitida era estável para reactores até 70 cm, diminuindo para reactores mais longos, o que pode ser justificado pelo efeito de dispersão da amostra que ocorria nos reactores mais longos. Assim a ligação entre a confluência e o detector foi efectuada com o comprimento mínimo necessário.

O caudal era um parâmetro importante a afectar a amplitude do sinal analítico em duas perspectivas diferentes: primeiro, determina o transporte da zona de reacção e assim o tempo de residência em frente ao detector, condicionando a intensidade de luz medida. Neste sentido, um caudal muito lento ou um caudal muito rápido podem resultar num máximo de emissão de radiação pelo segmento de amostra antes ou depois da célula de fluxo. Tal como foi referido anteriormente, o caudal durante a fase de transporte não era determinante em termos de desenvolvimento da reacção, mas apenas no ritmo de amostragem. Por outro lado, o caudal efectivo na fase da detecção era aproximadamente o somatório dos caudais dos dois fluxos convergentes (amostra e reagente). Desta forma, a utilização de caudais muito elevados para ambos os fluxos iria resultar num tempo de residência muito reduzido na célula de fluxo afectando não só a sensibilidade mas também a reprodutibilidade. Uma estratégia para aumentar a sensibilidade seria recorrer à paragem de fluxo, contudo neste caso seria comprometido o ritmo de amostragem. Assim, após a avaliação dos diferentes caudais e desejando obter um compromisso entre a sensibilidade e o ritmo de amostragem, foi seleccionado um caudal de 0,3 ml min^{-1} em cada um dos fluxos.

Nas condições experimentais optimizadas e apresentadas na Tabela 3.1 obteve-se uma curva de calibração com uma zona de resposta linear de 20 a 150 mg l^{-1} de cloridrato de propranolol. A curva de calibração obtida é representada pela equação I = 0,020(±0,002)C – 0,031(±0,137), onde I se refere à intensidade relativa de radiação emitida e C à concentração de cloridrato de propranolol expressa em mg l^{-1}, com um coeficiente de correlação de 0,998.

O limite de detecção da determinação era 9,44 mg l^{-1} e a metodologia permitia efectuar cerca de 27 determinações por hora.

Tabela 3.1 – Valores optimizados dos parâmetros analíticos

Parâmetros analíticos	
Concentração de permanganato de potássio	2,5 x 10^{-3} mol l^{-1}
Concentração de ácido sulfúrico transportador	0,1 mol l^{-1}
Volume de amostra (tempo de amostragem)	150 µl (30 s)
Caudal (cada solução)	0,3 ml min^{-1}

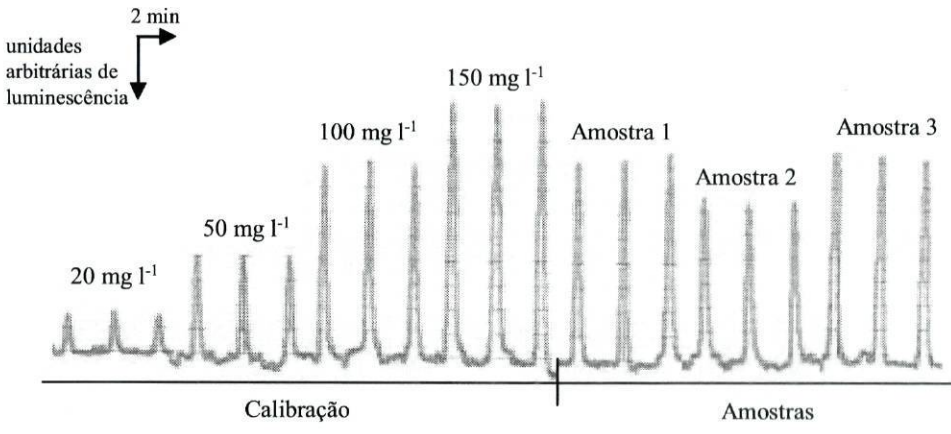


Figura 3.5 – Registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração e na análise de algumas amostras de formulações farmacêuticas.

3.3.2 Avaliação dos interferentes

Uma vez que a metodologia desenvolvida visava a determinação de cloridrato de propranolol em formulações farmacêuticas existentes no mercado português, foi avaliado o efeito sobre os sinais analíticos de vários compostos utilizados como excipientes.

Este estudo foi efectuado por preparação de amostras contendo uma concentração fixa de cloridrato de propranolol de 3,38 x 10^{-3} mol l^{-1}, as quais foram dopadas com concentrações da espécie interferente, com razões molares, em relação ao cloridrato de propranolol, de 1, 5, 10, 50 e 100 vezes. Estas amostras foram depois analisadas pela metodologia desenvolvida. Fixou-se como critério que um composto era considerado não-interferente, se a variação do sinal analítico, fosse, em valor absoluto, inferior a 3% quando comparado com o sinal obtido na ausência do referido composto.

Os resultados obtidos demonstraram que nas condições de ensaio utilizadas, a maior parte dos excipientes estudados, em concentrações 100 vezes superiores à do princípio

activo, não apresentam efeito interferente. Apenas o ácido cítrico e a sacarose apresentam efeito interferente quando em concentrações superiores a 10 vezes a concentração de princípio activo. No entanto estes compostos estão presentes apenas em algumas das formulações analisadas e em concentrações que não excedem a razão molar de 10, consequentemente não sendo de recear interferência na análise das amostras.

3.3.3 Análise de formulações farmacêuticas

Com vista à avaliação do desempenho da metodologia desenvolvida, o sistema de fluxo multicomutado descrito foi aplicado na análise de formulações farmacêuticas contendo cloridrato de propranolol disponíveis no mercado português.

As soluções das diferentes amostras foram preparadas, a partir das formulações em estudo, como referido na secção Experimental deste capítulo e posteriormente analisadas no sistema de fluxo optimizado.

Por análise repetida (n = 10) de solução de amostra de cloridrato de propranolol de concentração 100 mg l^{-1} pela metodologia desenvolvida, não se obtiveram desvios padrão relativos superiores a 2 %, revelando uma boa repetibilidade.

A exactidão dos resultados obtidos pelo sistema proposto foi avaliada por análise comparativa com os resultados obtidos pela metodologia de referência. Os resultados obtidos (Tabela 3.2) apresentam desvios relativos da metodologia desenvolvida em relação à metodologia de referência, até 3,8 %.

Adicionalmente, a realização do teste *t* de Student para um nível de confiança de 95% (n= 8), ilustrou a ausência de diferenças estatísticas para os resultados obtidos ($t_{calculado}$ = 0,368, $t_{tabelado}$ = 2,365) pelo método desenvolvido e o método de referência.

Tabela 3.2 – Resultados da análise de formulações farmacêuticas contendo cloridrato de propranolol

Amostra	Concentração declarada (mg/unidade)	Concentração determinada (mg/unidade)		Desvio relativo* (%)
		Metodologia de referência	Metodologia desenvolvida	
Inderal (injectável)	1	1,09 ± 0,01	1,10 ± 0,04	0,9
Inderal 10 (comprimidos)	10	10,10 ± 0,14	9,87 ± 0,26	-2,2
Inderal 40 (comprimidos)	40	40,60 ± 0,54	39,49 ± 0,81	-2,7
Inderal 80 (comprimidos)	80	79,63 ± 0,30	76,60 ± 2,39	-3,8
Inderal LA 80 (cápsulas libertação prolongada)	80	81,21 ± 0,43	79,63 ± 1,25	-2,0
Inderal LA (cápsulas libertação prolongada)	160	161,85 ± 1,24	167,90 ± 3,07	3,7
Propranolol ratiopharm 40 (comprimidos)	40	42,40 ± 1,14	43,42 ± 1,88	2,4
Propranolol ratiopharm 80 (comprimidos)	80	79,20 ± 1,68	80,92 ± 1,10	2,2

* Desvio relativo expresso em percentagem, da metodologia desenvolvida relativamente à metodologia de referência.

3.4 Conclusões

Os resultados obtidos demonstram que a quimiluminescência é uma técnica de detecção válida para a determinação de cloridrato de propranolol sólido e formulações farmacêuticas, o qual é reforçado pela limitada interferência das substâncias normalmente utilizadas como excipientes.

A metodologia desenvolvida demonstrou ser sensível e precisa, não requerendo pré-tratamento da amostra. Quando comparada com outros métodos propostos é mais simples, rápida e económica, além de necessitar de uma intervenção mínima do operador, o qual não precisa de ser especializado uma vez que o equipamento utilizado e o modo de operação é muito simples. De facto os métodos descritos na literatura para a determinação de propranolol são métodos morosos que necessitam de tratamentos de amostra laboriosos e usam equipamentos que exigem operadores qualificados.

Quando comparada com os métodos quimiluminométricos existentes para a determinação de propranolol, a metodologia desenvolvida apresenta um intervalo de linearidade mais amplo e uma sensibilidade ligeiramente inferior, apresentando também um ritmo de amostragem mais elevado do que a metodologia baseada na emissão de radiação pelo pirogalhol [24].

A par com sua simplicidade e facilidade de operação a metodologia de fluxo multicomutado proposta assegura uma rápida homogeneização da zona de reacção e um controlo flexível da dispersão, por meio de inserção de amostra baseada no tempo e facilmente adaptável. Um dos seus atributos mais importantes é a poupança significativa de reagentes que permite, quando comparado com os métodos discretos ou os habituais sistemas FIA.

O controlo informático dos sistemas de fluxo multicomutado acrescenta-lhes flexibilidade, permitindo a alteração, de uma forma expedita, das condições de análise, sem reconfiguração física dos sistemas.

3.5 Referências bibliográficas

[1] Martindale, The Complete Drug Reference, 33rd ed., Pharmaceutical Press, 2002, p.962.

[2] Lista de Substâncias proibidas e Métodos proibidos, Código Mundial Antidopagem; disponível a partir de : URL: http://www.idesporto.pt/cnad.asp.

[3] Farmacopeia Portuguesa VII, vol. I, Lisboa, 2002, pp.1258, 1351.

[4] V.N. Pathak, S.R. Shukla, I.C. Shukla, Analyst 107 (1982) 1086.

[5] U.M. Abbasi, F. Chand, M.I Bhanger, S.A. Memon, Talanta 33 (1986) 173.

[6] N.M. Sanghavi, N.G. Jivani, Talanta 27 (1980) 591.

[7] Lj. Živanović, D. Radulović, M. Jovanović, Pharm. Acta Helv. 63 (1988) 350.

[8] H. Salem, J. Pharm. Biomed. Anal. 29 (2002) 527.

[9] M.A.El-Ries, F.M. Abou Attia, S.A. Ibrahim, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2000) 179.

[10] S. Khalil, N. Borham, J. Pharm. Biomed. Anal. 22 (2000) 235.

[11] S. Khalil, M.M. El-Rabiehi, J. Pharm. Biomed. Anal. 22 (2000) 7.

[12] J.A.M. Pulgarín, A.A. Molina, P.F. López, Anal. Chim. Acta 370 (1998) 9.

[13] J.F. Fernández-Sánchez, A.S. Carretero, C. Cruces-Blanco, A. Fernández-Gutiérrez J. Pharm. Biomed. Anal. 31 (2003) 859.

[14] Z.R. Zhang, D.Y. Mao, Y.X. Li, V.V. Coşofreţ, Talanta 37 (1990) 673.

[15] M.A. El-Ries, M.M. Abou-Sekkina, A.A. Wassel, J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002) 837.

[16] Y.M. Issa, A.S. Amin, Microchim. Acta 118 (1995) 85.

[17] M. Walshe, M.T. Kelly, M.R. Smyth, J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996) 475.

[18] E.C. Kwong, D.D. Shen, J. Chromatogr. Biomed. Applic. 414 (1987) 365.

[19] K.M. Höld, D. de Boer, J. Zuidema, R.A.A. Maes, J. Chromatogr. B 663 (1995) 103.

[20] W.M. Mullett, P. Martin, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 73 (2001) 2383.

[21] M.E. Abdel-Hamid, Il Farmaco 55 (2000) 136.

[22] K. Hartonen, M.L. Riekkola, J. Chromatogr. B 676 (1996) 45.

[23] A. Townshend, J.A.M. Pulgarín, M.T.A. Pardo, Anal. Chim. Acta 488 (2003) 81.

[24] G.Z. Tsogas, D.V. Stergiou, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis, Anal. Chim. Acta 541 (2005) 151.

[25] P. Fletcher, K.N. Andrew, A.C. Calokerinos, S. Forbes, P.J. Warsfold, Luminescence 16 (2001) 1.

[26] A.C. Calokerinos, N.T. Deftereos, W.R.G. Baeyens, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (1995) 1063.

[27] B.J. Hindson, N.W. Barnett, Anal. Chim. Acta 445 (2001) 1.

[28] N.W. Barnett, B.J. Hindson, P. Jones, T.A. Smith, Anal. Chim. Acta 451 (2002) 181.

[29] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 366 (1998) 209.

[30] F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, Anal. Chim. Acta 468 (2002) 119.

CAPÍTULO 4

Determinação de clomipramina

4. Determinação de clomipramina

4.1 Introdução

Cloridrato de clomipramina, cloridrato de 3-cloro-5-[3-(dimetilamino)propil]-10,11-di-idro-5H-dibenzo[b,f]azepina (Figura 4.1) é um antidepressivo tricíclico do grupo das dibenzazepinas [1]. Tal como outros tricíclicos, a clomipramina inibe a recaptação de noradrenalina e serotonina no sistema nervoso central (SNC), exibindo também propriedades antimuscarínicas. A inibição da recaptação destes neurotransmissores potencia a sua acção no SNC, o que parece estar associado à actividade antidepressiva dos tricíclicos.

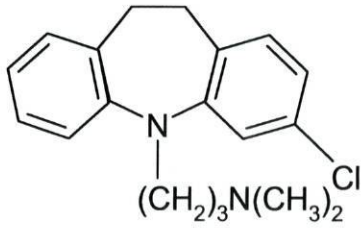


Figura 4.1 – Estrutura da clomipramina

A clomipramina é largamente utilizada no tratamento da depressão, desordem obsessivo-compulsiva, fobias, ansiedade e síndrome narcoléptico. O uso de clomipramina pode aumentar a probabilidade de suicídio e em pacientes tratados com antidepressivos tricíclicos pode ocorrer activação de esquizofrenia latente ou

agravamento de manifestações psicóticas já existentes. Pode ainda causar problemas cardiovasculares, hepáticos e hematológicos. Quando em elevadas concentrações podem surgir efeitos adversos severos e toxicidade, resultantes de efeitos anticolinérgicos centrais e periféricos. A sua actividade bloqueadora dos receptores-α e a actividade estabilizadora da membrana originam complicações cardiovasculares, convulsões ou mesmo coma, o que torna a clomipramina e os antidepressivos tricíclicos em geral, bastante perigosos em caso de sobredosagem.

Devido à sua importância terapêutica, vários métodos foram propostos para a determinação de clomipramina incluindo métodos electroquímicos por diferentes tipos de voltametria [2,3] e titulação termométrica com ácido perclórico em ácido acético anidro [4].

As técnicas espectrofotométricas UV/Vis foram também aplicadas à determinação de clomipramina baseando-se: na reacção com dicromato de potássio em meio ácido com determinação da absorvência do produto formado a 670 nm [5]; na reacção da clomipramina com DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona) em acetonitrilo com determinação da absorvência do produto formado a 460 nm [6]; na reacção com p-fenilenodiamina em ácido sulfúrico [7] e na reacção com o monovanadato de amónio em meio ácido [8], originando compostos cuja absorvência era determinada a 565 e a 620 nm, respectivamente. Entre as metodologias analíticas baseadas em técnicas cromatográficas encontram-se: a cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) com diferentes tipos de detecção [9,10,11]; e a cromatografia gasosa [12].

É ainda possível determinar a clomipramina por fluorescência baseada: na sua capacidade de intercalar e interagir com o DNA [13], na reacção com DMAS (9,10-dimetoxiantraceno-2-sulfonato) [14] ou na reacção com Ce (IV) [15]. A electroforese capilar foi também aplicada à determinação de clomipramina [16].

Os métodos quimiluminométricos têm suscitado um interesse crescente, graças às vantagens referidas no Capítulo 1, tais como elevada sensibilidade, versatilidade, amplos intervalos de linearidade, baixos limites de detecção e a utilização de equipamento simples e de baixo custo. No entanto apenas dois métodos com detecção por electroquimiluminescência por reacção com o tris(2,2′-bipiridil)ruténio(III) foram propostos para determinação de clomipramina [17,18].

A oxidação do sulfito pelo Ce (IV) em ácido sulfúrico é uma conhecida reacção de quimiluminescência. A emissão de radiação tem sido atribuída à formação de moléculas de dióxido de enxofre no estado excitado que emitem radiação ao regressar ao estado fundamental [19]. Em sistemas quimiluminescentes com fraca emissão de radiação é por vezes possível aumentar a intensidade de radiação adicionando um fluoróforo que actua como agente sensibilizador. A energia do produto da reacção inicial no estado excitado é transferida para uma espécie emissora mais eficiente, o fluoróforo, aumentando a intensidade de radiação emitida. No caso da reacção do Ce (IV) com o sulfito foram já utilizados vários agentes sensibilizadores tais como corticosteróides [20], ácido fólico [21], ácido ciclohexilaminopropanosulfónico (CAPS) [19,22] e ciclooctilamina [22].

Após alguns ensaios verificou-se que a clomipramina actua como sensibilizador da reacção do Ce (IV) com o sulfito aumentando a intensidade de radiação emitida permitindo assim a sua determinação por quimiluminescência. Tal como foi referido no Capítulo 1 a quimiluminescência é normalmente produzida por reacções rápidas de modo que para detectar o máximo de intensidade de radiação emitida a mistura entre a amostra e o reagente e a consequente reacção química deve ocorrer no interior da célula de fluxo em frente ao fotomultiplicador. Como tal, é necessária elevada

reprodutibilidade e rápida mistura de amostra e reagentes, uma situação que pode ser obtida recorrendo à multicomutação.

A multicomutação permite a implementação do conceito de amostragem binária, que consiste em introduzir no percurso analítico pequenas alíquotas de amostra alternadas com pequenas alíquotas de reagente. A dispersão ocorre a partir das múltiplas interfaces das alíquotas no reactor, permitindo uma rápida mistura entre solução de amostra e reagentes melhorando o desenvolvimento da reacção. Além disso a adição de reagentes é focada de forma precisa na zona de amostra, inserindo no percurso analítico apenas a quantidade de reagente necessária ao desenvolvimento da reacção, o que resulta numa redução do consumo dos reagentes.

O objectivo deste trabalho é o desenvolvimento de um sistema de fluxo multicomutado para a determinação quimiluminométrica de clomipramina baseada na reacção entre Ce (IV) e o sulfito e a sua aplicação à análise de produtos farmacêuticos.

4.2 Experimental

4.2.1 Reagentes e soluções

Uma solução 500 mg l^{-1} de cloridrato de clomipramina era preparada dissolvendo 25 mg de sólido em 50 ml de água desionizada. As soluções padrão eram preparadas, diariamente, por diluição rigorosa da solução mais concentrada.

A solução 1,0 x 10^{-3} mol l^{-1} de Ce (IV) era preparada por dissolução de sulfato de cério (IV) tetrahidratado em ácido sulfúrico 0,15 mol l^{-1}. Diariamente preparava-se uma solução de sulfito 1,0 x 10^{-3} mol l^{-1} por dissolução de sulfito de sódio em água desionizada.

4.2.2 Equipamento

O sistema de fluxo multicomutado desenvolvido para a determinação de clomipramina (Figura 4.2) incluía 4 válvulas solenóides de três vias, e a propulsão das soluções era efectuada através de uma bomba de pistão da marca Crison modelo Micro BU 2031 equipada com uma seringa de 10 ml.

A conexão entre todos os componentes do sistema foi efectuada com tubo de PTFE com diâmetro interno de 0,8 mm.

A determinação de clomipramina nas formulações farmacêuticas pelo método de referência foi efectuada num espectrofotómetro de UV/Vis (252 nm) já referido no Capítulo 2.

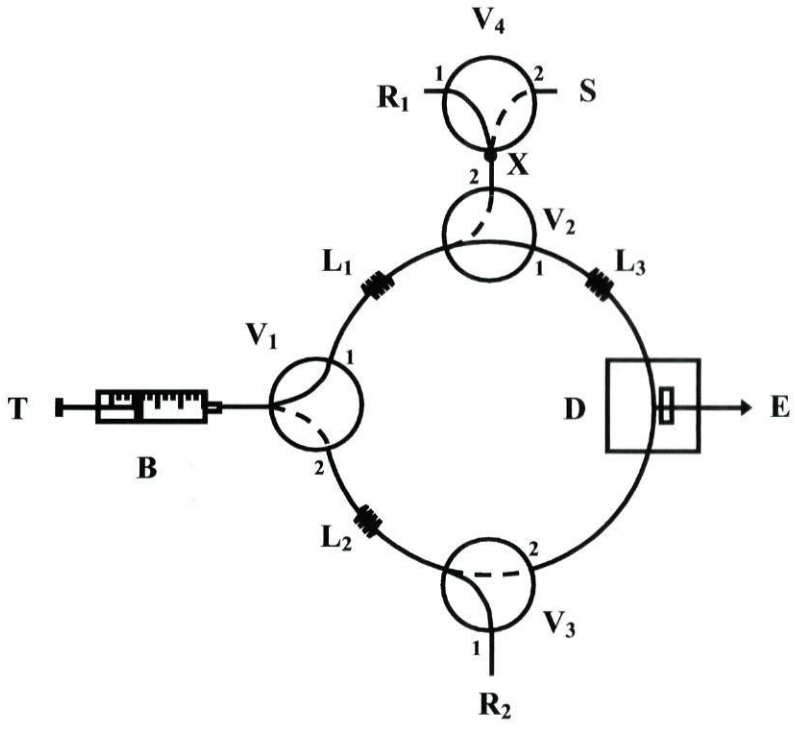


Figura 4.2 – Esquema da montagem de fluxo multicomutado usado na determinação de clomipramina em formulações farmacêuticas: V_1, V_2, V_3 e V_4 – válvulas solenóides de três vias, as linhas contínuas no interior das válvulas correspondem à posição 1 e as linhas a tracejado correspondem à posição 2; B – bomba de pistão; D – detector; L_1 e L_2 – reactores (1,5 e 6 m respectivamente); L_3 – tubo de ligação; E – esgoto; X – ponto de amostragem binária clomipramina:Ce (IV); A – amostra; T – solução transportadora de Ce (IV); R_1 – solução de Ce (IV); R_2 – solução de sulfito.

4.2.3 Montagem de fluxo

A montagem de fluxo era constituída por 4 válvulas solenóides de três vias (Figura 4.2) sendo V_4 responsável pela inserção da amostra e da solução de Ce (IV), V_3 era responsável pela inserção da solução de sulfito de sódio, enquanto V_1 e V_2 eram usadas para seleccionar dois percursos analíticos distintos. A circulação de todas as soluções era efectuada por uma única bomba de pistão que funcionava quer no modo de propulsão quer no modo de aspiração.

Inicialmente as válvulas solenóides estavam na posição 1 e a solução de Ce (IV) que se encontrava na seringa, e que era também utilizada como transportador, era propulsionada para o detector, estabelecendo a linha de base (Figura 4.3).

De seguida a bomba de pistão passava a funcionar no modo de aspiração, a válvula V_2 era colocada na posição 2 e a amostra era aspirada para o reactor L_1. A inserção da amostra era efectuada por amostragem binária, através da intercalação de pequenas alíquotas de amostra com pequenas alíquotas de solução de Ce (IV). Esta intercalação era realizada operando alternadamente a válvula V_4 entre as posições 1 e 2, (enquanto V_2 está na posição 2) permanecendo em cada uma das posições durante um tempo pré-definido. Desta forma, L_1 estava parcialmente cheio com pequenas alíquotas de amostra alternadas com pequenas alíquotas de Ce (IV) criando múltiplas interfaces de reacção, promovendo a mistura entre a amostra e a solução de Ce (IV). O número e tempo de cada ciclo de intercalação definiam o tempo total de amostragem, o qual por sua vez em conjunto com o caudal, estabelecia o volume total de amostragem.

Após a inserção da amostra, V_1 era activada para a posição 2 (V_2 era activada para a posição 1) e a solução de sulfito de sódio era aspirada para o reactor L_2, durante um intervalo de tempo pré-definido. De seguida a bomba de pistão passava para o modo de propulsão, V_3 era activada para a posição 2 e as soluções no interior dos reactores L_1 e

L_2 eram alternadamente propulsionadas para detecção por actuação de V_1 entre as posições 1 e 2, de forma sincronizada com a actuação de V_3, durante intervalos de tempo de intercalação pré-definidos. Isto permite a intercalação de pequenas alíquotas de sulfito com alíquotas da mistura clomipramina-Ce (IV) no interior da célula de fluxo do detector resultando no desenvolvimento da reacção quimiluminométrica. Após detecção da amostra, V_1 era activada para a posição 1 para limpeza e reposição de amostra.

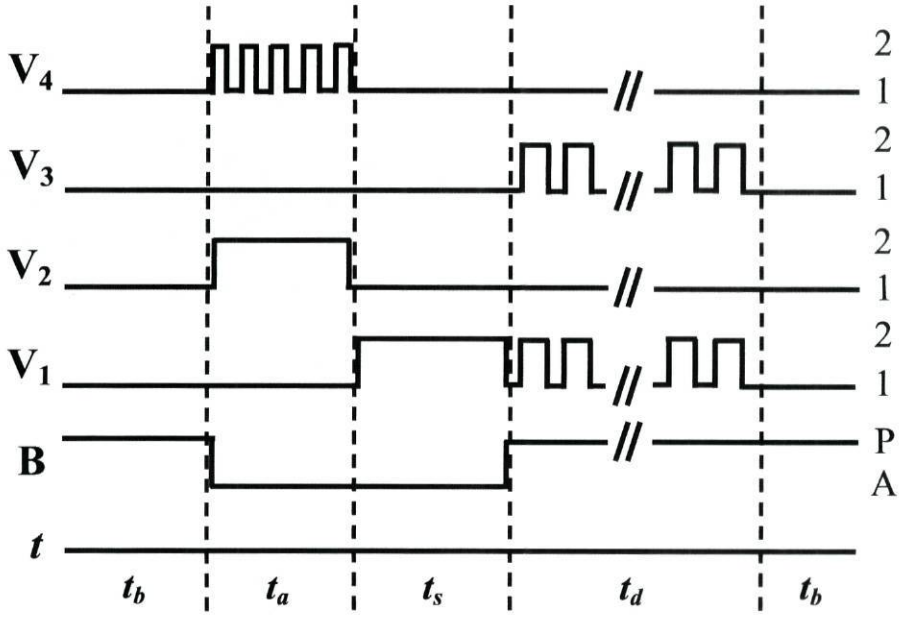


Figura 4.3 – Representação esquemática da posição da bomba de pistão e das válvulas solenóides durante o ciclo analítico. B – bomba de pistão: P – modo de propulsão, A – modo de aspiração; V_1 a V_4 (válvulas solenóides): 1 e 2 – posição das válvulas; t_b – definição da linha de base; t_a – tempo de amostragem; t_s – tempo de inserção de sulfito de sódio; t_d – tempo de mistura de sulfito e clomipramina-Ce (IV) e detecção.

4.2.4 Método de referência

Com objectivos comparativos, as amostras das formulações farmacêuticas contendo clomipramina, foram também analisadas pela metodologia de referência preconizada pela Farmacopeia Britânica [23].

O conteúdo de vinte comprimidos era pesado e pulverizado em almofariz de porcelana. Calculava-se a quantidade correspondente ao peso médio de uma unidade de cada formulação e dissolvia-se em ácido clorídrico 0,1 mol l^{-1} uma quantidade de amostra referente a 50 mg de cloridrato de clomipramina. Após agitação durante 1 hora, procedia-se à filtração e diluição do filtrado. A concentração de clomipramina era avaliada por medição da absorvência da solução final a 252 nm.

A formulação injectável era preparada por diluição do volume referente a 50 mg de cloridrato de clomipramina em ácido clorídrico 0,1 mol l^{-1}, sendo a concentração de clomipramina avaliada, também por medição da absorvência a 252 nm.

As soluções de amostra, para análise pela metodologia desenvolvida, eram preparadas por pesagem e dissolução da quantidade de amostra referente a 10 mg de cloridrato de clomipramina, obtida como já foi descrito anteriormente para os procedimentos de referência, em água desionizada.

No caso da formulação injectável, a solução de amostra era preparada por diluição de um volume correspondente a 25 mg de cloridrato de clomipramina em água desionizada.

4.3 Resultados e discussão

A reacção do Ce (IV) com a solução de sulfito de sódio produz uma radiação de fraca intensidade que é atribuída a moléculas de dióxido de enxofre no estado excitado. A realização de estudos preliminares evidenciou que a clomipramina pode actuar como promotor desta reacção aumentando a intensidade da radiação emitida. Verificou-se que a sequência seguida para a mistura das soluções de clomipramina e reagentes é um factor importante em termos de emissão de radiação. De facto, usando a reacção directa entre o sulfito e o Ce (IV) para estabelecer a linha de base, verificou-se que quando a clomipramina era misturada primeiro com a solução de Ce (IV) e posteriormente com a solução de sulfito, obtinha-se um pico positivo revelando um aumento da emissão de radiação. Por outro lado, quando a clomipramina era misturada primeiro com a solução de sulfito seguindo-se a solução de Ce (IV), observou-se uma diminuição na intensidade de radiação emitida relativamente à radiação emitida pela reacção do sulfito com o Ce (IV), resultando num pico negativo, abaixo da linha de base. Assim, para o trabalho posterior que visava o estudo e desenvolvimento de um sistema de fluxo multicomutado, capaz de implementar esta determinação, a montagem deveria ser de forma a explorar as capacidades de mistura dos sistemas multicomutados.

As experiências laboratoriais evidenciam a necessidade de uma mistura eficiente entre amostra e reagentes e do composto emissor ser produzido próximo do fotomultiplicador dado que normalmente a velocidade de reacção é elevada. Ao desenvolver a montagem de fluxo multicomutado para a determinação quimiluminométrica de clomipramina, de modo a preencher os requisitos atrás mencionados, vários factores foram tidos em consideração. Estes factores incluem não só parâmetros químicos mas também os tempos de inserção de amostra e reagentes, o tempo de reacção entre clomipramina e Ce (IV), a razão dos volumes clomipramina-Ce (IV):sulfito e o caudal.

4.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos

Inicialmente a montagem de fluxo foi desenvolvida, incorporando somente 3 válvulas solenóides, sendo a clomipramina inserida através da válvula V_2 para o reactor L_1 por aspiração na forma de um volume único, o qual era estabelecido com base num controlo em termos de tempo de amostragem e em função do caudal; subsequentemente a zona de amostra era propulsionada pela solução de transportador e reagente Ce (IV) para o detector, misturando-se com a solução de sulfito no interior da célula de fluxo. Observou-se, desta forma, que cada inserção de amostra originava dois picos distintos porque a utilização de um volume único de amostra formava apenas duas interfaces de reacção com a solução de reagente Ce (IV) e a dispersão no interior de L_3 não era suficiente para garantir uma mistura eficaz das soluções.

Uma alternativa aparentemente simples seria aumentar o comprimento de L_3 ou reduzir o volume de amostra. No entanto o aumento do comprimento de L_3 resultava num aumento do tempo necessário para a determinação, afectando o ritmo de amostragem e no caso da redução do volume de amostra verificava-se um aumento da dispersão da amostra limitando a sensibilidade. Para ultrapassar este inconveniente, foi incorporada outra válvula (V_4) que permitiu a implementação da estratégia de amostragem binária que consiste na inserção do mesmo volume de amostra na forma de um múltiplo de pequenas alíquotas que eram intercaladas com pequenas alíquotas de solução de Ce (IV). A intercalação de alíquotas extremamente pequenas de solução de amostra com alíquotas extremamente pequenas de solução de Ce (IV) resulta numa sequência contínua de interfaces entre as duas soluções, as quais favorecem a obtenção de um elevado grau de homogeneização, promovendo o desenvolvimento da reacção. Efectivamente a implementação da estratégia de amostragem binária proporciona uma homogeneização quase imediata da zona de reacção, que é essencial uma vez que vai

ocorrer uma segunda mistura com a solução de sulfito e cuja eficácia depende do grau de homogeneização obtido na mistura da amostra com a solução de Ce (IV). A utilização da estratégia de amostragem binária permite reduzir o comprimento de L_3 até ao mínimo necessário para fazer a ligação entre V_2 e o detector, pois a homogeneização obtida resulta num rápido desenvolvimento da reacção sendo que um reactor com um comprimento elevado apenas iria aumentar o grau de diluição da amostra, afectando a sensibilidade.

A segunda reacção, consistindo na adição da solução de sulfito à zona de reaccional de amostra-Ce (IV), ocorria no interior da célula de fluxo permitindo a detecção do máximo de radiação emitida. A mistura entre a solução de sulfito e a zona reaccional formada pela mistura de amostra e Ce (IV) foi efectuada recorrendo mais uma vez, ao conceito de amostragem binária. Assim, foram intercaladas pequenas alíquotas de solução de sulfito com pequenas alíquotas da mistura de amostra-Ce (IV) resultante da primeira amostragem binária. A realização de amostragem binária com a zona reaccional resultante de uma amostragem binária anterior resulta numa homogeneização rápida e eficiente permitindo efectuar a mistura no interior da célula de fluxo de modo que o segmento de amostra fique centrado em frente ao fotomultiplicador quando ocorre a emissão de quimiluminescência.

Quando se realiza amostragem binária um dos aspectos importantes a avaliar é o volume dos segmentos de amostra e reagente colocados sequencialmente que corresponde aos tempos de intercalação e o número de ciclos de intercalação que corresponde ao número de alíquotas inseridas.

O estudo da influência da intercalação de alíquotas de clomipramina e de Ce (IV), que ocorre no ponto X da Figura 4.2, no desenvolvimento da reacção foi efectuado testando diferentes combinações de ciclos de intercalação/tempo de intercalação de forma a

manter constante o volume de amostra (clomipramina) dependendo do tempo, que como foi referido anteriormente, é definido pelo número de ciclos de intercalação e pelo tempo de intercalação. Assim, para um tempo total de amostra de 10 s foram ensaiadas as combinações apresentadas na Tabela 4.1. O máximo de emissão de radiação foi obtido para 10 ciclos de 1s clomipramina:1s Ce (IV), confirmando que pequenas alíquotas favorecem a homogeneização da mistura.

Tabela 4.1 – Combinações de ciclos de intercalação e tempo de intercalação para a intercalação de clomipramina e solução de Ce (IV)

Ciclos de intercalação	Tempo de intercalação
10 ciclos	1 s clomipramina:1 s Ce (IV)
10 ciclos	1 s clomipramina:2 s Ce (IV)
5 ciclos	2 s clomipramina:1 s Ce (IV)
5 ciclos	2 s clomipramina:2 s Ce (IV)

Para a adição de solução de sulfito, estudou-se inicialmente o tempo de intercalação do sulfito, ou seja o volume das alíquotas de sulfito a intercalar com as alíquotas da mistura clomipramina-Ce (IV) no interior da célula de fluxo. Usando tempos de intercalação de sulfito de 1 a 7 s observou-se maior amplitude do sinal analítico com um tempo de intercalação de 5 s. Para a intercalação de alíquotas de solução de sulfito 1,0 x 10^{-3} mol l^{-1} e alíquotas de mistura clomipramina-Ce (IV) e tendo em conta que o tempo total da mistura clomipramina-Ce (IV) era cerca de 20 s, as combinações testadas foram: 20 ciclos de 1s clomipramina-Ce (IV):5s sulfito e 10 de ciclos 2s clomipramina-Ce (IV):5s

sulfito. Verificou-se que 20 ciclos de 1s clomipramina-Ce(IV):5s sulfito produzia sinais analíticos um pouco mais elevados, contudo, para trabalho posterior seleccionou-se 10 ciclos de 2s clomipramina-Ce(IV):5s sulfito uma vez que a ligeira diminuição na emissão de radiação era compensada por um ritmo de amostragem mais elevado e menor consumo de sulfito.

A influência do volume total de amostra, em termos de sinal analítico, foi avaliada para um intervalo de 60 a 300 µl que corresponde a um tempo total de amostra de 3 a 15 s, aumentando os ciclos de intercalação e usando o tempo de intercalação definido anteriormente. No ensaio foram usadas soluções de clomipramina de 5 e 50 mg l^{-1}. Para a solução de clomipramina 5 mg l^{-1} a intensidade de radiação emitida aumentava até 10 ciclos de intercalação, valor acima do qual surgia uma tendência para a estabilização do sinal. Este número de ciclos correspondia a um tempo total de amostragem de 10 s e a um volume total de amostra de 200 µl. Para a solução de clomipramina de 50 mg l^{-1} o sinal analítico aumentava até um tempo de amostragem de 5 s (5 ciclos de intercalação), valor a partir do qual se verificava uma estabilização e posterior diminuição da amplitude do sinal devido ao aparecimento de 2 picos resultantes da fraca homogeneização. Estes resultados demonstraram que controlando o tempo de amostragem e consequentemente o volume, era possível manipular a dispersão da amostra, o que permite estabelecer dois intervalos de linearidade distintos. Assim, para estudos posteriores foram usados dois tempos de amostragem 5 e 10 s. Comparando os sinais analíticos obtidos para um tempo de amostragem de 5 s e para um tempo de amostragem de 10 s, no primeiro caso os sinais analíticos apresentam menor amplitude mas permitem ritmos de amostragem maiores, cerca de 32 determinações por hora, do que para o tempo de 10 s que resultava num ritmo de amostragem de cerca de 19 determinações por hora. Além disso o tempo de amostragem de 5 s permitia a análise de

soluções de clomipramina num intervalo mais alargado de concentrações, uma vez que para concentrações mais elevadas de clomipramina e com um tempo de amostragem de 10 s a amplitude do sinal era limitada pela quantidade de reagente presente, que não era suficiente para reagir com toda a clomipramina, o que não acontecia com um volume de amostra menor.

Numa metodologia quimiluminométrica de fluxo a influência do caudal é um parâmetro crítico uma vez que determina o tempo de residência em frente ao fotomultiplicador, condicionando a intensidade de luz medida. Neste sentido, um caudal muito lento ou um caudal muito elevado, dependendo da cinética da reacção, pode resultar na emissão da radiação antes ou depois da célula do detector. Uma vez que a bomba de pistão estava equipada com uma seringa de 10 ml e como foi referido no Capítulo 2, o curso do êmbolo da seringa corresponde a 2500 passos, cada passo da seringa corresponderá obviamente a 4 µl. Assim, variando o tempo de passo é possível ensaiar diferentes caudais (Figura 4.4). Testaram-se tempos de passo de 0,4; 0,2 e 0,1 s que correspondem a caudais de 0,6, 1,2 e 2,4 ml min^{-1} respectivamente, obtendo-se maior intensidade de radiação emitida com um caudal de 1,2 ml min^{-1}. Uma vez que este caudal, além de resultar num sinal analítico de maior amplitude, permitia também um bom ritmo de amostragem, foi seleccionado para ensaios posteriores. O estudo do caudal foi realizado efectuando a mistura da solução de sulfito com a zona reaccional clomipramina-Ce (IV) em dois pontos diferentes, à entrada da célula de fluxo e fora do luminómetro por meio de uma confluência. Como se pode ver na Figura 4.4 os melhores resultados são obtidos quando a mistura ocorre à entrada da célula de fluxo.

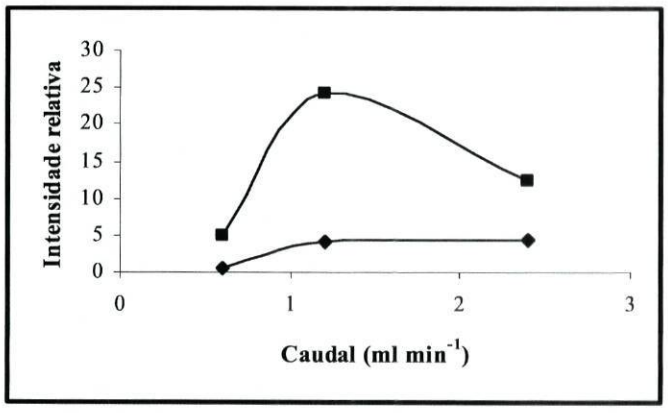


Figura 4.4 – Influência do caudal nos sinais analíticos. Os sinais referem-se a ensaios em que a mistura da solução de sulfito com a zona reaccional clomipramina-Ce (IV) era realizada à entrada da célula de fluxo (♦) e fora do luminómetro (■).

Na montagem de fluxo desenvolvida os reactores L_1 e L_2 tinham como função armazenar as soluções de amostra e Ce (IV) e a solução de sulfito, respectivamente. Assim o comprimento de L_1 e L_2 não tinha qualquer influência nos sinais analíticos tendo sido dimensionados com comprimento suficiente para impedir que, ao serem aspiradas, as soluções atingissem a seringa da bomba de pistão e contaminassem a solução de transportador. Deste modo o reactor L_1 tinha um comprimento de 1,5 m e o reactor L_2 possuía um comprimento de 6 m.

Fixados os parâmetros anteriores, o efeito da concentração de Ce (IV) na emissão de radiação foi investigado num intervalo de $5{,}0 \times 10^{-4}$ a $1{,}0 \times 10^{-2}$ mol l^{-1} verificando-se que a emissão de radiação aumentava até uma concentração de Ce (IV) $1{,}0 \times 10^{-3}$ mol l^{-1} e que depois diminuía rapidamente (Figura 4.5). A ocorrência pode ser explicada pelo facto de em elevadas concentrações o excesso de Ce (IV) poder absorver uma

quantidade significativa da radiação emitida. Assim para trabalhos posteriores seleccionou-se a concentração de 1,0 x 10^{-3} mol l^{-1}.

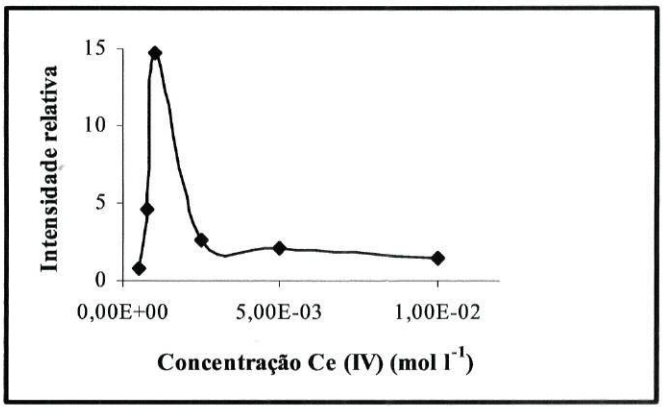


Figura 4.5 – Influência da concentração de Ce(IV) nos sinais analíticos.

A influência da concentração de sulfito na extensão da emissão de radiação foi estudada para concentrações de 5,0 x 10^{-4} até 1,0 x 10^{-2} mol l^{-1}. Observou-se que o sinal analítico aumentava até uma concentração de sulfito 1,0 x 10^{-3} mol l^{-1}, apresentando para valores superiores uma tendência para a estabilização, tendo-se seleccionado esta concentração para prosseguir os ensaios.

Uma vez que o catião Ce (IV) só pode existir em soluções de ácidos fortes, era necessário avaliar o efeito da concentração de ácido sulfúrico usado na preparação da solução de Ce (IV) na reacção de quimiluminescência. O efeito do ácido sulfúrico foi avaliado para concentrações até 1,5 mol l^{-1} (Figura 4.6), verificando-se maior intensidade de radiação emitida para uma concentração de ácido sulfúrico 0,15 mol l^{-1}.

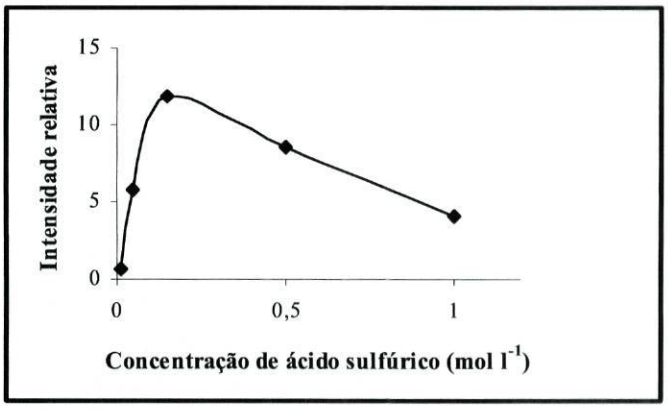


Figura 4.6 – Influência da concentração de ácido sulfúrico nos sinais analíticos.

Nas condições experimentais optimizadas (Tabela 4.2) e usando um tempo de amostragem de 5 s obtiveram-se dois intervalos de linearidade de 1 a 10 mg l^{-1} e de 30 a 60 mg l^{-1} que podem ser seleccionados na fase de preparação da amostra. Quando o tempo de amostragem usado era de 10 s obteve-se um intervalo de linearidade de 2,5 a 10 mg l^{-1}. As curvas analíticas obtidas para um tempo de amostragem de 5 s, são representadas por I = 0,49(±0,05)C + 0,38(±0,28) e por I = 0,280(±0,084)C – 4,92(±3,89) onde I se refere à intensidade relativa de radiação e C à concentração de cloridrato de clomipramina em mg l^{-1}, com coeficiente de correlação de 0,997 e de 0,990, respectivamente. Para um tempo de amostragem de 10 s a curva analítica era representada por I = 1,43(±0,26)C – 1,58(±1,75) com um coeficiente de correlação de 0,997.

Os limites de detecção eram 0,65 e 0,70 mg l^{-1} para 5 e 10 s de tempo de amostragem respectivamente. O ritmo de amostragem era de cerca de 19 determinações por hora

para um tempo de amostragem de 10 s e cerca de 32 determinações por hora para um tempo de amostragem de 5 s.

Tabela 4.2 – Valores optimizados dos parâmetros analíticos.

Parâmetros analíticos	
Concentração de Ce (IV)	1 x 10^{-3} mol l^{-1}
Concentração de sulfito de sódio	1 x 10^{-3} mol l^{-1}
Tempo de amostragem (volume de amostra)	5 s (100 µl)/ 10 s (200 µl)
Tempo de intercalação na amostragem binária	1 s clomipramina – 1 s Ce (IV) 2 s [clomipramina-Ce (IV)] – 5 s sulfito
Caudal	1,2 ml min^{-1}

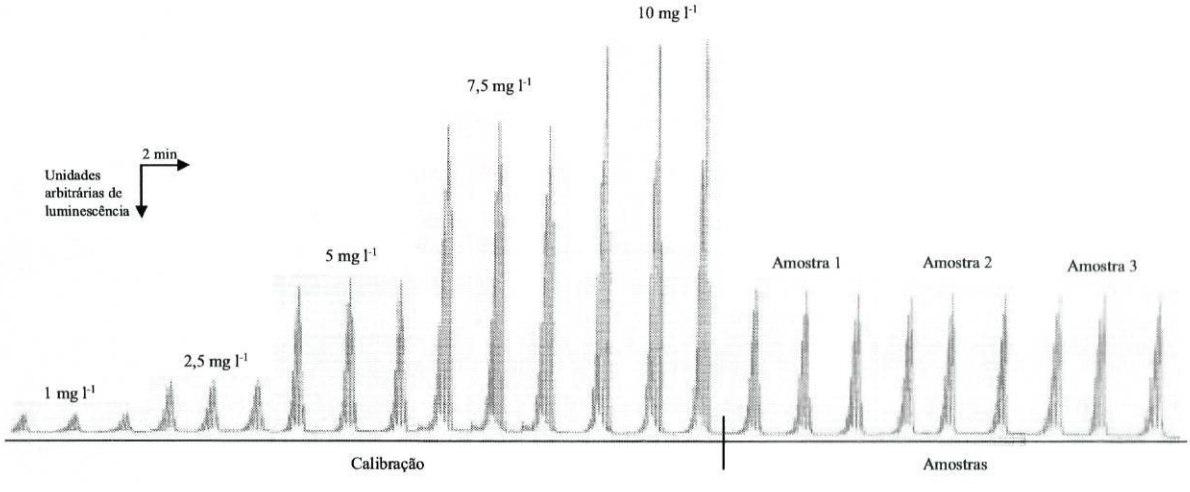


Figura 4.7 – Registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração para 5 s de tempo amostragem e na análise das amostras de formulações farmacêuticas contendo clomipramina.

4.3.2 Avaliação de interferentes

Considerando que a metodologia desenvolvida iria ser aplicada à análise de formulações farmacêuticas contendo clomipramina, existentes no mercado português, foi avaliado o efeito sobre os sinais analíticos de vários compostos utilizados como excipientes. Este estudo foi efectuado, analisando soluções contendo cloridrato de clomipramina numa concentração de 1,42 x 10^{-5} mol l^{-1} e com concentrações crescentes de cada um dos excipientes.

Estabeleceu-se o critério de que um composto era considerado interferente se a variação do sinal analítico para a concentração fixa de analito, relativamente ao obtido na sua ausência, fosse superior a 3%. Verificou-se que a sacarose e a lactose não interferiam para uma razão molar até 50 (excipiente:clomipramina) e que a glicerina não interferia para uma razão molar até 10 (excipiente:clomipramina). Uma vez que a presença destes excipientes nas formulações a analisar não excedia as razões molares referidas, não se verificava interferência na determinação de clomipramina.

4.3.3 Análise de formulações farmacêuticas

A metodologia analítica desenvolvida foi aplicada à determinação de clomipramina em formulações farmacêuticas, disponíveis no mercado português.

As soluções das diferentes amostras foram preparadas, a partir das formulações em estudo, como referido na secção Experimental deste capítulo e posteriormente analisadas no sistema de fluxo multicomutado optimizado.

Os resultados encontram-se esquematizados na Tabela 4.3 e apresentam desvios relativos da metodologia desenvolvida em relação à metodologia de referência inferiores a 3,3 %.

A realização do teste t de Student, para um nível de confiança de 95 %, evidenciou a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos (para 5 s $t_{calculado}$ = 1,736; $t_{tabelado}$ = 3,182 e para 10 s $t_{calculado}$ = 2,764; $t_{tabelado}$ = 3,182).

A análise repetida (n = 10) de solução de amostra de clomipramina de concentração 5 mg l^{-1} pela metodologia desenvolvida, originou desvios padrão relativos inferiores a 2,2% revelando uma boa repetibilidade.

Tabela 4.3 – Resultados da análise de formulações farmacêuticas contendo cloridrato de clomipramina.

Formulação Farmacêutica	**Concentração declarada (mg/formulação)**	**Tempo de amostragem (s)**	**Concentração encontrada (mg/formulação)**		**Desvio relativo* (%)**
			Metodologia desenvolvida	**Método de referência**	
Anafranil injectável	25	5 10	25,27 ± 0,63 24,95 ± 0,72	25,37 ± 0,06	-0,39 -1,66
Anafranil 10 (comprimidos)	10	5 10	8,96 ± 0,22 9,04 ± 0,26	9,06 ± 0,04	-1,10 -0,22
Anafranil 25 (comprimidos)	25	5 10	24,05 ± 0,60 23,66 ± 0,69	24,46 ± 0,20	-1,70 -3,30
Anafranil 75 (comprimidos de acção prolongada)	75	5 10	69,79 ± 1,74 70,42 ± 2,04	71,00 ± 0,13	-1,70 0,82

* Desvio relativo expresso em percentagem, da metodologia desenvolvida relativamente à metodologia de referência.

4.4 Conclusões

Foi desenvolvido um sistema de fluxo multicomutado para a determinação quimiluminométrica de clomipramina em formulações farmacêuticas. O procedimento foi implementado usando apenas uma bomba de pistão para a inserção de todas as soluções o que facilitou a automatização do sistema, operação e controlo, minimizando possíveis fontes operacionais de erros. A possibilidade de misturar mais do que um reagente num mesmo canal, evitando a utilização de multicanais e vários pontos de confluência, simplificou o processo de propulsão das soluções e o desenho da montagem. Além disso, permitiu uma efectiva manipulação da dispersão da amostra providenciando meios para a análise de amostras de clomipramina num largo intervalo de concentrações. A inserção sincronizada de volumes de reagentes com base num controlo temporizado, em secções bem definidas da zona de amostra assegurou uma formação eficiente da zona de reacção e minimizou o consumo de reagente.

O método proposto é sensível, preciso, rápido, e automático. Quando comparado com os outros métodos de quimiluminescência propostos demonstrou ser mais simples e económico, uma vez que um dos métodos propostos revelou não ser exequível para a realização de determinações de rotina de clomipramina devido à ocorrência de saturação do eléctrodo que exigia períodos de lavagem de 4 minutos entre cada determinação e o outro, baseado em HPLC exige equipamento dispendioso e técnicos especializados.

Os resultados obtidos confirmaram que a metodologia proposta é uma alternativa válida para a análise de rotina da determinação de clomipramina em formulações farmacêuticas.

4.5 Referências bibliográficas

[1] Martindale, The Complete Drug Reference, 33rd ed., Pharmaceutical Press, 2002, p.282.

[2] E. Bishop, W. Hussein, Analyst 109 (1984) 73.

[3] A. Ferancová, E. Korgová, T. Buzinkaiová, W. Kutner, I. Štěpánek, J. Labuda, Anal. Chim. Acta 447 (2001) 47.

[4] E.J. Greenhow, O. Ladipo, Anal. Chim. Acta 172 (1985) 387.

[5] H.A. Mohamed, H.Y. Hassan, A.M.I. Mohamed, S.A. Hussein, Anal. Lett. 25 (1992) 63.

[6] F. Ariöz, L. Ersoy, Pharmazie 49 (1994) 536.

[7] P. Nagaraja, M.F. Silwadi, A.A. Syed, Anal. Lett. 33 (2000) 2913.

[8] J.L.F.C. Lima, J.A.V. Prior, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 467 (2002) 75.

[9] G. Aymard, P. Livi, Y.T. Pham, B. Diquet, J. Chromatogr. B 700 (1997) 183.

[10] R. Theurillat, W. Thormann, J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1998) 751.

[11] T.A. Ivandini, B.V. Sarada, C. Terashima, T.N. Rao, D.A. Tryk, H. Ishiguro, Y. Kubota, A. Fujishima, J. Electroanal. Chem. 521 (2002) 117.

[12] J.J.B. Nevado, M.J.V. Llerena, A.M.C. Salcedo, E.A. Nuevo, J. Pharm. Biomed. Anal. 38 (2005) 52.

[13] B. Danielsson, I. Surugiu, A. Dzgoev, M. Mecklenburg, K. Ramanathan, Anal. Chim. Acta 426 (2001) 227.

[14] M.I. Acedo-Valenzuela, T. Galeano-Díaz, N. Mora-Díez, A. Silva-Rodríguez, Talanta 66 (2005) 952.

[15] F.A. Mohamed, H.A. Mohamed, S.A. Hussein, S.A. Ahmed, J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005) 139.

[16] H.S. Kou, C.C.Chen, Y.H. Huang, W.K. Ko, H.L. Wu, S.M. Wu, Anal. Chim. Acta 525 (2004) 23.

[17] G.M. Greenway, S.J.L. Dolman, Analyst 124 (1999) 759.

[18] H. Yoshida, K. Hidaka, J. Ishida, K. Yoshikuni, H. Nohta, M. Yamaguchi, Anal. Chim. Acta 413 (2000) 137.

[19] I.I. Koukli, E.G. Sarantonis, A.C. Calokerinos, Analyst 113 (1988) 603.

[20] I.I. Koukli, A.C. Calokerinos, Analyst 115 (1990) 1553.

[21] A.A. Al-Warthan, Anal. Sci. 10 (1994) 919.

[22] D.A. Paulls, A. Townshend, Analyst 120 (1995) 467.

[23] Farmacopeia Britânica 1998, vol. II, The Stationery Office, London, 1998, p. 1584.

CAPÍTULO 5

Determinação de metformina

5 Determinação de metformina

5.1 Introdução

A metformina, 1,1-dimetilbiguanida é uma biguanida hipoglicemiante oral (Figura 5.1) usada no tratamento da diabetes mellitus tipo 2 [1]. As biguanidas são usadas como suplemento do tratamento por modificação da dieta quando esta mudança só por si não é eficaz. O seu modo de actuação não está totalmente esclarecido, as biguanidas não estimulam a libertação de insulina mas requerem a presença de alguma insulina para exercer o seu efeito hipoglicémico. Os possíveis mecanismos de acção incluem um atraso na absorção da glucose a nível do tracto gastrointestinal, um aumento da sensibilidade à insulina, um aumento da utilização da glucose pelas células e inibição da gluconeogénese a nível hepático.

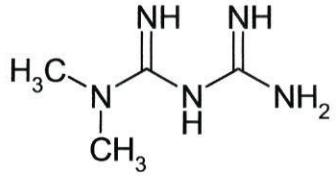


Figura 5.1 – Estrutura da metformina

Os efeitos tóxicos mais frequentes são efeitos gastrointestinais tais como vómitos, anorexia, diarreia e náuseas, podendo no caso de tratamento prolongado afectar a absorção de várias substâncias nomeadamente a vitamina B12. A administração de

biguanidas em casos de insuficiência renal, problemas cardiovasculares e alcoolismo predispõe os pacientes para a ocorrência de acidose láctica.

A metformina tem sido também utilizada no tratamento da síndrome do ovário poliquístico. Mulheres com este tipo de síndrome são frequentemente resistentes à insulina e diversos estudos indicam que o hiperinsulinismo tem um papel patogénico na estimulação da produção anormal de androgénio pelos ovários observada nestes casos. Assim, a metformina, pode reduzir a resistência à insulina e hiperinsulinémia e diminuir as irregularidades do ciclo menstrual [2,3].

Devido à sua grande importância terapêutica têm sido propostos inúmeros métodos para a determinação de metformina quer em amostras farmacêuticas quer em amostras biológicas tais como: titulação com ácido perclórico em ácido acético com detecção visual ou potenciométrica [4], ressonância magnética nuclear [5], condutimetria [6] e potenciometria usando eléctrodos baseados no par iónico metformina-tetrafenilborato [7]. Hassan *et al* propuseram a determinação de metformina em formulações farmacêuticas por três metodologias distintas: potenciometria usando eléctrodos baseados nos pares iónicos metformina-tetratiocianatodiaminocromato e metformina-tungstosilicato, fluorimetria por reacção da metformina com a crisenoquinona em meio alcalino e espectrofotometria de UV/VIS por reacção com o Cu (II) com determinação da absorvência do complexo formado a 540 nm [8]. Outra metodologia aplicando as técnicas espectrofotométricas foi proposta para a determinação de metformina, baseada na formação de um complexo com o iodo em acetonitrilo com determinação da absorvência do complexo formado aos comprimentos de onda 230, 286, e 360 nm [9]. Metodologias aplicando electroforese capilar [10] ou infra-vermelho [11] também se encontram descritas para a determinação de metformina.

As técnicas cromatográficas são as mais aplicadas à determinação de metformina, desde a cromatografia gasosa [12], passando pela cromatografia líquida de elevada eficiência com detecção por fluorescência [13] ou espectrofotometria de UV/Vis [14-19], até à cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LC-MS-MS) [20-22]. Foram também propostos métodos que incorporavam a extracção de fase sólida baseada em pares iónicos [23] ou em polímeros de impressão molecular [24,25].

Até ao momento encontra-se descrito apenas um método para a determinação quimiluminométrica da metformina baseado na sua oxidação pela N-bromosuccinimida na presença de fluoresceína [26].

A oxidação do luminol, originando 3-aminoftalato no estado excitado é uma das mais conhecidas reacções de quimiluminescência [27]. Esta reacção é catalisada por vários iões metálicos (Cu (II), Co (II), Fe (II)) e por enzimas, podendo ser usada na determinação de compostos que alterem a acção dos catalizadores. Devido à sua estrutura geral as biguanidas apresentam a capacidade de quelatar metais produzindo complexos estáveis [28]. Estas propriedades podem ser vantajosamente aproveitadas para inibir a actividade catalítica do Cu (II) na oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogénio uma vez que a extensão da inibição pode ser relacionada com a concentração de biguanida na amostra assegurando uma elevada selectividade.

No que diz respeito à utilização de metodologias de fluxo para a determinação de metformina, apenas foi usada a análise por injecção em fluxo aplicada à detecção potenciométrica [8] e quimiluminométrica [26].

Neste trabalho a técnica de fluxo multi-impulsão é, pela primeira vez, aplicada à detecção por quimiluminescência. Tal como foi referido no Capítulo 1 os sistemas de fluxo multi-impulsão baseiam-se na utilização de microbombas solenóides [29,30], cuja actuação resulta num fluxo pulsado com características hidrodinâmicas que possibilitam

uma rápida e eficiente mistura das soluções tornando a multi-impulsão extremamente atractiva para utilizar em quimiluminescência, uma vez que este tipo de detecção normalmente requer que a mistura de amostra e reagente, que deve ser rápida e extensa, ocorra o mais próximo possível do fotomultiplicador, especialmente em reacções de cinética rápida.

O objectivo deste trabalho é explorar o potencial analítico da combinação da multi-impulsão com a detecção por quimiluminescência desenvolvendo uma metodologia de fluxo multi-impulsão para a determinação quimiluminométrica de metformina baseada na inibição da radiação emitida pelo sistema luminol-H_2O_2-Cu (II) por complexação do Cu (II) com a metformina.

5.2 Experimental

5.2.1 Reagentes e soluções

Foi preparada uma solução de luminol 1,0 x 10^{-2} mol l^{-1} dissolvendo 177,2 mg em 100 ml de KOH 0,1 mol l^{-1}. Esta solução era protegida da luz, devido à fotossensibilidade do luminol.

Diariamente preparava-se uma solução de aproximadamente 0,1 mol l^{-1} de peróxido de hidrogénio por diluição de 1,02 ml de peróxido de hidrogénio 30% (m/m) em 100 ml de água desionizada.

A solução de Cu (II) 1,0 x 10^{-3} mol l^{-1} foi preparada dissolvendo 15,96 mg de sulfato de cobre (II) em 100 ml de água desionizada.

Foi preparada uma solução 500 mg l^{-1} de cloridrato de metformina dissolvendo 25 mg em 50 ml de água desionizada. As soluções padrão foram preparadas, diariamente, por diluição rigorosa da solução mais concentrada.

5.2.2 Equipamento

O sistema de fluxo multi-impulsão desenvolvido para a determinação de metformina (Figura 5.2) era constituído por 4 microbombas solenóides de 8 µl de volume de pulso, as quais já foram caracterizadas no Capítulo 2.

Foram ainda usadas duas confluências em perspex, em forma de "Y" para ligação entre todos os componentes da montagem de fluxo e completada por tubagem de teflon com diâmetro interno de 0,8 mm.

A determinação de metformina nas formulações farmacêuticas pelo método de referência foi efectuada num espectrofotómetro UV/Vis (232 nm) já referido no Capítulo 2.

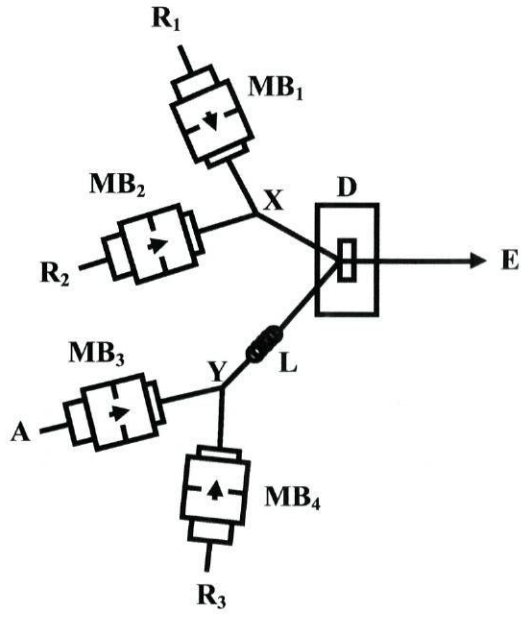


Figura 5.2 – Esquema da montagem de fluxo multi-impulsão usado na determinação de metformina em formulações farmacêuticas: MB_1, MB_2, MB_3 e MB_4 – microbombas solenóides; D – detector; L – reactor (1 m); E – esgoto; X e Y – confluências; A – amostra; R_1 – solução de luminol; R_2 – solução de peróxido de hidrogénio; R_3 – solução de Cu (II).

5.2.3 Montagem de fluxo

A montagem de fluxo (Figura 5.2) era constituída por 4 microbombas solenóides (MB_1, MB_2, MB_3 e MB_4) as quais eram responsáveis pela inserção individual das soluções e permitiam controlar não só os volumes de solução mas também o caudal, o tempo e a sequência de inserção e transporte da zona de reacção para o detector. MB_1 era responsável pela inserção da solução de luminol, MB_2 pela inserção da solução de peróxido de hidrogénio, enquanto MB_3 e MB_4 eram responsáveis pela inserção da amostra e da solução de Cu (II), respectivamente. A ligação entre todos os componentes da montagem tinha apenas o comprimento mínimo necessário, exceptuando o reactor L que possuía um comprimento de 1 m.

Inicialmente o luminol era misturado com o peróxido de hidrogénio, enquanto a amostra era misturada com a solução de Cu (II). As soluções resultantes misturavam-se à entrada da célula de fluxo produzindo a resposta quimiluminométrica em frente ao fotomultiplicador.

O ciclo analítico (Figura 5.3) iniciava-se com a activação simultânea de MB_1 e MB_2 a uma determinada frequência de pulso, gerando um fluxo (no ponto de confluência X) resultante da convergência das soluções de luminol e peróxido de hidrogénio, estabelecendo a linha de base.

Na fase seguinte, durante a inserção da amostra, o fluxo de luminol e peróxido convergia com o fluxo resultante da mistura de amostra com a solução de Cu (II) produzido pela actuação de MB_3 e MB_4. Contudo, como se pode ver na Figura 5.3 enquanto a actuação de MB_1 e MB_2 era sincronizada, a actuação de MB_3 e MB_4 era alternada em estratégia de amostragem binária permitindo a intercalação de um número definido de pequenas alíquotas de amostra e Cu (II). O volume de amostra era definido pelo número de alíquotas de amostra intercaladas em conjunto com o volume de cada

alíquota. Devido à natureza pulsante do fluxo, é atingida uma rápida homogeneização da zona de reacção no interior da célula de fluxo, originando o sinal analítico. Após detecção, MB_3 e MB_4 eram desligadas, enquanto MB_1 e MB_2 continuavam em funcionamento para lavagem.

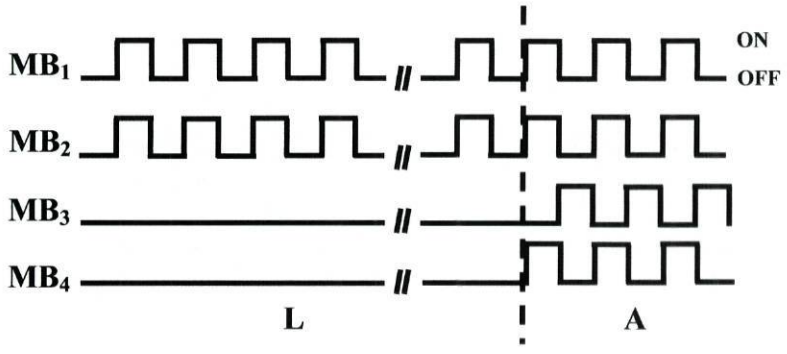


Figura 5.3 – Representação esquemática da posição das microbombas durante o ciclo analítico. MB_1, MB_2, MB_3 e MB_4 – microbombas solenóides; ON – microbomba activada; OFF – microbomba desactivada; L – definição da linha de base (60 pulsos); A – fase de inserção da amostra (3 pulsos).

5.2.4 Método de referência

Com o objectivo de avaliar a exactidão dos resultados obtidos pela metodologia desenvolvida, as amostras das formulações farmacêuticas contendo metformina foram também analisadas por espectrofotometria de UV/VIS a 232 nm de acordo com a metodologia de referência preconizada pela Farmacopeia Britânica [31].

O conteúdo de vinte comprimidos era pesado e pulverizado em almofariz de porcelana. Calculava-se a quantidade correspondente ao peso médio de uma unidade de cada

formulação e dissolvia-se em água uma quantidade de amostra referente a 100 mg de cloridrato de metformina. Após agitação durante 15 min procedia-se à filtração e diluição do filtrado. A concentração de metformina era avaliada por medição do valor de absorvência da solução final a 232 nm.

As soluções de amostra para análise pela metodologia desenvolvida eram obtidas a partir das soluções usadas no método de referência, diferindo apenas no grau de diluição, as soluções usadas na metodologia desenvolvida eram 10 vezes mais diluídas.

5.3 Resultados e discussão

O fluxo pulsado típico dos sistemas multi-impulsão, resultante da actuação das microbombas solenóides, apresenta características distintas das do fluxo laminar dos sistemas de fluxo clássicos, obtido com bombas peristálticas ou bombas de pistão. Este novo regime de escoamento afecta o tipo e a extensão da mistura que ocorre no sistema de fluxo. Efectivamente, o fluxo turbulento, associado à existência de pulsos, apresenta um movimento caótico das soluções em todas as direcções que afecta o grau de dispersão e que resulta numa mistura de amostra e reagentes mais rápida e intensa do que a obtida em condições de fluxo laminar.

5.3.1 Avaliação preliminar

Sendo a primeira vez que o conceito multi-impulsão foi aplicado à detecção por quimiluminescência, foram realizados estudos usando a reacção de oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogénio, que é uma das reacções de quimiluminescência melhor conhecida, com o objectivo de avaliar a possibilidade e vantagem da associação da quimiluminescência com o novo processo de gestão de fluidos.

Os ensaios realizados visaram o estudo da influência do volume de pulso na extensão da mistura das soluções de luminol e peróxido de hidrogénio para o que foram seleccionadas bombas de 8 e 25 µl. Estipulou-se que a linha de base seria estabelecida pela solução de luminol e a solução de peróxido de hidrogénio seria inserida segundo uma estratégia de confluência de zonas. A definição do volume de peróxido de hidrogénio era efectuada em termos do número de pulsos, sendo o volume, múltiplo do volume de pulso. Para possibilitar a comparação do efeito do volume de pulso foram usados volumes de peróxido de hidrogénio semelhantes, assim eram inseridos 3 pulsos

de solução de peróxido de hidrogénio com a bomba de 8 µl correspondendo a um volume total de 24 µl e apenas 1 pulso de solução de peróxido de hidrogénio com a bomba de 25 µl, obtendo-se um sinal analítico de maior amplitude quando se usavam 3 pulsos de 8 µl de solução de peróxido. Posteriormente compararam-se diferentes volumes de peróxido de hidrogénio, verificando-se que inserindo 6 pulsos (48 µl) de solução de peróxido com bomba de 8 µl o sinal obtido era bastante mais elevado do que inserindo 3 pulsos (24 µl) de solução de peróxido. Enquanto que usando bombas de 25 µl o sinal obtido para 25 µl (1 pulso) de solução de peróxido era semelhante ao sinal obtido para 50 µl (2 pulsos). Estes resultados demonstram que um volume de pulso menor promove uma mistura mais eficiente obtendo-se um melhor sinal analítico, tendo-se consequentemente seleccionado bombas de 8 µl para o desenvolvimento do sistema para a determinação de metformina

Verificou-se também que a introdução da solução de peróxido de hidrogénio por amostragem binária ou confluência de zonas originava um sinal analítico semelhante, uma vez que a natureza pulsada do fluxo promove uma extensa mistura no ponto onde ocorre a confluência das soluções.

A quimiluminescência requer uma mistura entre amostra e reagente rápida e eficiente, a qual como foi confirmado, pode ser rapidamente obtida com o fluxo pulsado produzido pela actuação das microbombas. Prosseguiu-se, então com o desenvolvimento de um sistema multi-impulsão dedicado à implementação da determinação de metformina por quimiluminescência.

5.3.2 Optimização dos parâmetros físico-químicos

A determinação de metformina foi baseada na inibição da actividade catalítica do catião Cu (II) na oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogénio como consequência da complexação do Cu (II) com a metformina. Enquanto a concentração de ligando aumenta, a fracção de ião metálico livre diminui, o que causa um decréscimo na intensidade de quimiluminescência. Assim a reacção entre o luminol, peróxido de hidrogénio e Cu (II) (na ausência de metformina) foi utilizada como branco para estabelecer o máximo de radiação emitida. A avaliação do efeito inibidor (ΔI) foi realizada através da diferença entre a intensidade de radiação emitida na ausência de metformina (I_B) e a intensidade de radiação emitida pela amostra (I_A), $\Delta I = I_B - I_A$. Todas as condições experimentais foram optimizadas com o objectivo de obter o efeito inibidor (ΔI) mais elevado.

A determinação de metformina compreende duas etapas distintas, por um lado ocorre a reacção de complexação da metformina com o Cu (II) e por outro a reacção de quimiluminescência que ocorre na célula de fluxo em frente ao fotomultiplicador do luminómetro.

Os estudos iniciais demonstraram que a formação do complexo metformina-Cu (II) é relativamente lenta, esta característica levou à introdução de um reactor entre o ponto de confluência Y e o detector, de modo a aumentar o tempo de residência, promovendo um incremento da extensão da reacção entre Cu (II) e metformina, aumentando o efeito inibidor. Para a mistura da solução de luminol com o peróxido não era necessário reactor, uma vez que a mistura promovida pela actuação das microbombas solenóides era suficiente para garantir uma homogeneização adequada da zona de reacção. Assim foi possível usar apenas a tubagem com o comprimento estritamente necessário para fazer a ligação entre o ponto de confluência X e o detector.

Sendo a reacção entre a metformina e o Cu (II) uma etapa importante da determinação de metformina, foram testadas diferentes estratégias de amostragem (volume único, confluência de zonas e amostragem binária), obtendo-se sinais analíticos de maior amplitude e maior efeito inibidor quando a solução de Cu (II) e a metformina eram primeiramente misturadas usando a estratégia de amostragem binária. Tal como se referiu anteriormente o conceito de amostragem binária consiste na intercalação de múltiplas alíquotas de ambas as soluções criando múltiplas interfaces de reacção, onde ocorre dispersão promovendo uma mistura mais rápida e eficiente. A zona de reacção metformina-Cu (II) era posteriormente misturada com o fluxo de luminol-peróxido de hidrogénio à entrada da célula de fluxo do detector (Figura 5.3). Seria de esperar que com o fluxo pulsado a aplicação da estratégia de amostragem binária ou confluência de zonas para a mistura de metformina com Cu (II) resultasse em sinais analíticos semelhantes. Contudo verificou-se que quando se usava a confluência de zonas os sinais obtidos eram menores, o que pode ser explicado pelo facto de que usando a estratégia de confluência de zonas o caudal total era mais elevado, uma vez que as microbombas funcionavam em simultâneo, resultando num menor tempo de residência na célula de fluxo e numa diminuição no máximo de radiação detectado. Por outro lado, durante a fase de retorno à linha de base, as soluções de metformina e Cu (II) sofrem paragem de fluxo no interior do reactor sendo interrompida a mistura proporcionada pelo fluxo pulsado, nesta situação a estratégia de amostragem binária resulta numa mistura mais eficaz comparativamente à estratégia de confluência de zonas, devido à dispersão entre as múltiplas interfaces de reacção criadas, favorecendo o desenvolvimento da reacção.

Tal como foi referido no Capítulo 1 desta dissertação, nos sistemas de fluxo multi-impulsão os volumes de amostra e reagentes são definidos em termos de número de pulsos, sendo múltiplos dos volumes de pulso (8 x n pulsos). A avaliação da influência

do volume de amostra na determinação foi efectuada estudando volumes no intervalo de 24 a 56 µl que corresponde a um número de pulsos de amostra de 3 a 7. Como foi referido anteriormente, a inserção da amostra era realizada por amostragem binária, significando que um número variável de alíquotas de metformina de 8 µl eram intercaladas com o mesmo número de alíquotas de Cu (II). Observou-se que a inserção de um volume de amostra de 56 µl (7 pulsos) juntamente com 56 µl de Cu (II), produzia um duplo pico, uma vez que a zona de reacção final era muito extensa relativamente ao volume interno da célula de fluxo (60 µl) para permitir uma mistura entre amostra e reagentes adequada. O efeito inibidor obtido com um volume de amostra de 24 µl (3 pulsos) era ligeiramente superior, além de ser menor o consumo de amostra, assim este volume foi seleccionado para ensaios posteriores.

A avaliação da influência do volume dos reagentes durante a fase de retorno à linha de base foi estudada, variando o número de pulsos de reagente entre 40 e 80 pulsos, seleccionando igual número de pulsos para o luminol e para o peróxido de hidrogénio. Os resultados demonstraram que a utilização de 60 pulsos de reagente, o que corresponde a um volume de cerca de 480 µl, era o suficiente para o retorno do sinal à linha de base, tendo sido utilizado nos ensaios posteriores.

O caudal é outro parâmetro cuja optimização é importante, uma vez que estabelece não só o tempo de reacção, mas principalmente o tempo de residência da zona de reacção no interior da célula de fluxo em frente ao fotomultiplicador condicionando a intensidade de radiação sujeita a medida. O uso de caudais muito elevados resulta num tempo de residência muito baixo o que afecta a sensibilidade e reprodutibilidade das determinações. Por outro lado, com um caudal muito baixo a eficácia de mistura do fluxo pulsado é menor e a detecção é afectada. Em sistemas de fluxo multi-impulsão o caudal é determinado pela frequência de actuação e volume de pulso da microbomba.

Tendo em conta que o limite operacional superior das microbombas é de cerca de 250 ciclos por minuto, é possível estimar o caudal máximo de 2 ml min^{-1}. No sistema de fluxo desenvolvido o caudal era controlado em termos de tempo de pulso que é definido como a soma dos tempos de paragem da microbomba nas posições activada e desactivada. Uma vez que o caudal total corresponde ao somatório dos caudais das várias microbombas, a avaliação do efeito do caudal foi efectuada testados tempos de pulso entre 0,4 e 2 segundos para cada microbomba, que correspondem a frequências de actuação entre 150 e 30 pulsos min^{-1} e a caudais entre 1,2 e 0,24 ml min^{-1} por solução. Os melhores sinais analíticos foram obtidos com um tempo de pulso de 0,6 segundos, que corresponde a uma frequência de 100 pulsos por minuto e a um caudal de 0,8 ml min^{-1} para cada solução, o qual foi usado para prosseguir a optimização dos parâmetros da montagem.

Entre os parâmetros que afectaram a amplitude do sinal analítico encontram-se as concentrações das soluções de luminol, peróxido de hidrogénio e catião Cu (II). O efeito da concentração de luminol na intensidade de quimiluminescência foi estudado para o intervalo de concentrações de $5,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol l^{-1}, verificando-se um efeito inibidor ligeiramente mais elevado para a concentração de $7,5 \times 10^{-5}$ mol l^{-1}, sendo esta seleccionada para prosseguir os ensaios.

O efeito da concentração de Cu (II) na amplitude dos sinais analíticos e no efeito inibidor foi avaliado para o intervalo de concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$ a $7,5 \times 10^{-5}$ mol l^{-1}, verificando-se um maior efeito inibidor para a concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol l^{-1}. Para concentrações superiores não foi possível avaliar as diferenças na intensidade de radiação emitida, uma vez que ocorria saturação do detector.

O efeito da concentração de peróxido de hidrogénio foi avaliado para concentrações de $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol l^{-1}, verificando-se um aumento do sinal analítico e do efeito

inibidor com o aumento da concentração de peróxido de hidrogénio. O maior efeito inibidor foi observado para uma concentração de 2,5 x 10^{-5} mol l^{-1} de peróxido de hidrogénio, tendo sido seleccionada para estudos posteriores. Para concentrações superiores o sinal analítico atingia um valor constante (saturação do detector) não sendo possível avaliar a intensidade de radiação emitida.

Uma vez que a oxidação do luminol ocorre em meio alcalino foi avaliado o efeito de várias soluções de luminol com uma concentração de 7,5 x 10^{-5} mol l^{-1} preparadas em soluções de KOH com concentrações que variavam entre 0,01 e 0,5 mol l^{-1}, obtendo-se um maior efeito inibidor para uma concentração de KOH 0,1 mol l^{-1}.

Estabelecendo a curva de calibração nas condições experimentais optimizadas observou-se que para baixas concentrações de metformina obtinham-se sinais analíticos de maior amplitude do que os obtidos na ausência de metformina, o que pode ser explicado pela estequiometria do complexo formado como consequência da razão de concentração Cu(II)/metformina. A actividade catalítica do cobre era mais elevada quando apenas dois dos quatro locais de coordenação estavam ocupados pelo ligando, contrariamente não havia actividade catalítica quando os quatro locais de coordenação estavam ocupados pelo ligando [32].

Para as condições experimentais definidas anteriormente obteve-se um intervalo de resposta linear para concentrações de metformina de 12 a 20 mg l^{-1}. Uma vez que o complexo formado depende da razão Cu (II)/metformina avaliou-se a possibilidade de obter um intervalo linear para concentrações mais baixas de metformina o que poderia ser obtido baixando a concentração de Cu (II) de modo a que mesmo com baixas concentrações de metformina os complexos formados não apresentassem actividade catalítica. Assim realizaram-se ensaios com o objectivo de diminuir a concentração de Cu (II), sendo possível baixar até uma concentração de 1,0 x 10^{-5} mol l^{-1}, para

concentrações mais baixas não era obtido sinal analítico. No entanto para esta concentração de catião Cu (II) e usando as concentrações de luminol e peróxido definidas anteriormente a amplitude dos sinais obtidos era muito baixa dificultando a avaliação do efeito inibidor. Prosseguiu-se então, ensaiando diferentes concentrações de luminol e peróxido de hidrogénio, usando uma concentração de Cu (II) de 1,0 x 10^{-5} mol l^{-1}, de modo a obter uma intensidade de radiação elevada para o branco, que possibilitasse a avaliação do efeito inibidor na presença de metformina, que como podemos observar na Figura 5.4 é obtida para concentrações de luminol e peróxido de 5,0 x 10^{-4} e 1,0 x 10^{-4} mol l^{-1} respectivamente. Usando as concentrações agora definidas para a realização da curva de calibração, obteve-se um intervalo de resposta linear para concentrações de cloridrato de metformina de 5 a 15 mg l^{-1}.

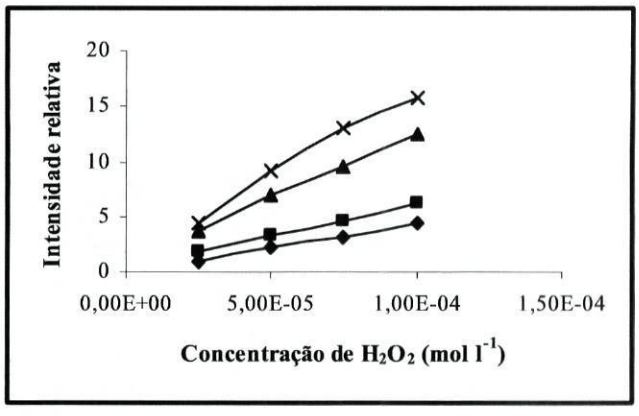


Figura 5.4 – Influência da concentração de H_2O_2 nos sinais analíticos. Os resultados foram obtidos para concentrações de luminol 7,5 x 10^{-5} mol l^{-1} (♦); 1,0 x 10^{-4} mol l^{-1} (■); 2,5 x 10^{-4} mol l^{-1} (▲) e 5,0 x 10^{-4} mol l^{-1} (x).

Nas condições experimentais optimizadas (Tabela 5.1) e alterando apenas as concentrações dos reagentes, obtiveram-se duas rectas de calibração com intervalos de linearidade diferentes. Para uma concentração de Cu (II) 1,0 x 10^{-5} mol l^{-1} e para um intervalo de linearidade de 5 a 15 mg l^{-1}, a curva de calibração era representada por ΔI = 8,16(±0,61)C + 1,44(±0,60), onde ΔI se refere à diferença entre a intensidade do branco e a intensidade da amostra e C ao logaritmo da concentração de cloridrato de metformina, com um coeficiente de correlação de 0,998. Para uma concentração de Cu (II) 5,0 x 10^{-5} mol l^{-1} e um intervalo de linearidade de 12 a 20 mg l^{-1}, a curva de calibração era representada por ΔI = 0,372(±0,058)C + 0,898(±0,944), onde ΔI se refere à diferença entre a intensidade do branco e a intensidade da amostra e C à concentração de metformina expressa em mg l^{-1}, com um coeficiente de correlação de 0,993.

O limite de detecção, calculado como já foi referido no Capítulo 2, era 0,94 mg l^{-1} e 1,76 mg l^{-1} para os intervalos de linearidade de 5 a 15 mg l^{-1} e de 12 a 20 mg l^{-1}, respectivamente. A metodologia permitia efectuar cerca de 95 determinações por hora.

Tabela 5.1 – Valores optimizados dos parâmetros analíticos.

Parâmetros analíticos	**12 – 20 mg l^{-1}**	**5 – 15 mg l^{-1}**
Concentração de Cu (II)	5,0 x 10^{-5} mol l^{-1}	1,0 x 10^{-5} mol l^{-1}
Concentração de luminol	7,5 x 10^{-5} mol l^{-1}	5 x 10^{-4} mol l^{-1}
Concentração de peróxido de hidrogénio	2,5 x 10^{-5} mol l^{-1}	1,0 x 10^{-4} mol l^{-1}
Volume de amostra (número de pulsos)	24 µl (3 pulsos)	24 µl (3 pulsos)
Volume de reagente (número de pulsos)	480 µl (60 pulsos)	480 µl (60 pulsos)
Caudal (por solução)	0,8 ml min^{-1}	0,8 ml min^{-1}

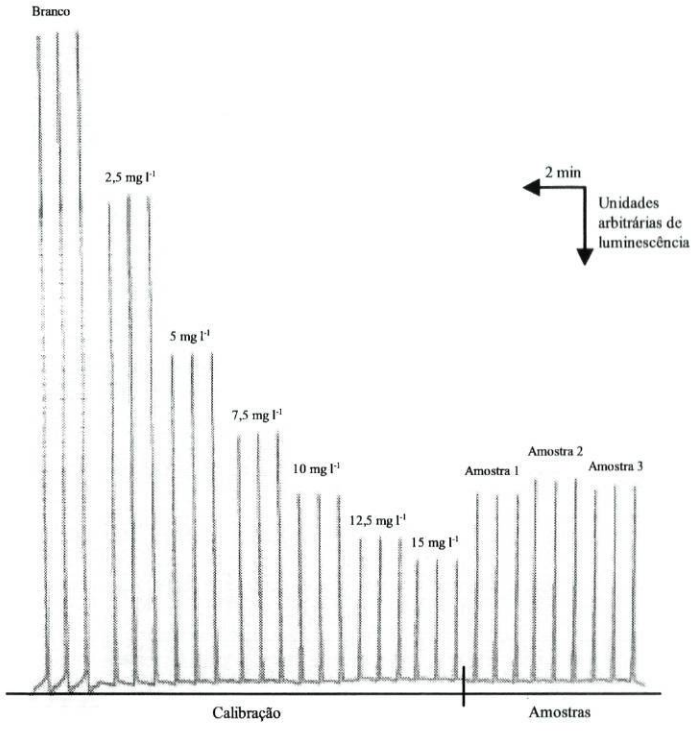


Figura 5.5 – Registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração e análise das amostras de formulações farmacêuticas contendo cloridrato de metformina.

5.3.3 Avaliação de interferentes

Considerando que a metodologia desenvolvida iria ser aplicada à determinação de metformina em formulações farmacêuticas existentes no mercado português, foi avaliado o efeito sobre os sinais analíticos de vários compostos utilizados como excipientes. Este estudo foi efectuado, analisando soluções contendo cloridrato de metformina numa concentração fixa de 9,06 x 10^{-5} mol l^{-1} e concentrações crescentes de cada um dos excipientes ensaiados.

Estabeleceu-se o critério de que um composto era considerado interferente se a variação do sinal analítico para a concentração fixada de analito, fosse superior a 3%, relativamente ao sinal analítico obtido na sua ausência. Os resultados obtidos demonstraram que com os parâmetros de reacção utilizados, alguns compostos apresentam interferência. Contudo o macrogol, a polivinilpirrolidona e o estearato de magnésio apresentam um efeito interferente em concentrações muito superiores às encontradas nas formulações, considerando que o conteúdo total de excipientes representa menos de 6,5% (m/m) das formulações analisadas, não se verificando, por isso interferência na determinação de metformina.

5.3.4 Análise de formulações farmacêuticas

A metodologia analítica desenvolvida foi aplicada à determinação de metformina em formulações farmacêuticas sólidas, disponíveis no mercado português.

As soluções das diferentes amostras foram preparadas, a partir das formulações em estudo, como referido na secção Experimental deste capítulo e posteriormente analisadas no sistema de fluxo multi-impulsão optimizado.

Os resultados encontram-se esquematizados na Tabela 5.2 e apresentam desvios relativos da metodologia desenvolvida em relação à metodologia de referência, inferiores a 1,5%.

A realização do teste t de Student, para um nível de confiança de 95%, confirmou a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos ($t_{calculado} = 0,02785$, $t_{tabelado} = 2,776$).

A análise repetida (n = 10) de soluções de amostra de metformina 10 mg l^{-1} pela metodologia desenvolvida, originou desvios padrão relativos inferiores a 2% revelando uma boa repetibilidade.

Tabela 5.2 – Resultados da análise de formulações farmacêuticas contendo cloridrato de metformina.

Formulação Farmacêutica	**Quantidade declarada (mg/formulação)**	**Quantidade encontrada (mg/formulação)**		**Desvio relativo* (%)**
		Método referência	**Método desenvolvido**	
Risidon 850 (comprimidos)	850	837,27 ± 14,95	834,82 ± 9,66	0,30%
Risidon 1000 (comprimidos)	1000	1006,02 ± 14,51	1021,09 ± 9,72	1,50%
Glucophage (comprimidos)	500	491,54 ± 12,01	496,93 ± 9,74	1,10%

* Desvio relativo expresso em percentagem, da metodologia desenvolvida relativamente à metodologia de referência.

5.4 Conclusões

Uma nova técnica de fluxo – multi-impulsão – foi pela primeira vez aplicada à detecção por quimiluminescência com sucesso, permitindo a implementação de uma metodologia analítica precisa, reprodutível, simples, versátil, e com elevado nível de automação. De facto, o uso de microbombas solenóides como único elemento activo, responsáveis pelas diferentes tarefas como propulsão de fluidos, inserção de amostra e reagentes e elementos comutadores confere elevada versatilidade ao sistema de fluxo e facilita o controlo de todo o sistema. Com este nível de automação parâmetros fundamentais como o volume de amostra, o volume dos reagentes e o caudal são facilmente ajustados garantindo um controlo efectivo da homogeneização da zona reaccional e desenvolvimento da reacção.

As características hidrodinâmicas do fluxo pulsado permitiram uma mistura entre amostra e reagentes eficiente, mesmo em condições de dispersão limitada, facilitando o desenvolvimento da reacção. Esta situação é particularmente atractiva quando o sinal analítico resulta da emissão de quimiluminescência originada pela mistura entre amostra e reagentes na entrada da célula de fluxo.

Relativamente aos métodos descritos na literatura para a determinação de metformina, a metodologia desenvolvida baseada no efeito inibidor da metformina na oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogénio, catalisada pelo Cu (II), devido à sua capacidade de complexar os iões Cu (II) demonstrou ser uma alternativa válida para a análise de rotina de metformina em formulações farmacêuticas, uma vez que exibe um elevado nível de automação, usa equipamento de baixo custo, é rápida, assegurando um elevado ritmo de amostragem, assim como é selectiva devido ao limitado nível de interferências. Quando comparado com o método quimiluminométrico em FIA [26] proposto anteriormente, apesar de exibir um intervalo de trabalho mais estreito, o método

desenvolvido é totalmente automatizado, apresenta um ritmo de amostragem ligeiramente superior, consome muito menos reagentes e gera um volume muito menor de efluente. De facto eram gastos por determinação cerca de 38 ng de Cu(II), 45 μg de luminol e 2 μg de peróxido de hidrogénio e gerava-se cerca de 1 ml de efluente.

5.5 Referências bibliográficas

[1] Martindale, The Complete Drug Reference, 33rd ed. Pharmaceutical Press, 2002, p.332.

[2] B. Kolodziejczyk, A.J. Duleba, R.Z. Spaczynski, L. Pawelczyk, Fertil. Steril. 73 (2000) 1149.

[3] P. Moghetti, R. Castello, C. Negri, F. Tosi, F. Perrone, M. Caputo, E. Zanolin, M. Muggeo, J. Clin. Endocrinol. Metab. 85 (2000) 139.

[4] J.M. Calatayud, M.C.P. Martí, P.C. Falcó, Analyst 110 (1985) 981.

[5] S.Z. El-Khateeb, H.N. Assaad, M.G. El-Bardicy, A.S. Ahmad, Anal. Chim. Acta 208 (1988) 321.

[6] J.M. Calatayud, P.C. Falcó, M.C.P. Martí, Anal. Lett. 18 (1985) 1381.

[7] M.S. Rizk, H.M. Abdel-Fattah, Y.M. Issa, E.M. Atia, Anal. Lett. 26 (1993) 415.

[8] S.S.M. Hassan, W.H. Mahmoud, M.A.F. Elmosallamy, A.H.M. Othman, Anal. Chim. Acta 378 (1999) 299.

[9] S. Ashour, R. Kabbani, Anal. Lett. 36 (2003) 361.

[10] J.Z. Song, H.F. Chen, S.J. Tian, Z.P. Sun, J. Chromatogr. B 708 (1998) 277.

[11] I.H.I. Habib, M.S. Kamel, Talanta 60 (2003) 185.

[12] S.B. Matin, J.H. Karam, P.H. Forsham, Anal. Chem. 47 (1975) 545.

[13] M. Ohta, M. Iwasaki, M. Kai, Y. Ohkura, Anal. Sci. 9 (1993) 217.

[14] K.H. Yuen, K.K. Peh, J. Chromatogr. B 710 (1998) 243.

[15] C.L. Cheng, C.H. Chou, J. Chromatogr. B 762 (2001) 51.

[16] M. Vasudevan, J. Ravi, S. Ravisankar, B. Suresh, J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 77.

[17] M. Zhang, G.A. Moore, M. Lever, S.J. Gardiner, C.M.J. Kirkpatrick, E.J. Begg, J. Chromatogr. B 766 (2001) 175.

[18] A. Zarghi, S.M. Foroutan, A. Shafaati, A. Khoddam, J. Pharm. Biomed. Anal. 31 (2003) 197.

[19] F. Tache, V. David, A. Farca, A. Medvedovici, Microchem. J. 68 (2001) 13.

[20] K. Heinig, F. Bucheli, J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004) 1005.

[21] Y. Wang, Y. Tang, J. Gu, J.P. Fawcett, X. Bai, J. Chromatogr. B 808 (2004) 215.

[22] N. Koseki, H. Kawashita, M. Niina, Y. Nagae, N. Masuda, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2005) 1063.

[23] S. AbuRuz, J. Millership, J. McElnay, J. Chromatogr. B 798 (2003) 203.

[24] E.P.C. Lai, S.Y. Feng, Microchem. J. 75 (2003) 159.

[25] S.Y. Feng, E.P.C. Lay, E. Dabek-Zlotorzynska, S. Sadeghi, J. Chromatogr. A 1027 (2004) 155.

[26] Z. Wang, Z. Zhang, Z. Fu, W. Luo, X. Zhang, Anal. Lett. 36 (2003) 2683.

[27] A.M. Garcia-Campaña, W.R.G Baeyens, Chemiluminescence in Analytical Chemistry, Marcel Dekker, Nova York 2001.

[28] W.O. Foye, R.L. O'Laughlin, R.N. Duvall, J. Pharm. Sci. 50 (1961) 641.

[29] R.A.S Lapa, J.L.F.C Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 466 (2002) 125.

[30] J.L.F.C. Lima, J.L.M. Santos, A.C.B. Dias, M.F.T. Ribeiro, E.A.G Zagatto, Talanta 64 (2004) 1091.

[31] Farmacopeia Britânica 1998, vol II, The Stationery Office, London, p.1802

[32] P Viñas, I.Lopez Garcia, J.A. Martinez Gil, J. Pharm. Biomed. Anal. 11 (1993) 15.

CAPÍTULO 6

Avaliação da capacidade antioxidante através da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio

6. Avaliação da capacidade antioxidante através da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio

6.1 Introdução

As estruturas biológicas estão permanentemente expostas ao stress oxidativo [1] potencialmente prejudicial, normalmente associado a espécies reactivas de oxigénio (ROS – reactive oxygen species) que podem incluir espécies não radicalares como o peróxido de hidrogénio. Estas espécies, que geralmente têm funções fisiológicas, são frequentemente implicadas na etiologia de várias patologias humanas tais como doenças cardiovasculares, cancro e degenerescência do sistema nervoso central (por exemplo, a doença de Alzheimer) [2]. As lesões celulares causadas pela geração de ROS e sistemas "scavenging" oxidativos podem ser prevenidas pela ingestão de agentes antioxidantes capazes de inibir de forma efectiva estas reacções nocivas [3].

Durante os últimos anos, verificou-se um crescente interesse na aplicação terapêutica de antioxidantes e no consumo de suplementos dietéticos contendo misturas de moléculas antioxidantes. Com este fim, o conhecimento da capacidade antioxidante total de uma espécie quer natural quer artificial, é essencial para a compreensão da sua susceptibilidade ao stress oxidativo e para avaliação do seu potencial terapêutico. Vários ensaios para a medição da capacidade "scavenging" de diferentes moléculas têm sido desenvolvidos, a maioria envolvendo a geração de radicais livres e a avaliação da capacidade da molécula antioxidante em inibir esta geração [4].

Os distintos sistemas reactivos gerados artificialmente para avaliação da capacidade antioxidante total diferem na selecção da fonte oxidativa e no alvo, assim como na estratégia de avaliação dos produtos de oxidação. Neste contexto, devem ser destacados

diferentes tipos de ensaios, tais como o TRAP (total radical trapping parameter) [3,5], o TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) [6], o ORAC (oxygen radical absorbance capacity) [7], o TOSC (total oxyradical scavenging capacity) [8] e o FRAP (ferric reducing/antioxidant power) [9].

A avaliação dos produtos de oxidação tem sido efectuada recorrendo sobretudo a métodos espectrofotométricos [6,9-12] e fluorimétricos [13-15], estando também descritos alguns métodos electroquímicos [16-18]. A detecção por quimiluminescência tem sido, também, bastante utilizada devido à sua elevada sensibilidade, simplicidade e rapidez. Assim, foram descritas diferentes misturas reaccionais, a maioria das quais utiliza diferentes reagentes, tal como o permanganato de potássio [19], 9-benzilacridina [20] ou lucigenina [21], ou diferentes iniciadores de stress oxidativo tais como hidroperóxidos lipídicos [22] e AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano) [23,24]. No entanto a reacção de quimiluminescência mais utilizada para a avaliação da actividade antioxidante é a oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogénio [25-29].

O luminol é oxidado pelo peróxido de hidrogénio resultando na formação do 3-aminoftalato no estado excitado, que emite radiação ao regressar ao estado fundamental. A adição de antioxidante "scavenger" a esta mistura origina uma diminuição da intensidade de quimiluminescência, por remoção do peróxido de hidrogénio. Assim a redução instantânea da intensidade de quimiluminescência do luminol provocada pelo composto em estudo pode ser considerada medida da sua actividade antioxidante.

As determinações que visam a avaliação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio é uma das metodologias que permite estimar a actividade "scavenging" do oxigénio em vários tipos de amostra. Este tipo de actividade não pode ser expressa como actividade total uma vez que os antioxidantes podem actuar por "scavenging" de espécies reactivas, mas também por regulação de sistemas antioxidantes endógenos.

Os ensaios utilizados para determinar a capacidade "scavenging" de moléculas com actividade antioxidante são geralmente caracterizados pelo baixo nível de automação e baseados em métodos discretos manuais, envolvendo o uso de detectores de célula única ou leitores de microplaca, sendo a preparação das soluções processada manualmente. As medições são morosas, laboriosas e dispendiosas, sendo também permeáveis a erros operacionais, como uma mistura inadequada entre amostra e reagente, podendo afectar a precisão e exactidão.

A implementação por procedimentos tradicionais de reacções de quimiluminescência que decorrem rapidamente envolvendo luminómetros de célula única ou de microplaca sofre de uma limitação adicional decorrente da necessidade de uma rápida mistura de amostra e reagentes e de um pequeno intervalo de tempo antes da medição.

Deste modo, e dadas as desvantagens referidas anteriormente para os métodos discretos, foram propostas várias metodologias recorrendo a diferentes técnicas de fluxo. A análise por injecção em fluxo (FIA) é a mais utilizada para a determinação de actividade antioxidante, tendo sido associada a diversos tipos de detecção: electroquímica [18,30,31], espectrofotometria de UV/Vis [32], fluorimetria [33] e quimiluminescência [19,34-38]. Labrinea *et al* propuseram a utilização da estratégia de paragem de fluxo para a determinação da capacidade antioxidante de vários compostos com detecção espectrofotométrica UV/Vis [39].

A análise por injecção sequencial foi também utilizada para a determinação da actividade antioxidante de extractos de plantas com detecção espectrofotométrica [40] e de vinhos com detecção simultânea por fluorimetria e espectrofotometria UV/Vis [41]. Recentemente foi proposta a aplicação da análise em fluxo por multiseringa para a determinação da capacidade antioxidante com detecção espectrofotométrica, em produtos alimentares [42].

Até ao momento não se encontra descrito na literatura nenhuma metodologia para a determinação da capacidade antioxidante por sistemas de fluxo multi-impulsão o que pode parecer surpreendente considerando a grande capacidade e rapidez de mistura destes sistemas, mas certamente justificável por se tratar de um processo de gestão de fluidos recentemente referido na literatura.

Tal como foi referido anteriormente, são várias as metodologias descritas na literatura referentes à determinação da capacidade antioxidante por quimiluminescência utilizando a análise por injecção em fluxo [19,34-38]. De facto as características analíticas altamente vantajosas associadas às medições quimiluminométricas – simplicidade operacional, uso de equipamento de baixo custo, amplos intervalos de linearidade, sensibilidade e selectividade – tornam-se mais evidentes quando o procedimento é implementado num analisador automatizado, e neste ponto de vista a análise em fluxo representa uma alternativa vantajosa.

Os sistemas de fluxo multi-impulsão foram recentemente propostos como uma nova abordagem automatizada à manipulação de amostra e reagentes, para a implementação de procedimentos analíticos rápidos, fiáveis, de baixo custo e versáteis [43]. Estas são circunstâncias atractivas quando a mistura de amostra e reagentes ocorre na célula de fluxo do detector e quando se realizam medições de reacções de quimiluminescência de cinética rápida.

O principal objectivo deste trabalho foi avaliar em detalhe a vantagem do potencial de mistura, versatilidade e simplicidade operacional dos sistemas multi-impulsão para desenvolver uma metodologia analítica automatizada de fluxo para a determinação da capacidade antioxidante do trolox, ácido ascórbico e resveratrol baseado no efeito inibidor destes compostos na reacção de quimiluminescência do luminol ou lucigenina

com o peróxido de hidrogénio. O sistema de fluxo desenvolvido foi também aplicado à determinação da capacidade antioxidante de várias formulações farmacêuticas.

6.2 Experimental

6.2.1 Reagentes e soluções

Preparou-se uma solução 1,0 x 10^{-2} mol l^{-1} de luminol dissolvendo 17,7 mg de sólido em 10 ml de KOH 0,1 mol l^{-1}.

A solução de H_2O_2 1,0 x 10^{-3} mol l^{-1} usada na reacção com o luminol, foi preparada diariamente, por diluição de uma solução concentrada 9,7 mol l^{-1} em água desionizada.

A solução de lucigenina 1,0 x 10^{-2} mol l^{-1} foi preparada diariamente, dissolvendo 17,8 mg de lucigenina em 10 ml de tampão Tris (pH 7,4). A solução tampão era preparada dissolvendo 0,6 g de Tris em 100 ml de HCl 0,04 mol l^{-1}.

A solução de H_2O_2 2,5 mol l^{-1} usada na reacção com a lucigenina, foi preparada diariamente, por diluição de uma solução concentrada 9,7 mol l^{-1} em água desionizada.

As soluções de 5,7 x 10^{-3} mol l^{-1} de ácido ascórbico, 2,0 x 10^{-3} mol l^{-1} de trolox e 5,0 x 10^{-5} mol l^{-1} de resveratrol foram preparadas diariamente, por dissolução de 25 mg, 5 mg e 1,14 mg do respectivo sólido, em 25 ml de água desionizada, em 10 ml de KOH 0,1 mol l^{-1} e 100 ml de metanol a 10% (v/v), respectivamente. As soluções padrão dos antioxidantes foram preparadas por diluição rigorosa das soluções concentradas.

As soluções de amostra de formulações farmacêuticas (comprimidos efervescentes) foram preparadas por pesagem de vinte comprimidos que de seguida eram pulverizados em almofariz de porcelana. Calculava-se a quantidade correspondente ao peso médio de uma unidade de cada formulação e dissolvia-se em 100 ml de água desionizada uma quantidade de amostra referente a 1,0 g de ácido ascórbico.

No caso da solução oral, a solução de amostra era preparada por diluição do volume referente a 125 mg de extracto de ginkgo biloba em 25 ml de água desionizada.

Todas as soluções, excepto as de peróxido de hidrogénio, eram mantidas ao abrigo da luz devido à fotossensibilidade das substâncias.

6.2.2 Equipamento

O sistema de fluxo multi-impulsão desenvolvido para a determinação da actividade antioxidante (Figura 6.1) era constituído por três microbombas solenóides com um volume de pulso de 8µl, as quais foram já caracterizadas no Capítulo 2.

Usou-se ainda uma confluência em perspex, em forma de "+", construída para este fim e a ligação entre todos os componentes do sistema era efectuada através de tubo de teflon com diâmetro interno de 0,8 mm.

6.2.3 Montagem de fluxo

A montagem de fluxo multi-impulsão desenvolvida para a determinação da actividade antioxidante por quimiluminescência (Figura 6.1) era constituída por 3 microbombas solenóides responsáveis pela inserção e propulsão das soluções envolvidas. As soluções de antioxidante (trolox, ácido ascórbico e resveratrol), oxidante (peróxido de hidrogénio) e de reagente quimiluminogénico (luminol ou lucigenina) eram inseridas por actuação de MB_1, MB_2 e MB_3, respectivamente.

Dependendo do reagente quimiluminogénico em avaliação, a inserção de amostra era efectuada de forma diferente como se refere seguidamente.

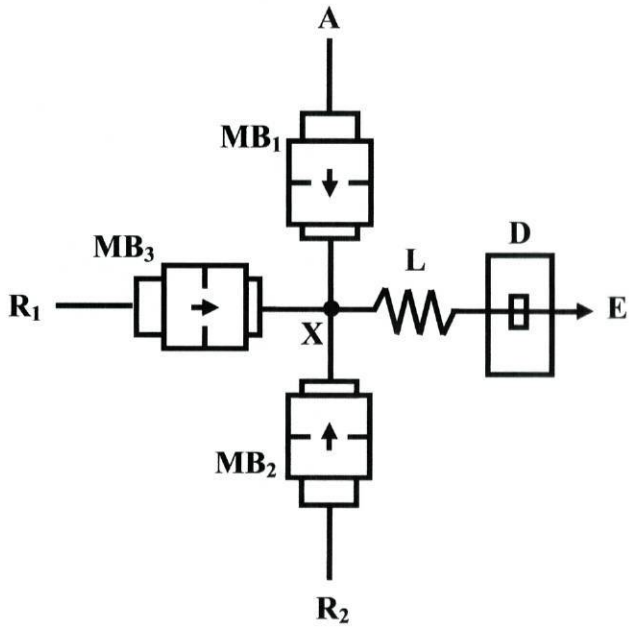
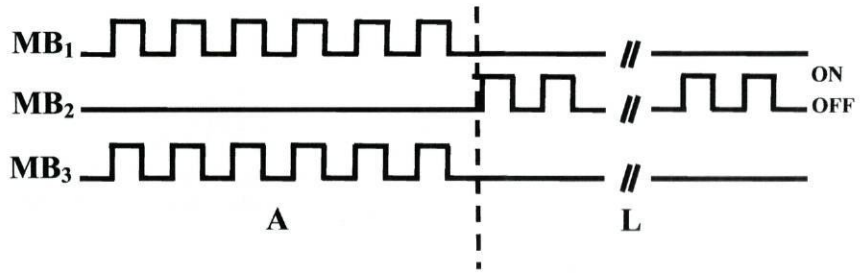


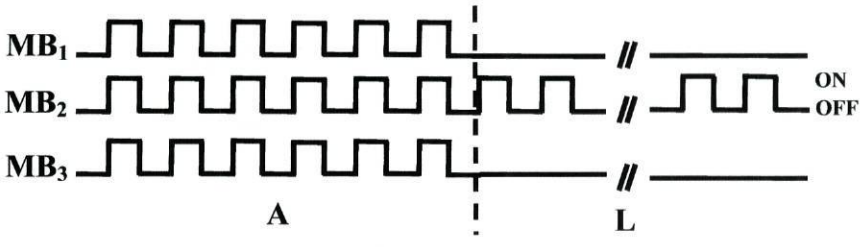
Figura 6.1 – Esquema da montagem de fluxo multi-impulsão usada na avaliação da capacidade antioxidante de formulações farmacêuticas: MB_1, MB_2 e MB_3 – microbombas solenóides, D – detector, L – reactor, E – esgoto, X – confluência, A – amostra, R_1 – reagente quimiluminogénico (luminol ou lucigenina), R_2 – reagente oxidante (H_2O_2)

Quando se usava o luminol como reagente quimiluminogénico (Figura 6.2 I), a amostra e o reagente eram introduzidos no percurso analítico por funcionamento simultâneo, rápido e repetido das microbombas MB_1 e MB_3, misturando-se no interior do reactor, enquanto MB_2 era mantida desligada para evitar diluição no ponto de confluência X. Posteriormente, por actuação de MB_2 (MB_1 e MB_3 eram desligadas) a zona de reacção inicial, formada pela amostra e pelo luminol, era transportada para o detector, misturando-se e reagindo com a solução transportadora de peróxido de hidrogénio produzindo a resposta quimiluminescente. Alternativamente, quando a lucigenina era

utilizada como reagente quimiluminogénico (Figura 6.2 II), todas as bombas eram operadas simultaneamente e a zona de reacção constituída pela amostra, lucigenina e peróxido de hidrogénio era imediatamente formada no interior do percurso analítico. Esta zona reaccional era, de seguida, transportada para detecção por actuação repetida de MB_2, como na situação previamente descrita. A passagem da zona de amostra pelo detector originava um sinal transiente que era registado como um pico.



I



II

Figura 6.2 – Representação esquemática da posição das microbombas durante o ciclo analítico para o luminol (I) e para a lucigenina (II). MB_1, MB_2 e MB_3 – microbombas solenóides; ON – microbomba activada; OFF – microbomba desactivada; L – fase de retorno à linha de base (60 pulsos); A – fase de inserção da amostra (6 pulsos).

6.3 Resultados e discussão

A implementação das reacções de quimiluminescência num sistema de fluxo multi-impulsão requer a optimização de vários parâmetros, como caudal, volumes e concentrações de amostra e reagentes, comprimento de reactor e tempo disponível para desenvolvimento da reacção, de modo a maximizar a diferença entre a emissão de radiação pelo branco e a emissão de radiação pela solução de antioxidante em avaliação. A optimização da metodologia automática foi efectuada recorrendo ao ácido ascórbico como substância padrão. A capacidade antioxidante dos compostos testados foi avaliada em termos da sua capacidade para inibir a oxidação do luminol ou da lucigenina pelo peróxido de hidrogénio, sendo os resultados expressos em percentagem de inibição. A percentagem de inibição (I%) foi calculada como:

$$I\% = (h_{branco} - h_{amostra}) \times 100/h_{branco}$$

onde h_{branco} e $h_{amostra}$ representam a altura dos picos referentes à solução sem composto antioxidante e às soluções dos compostos antioxidantes testados. Outro parâmetro avaliado indica a concentração de antioxidante que causa 50% de inibição (IC_{50}) e era estimado a partir da representação gráfica da I% versus log C (concentração de antioxidante).

6.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos

A oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogénio em condições alcalinas é uma das mais conhecidas e eficientes reacções de quimiluminescência. Esta reacção ocorre sob uma ampla diversidade de condições, devendo os parâmetros envolvidos ser controlados, desenvolvendo um procedimento analítico específico de modo a permitir a obtenção de um sinal (na ausência de amostra ou padrão com acção antioxidante) com

intensidade suficiente para que se avalie a sua diminuição, na presença de compostos com acção antioxidante.

Nos sistemas de fluxo multi-impulsão, a ordem de introdução das soluções envolvidas na reacção pode influenciar significativamente a intensidade de sinal obtido. De facto a utilização das microbombas solenóides como elementos comutadores possibilita a implementação de diferentes abordagens para a introdução de amostra e reagentes, tais como a amostragem binária, confluência de zonas e volume único, obtendo-se uma elevada versatilidade na mistura da amostra e reagentes, e por conseguinte uma dispersão limitada da amostra. Deste modo, a ordem de inserção das diferentes soluções foi estudada de forma a encontrar a sequência que favorecia a mistura e o sinal analítico, promovendo a actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio pela amostra antioxidante. Concluiu-se, com base nos resultados obtidos que a situação óptima seria a inserção simultânea das soluções numa configuração semelhante à estratégia de confluência de zonas. Verificou-se, que quando o reagente quimiluminogénico utilizado era o luminol, eram obtidos melhores resultados inserindo a amostra em simultâneo com a solução de luminol, sendo a zona reaccional misturada com a solução de peróxido de hidrogénio durante o transporte para a detecção. Alternativamente, para a reacção com a lucigenina era efectuada a inserção em simultâneo de todas as soluções, uma vez que a reacção é mais lenta e desta forma favorece-se o contacto mais eficaz entre as soluções.

Em ambas as situações de mistura da amostra com o reagente, o estabelecimento e desenvolvimento da zona de reacção é realizada por meio de dois processos complementares: a inserção simultânea das soluções numa configuração análoga à estratégia de confluência de zonas e a natureza pulsante do fluxo. De facto, o deslocamento repentino do diafragma da microbomba gera um movimento brusco de solução que é abruptamente introduzida no sistema de fluxo, seguido por um curto

período de pausa para enchimento da microbomba. Estas condições de fluxo alternativas originam um fluxo pulsado caracterizado pelo movimento caótico das soluções em todas as direcções, contribuindo para uma eficiente homogeneização da zona de amostra, favorecendo assim o desenvolvimento da reacção.

A determinação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio baseia-se na oxidação do reagente quimiluminogénico que resulta na emissão de radiação. A avaliação da influência da concentração de luminol foi efectuada para o intervalo de concentrações de 5,0 x 10^{-4} a 2,0 x 10^{-3} mol l^{-1} e a maior percentagem de inibição foi obtida para uma concentração de luminol 1,0 x 10^{-3} mol l^{-1}. Para valores superiores quer o sinal do branco quer o sinal da amostra decresciam, resultando numa diminuição pronunciada da amplitude dos sinais analíticos obtidos, mais acentuada para os sinais do branco. Uma possível explicação para este facto é que o aumento da concentração de luminol pode levar a um aumento da velocidade de reacção e o máximo da emissão de radiação ocorrer antes da zona reaccional atingir a célula de fluxo.

O efeito da concentração de H_2O_2, utilizado na reacção com o luminol, na intensidade de radiação emitida e no efeito "scavenging" foi avaliado para concentrações de 5,0 x 10^{-4} a 2,0 x 10^{-3} mol l^{-1}, observando-se que um aumento da concentração de oxidante resultava num ligeiro aumento da sensibilidade. Uma vez que o sinal do branco exibia um valor máximo para 1,0 x 10^{-3} mol l^{-1} o que correspondia a uma maior percentagem de inibição esta concentração foi seleccionada para prosseguir os estudos de optimização.

No que diz respeito à reacção entre a lucigenina e o H_2O_2, foram avaliadas concentrações de lucigenina no intervalo de 5,0 x 10^{-4} a 4,0 x 10^{-3} mol l^{-1}, observando-se um aumento dos sinais analíticos para concentrações até 3,5 x 10^{-3} mol l^{-1}, tendendo

para a estabilização para valores superiores. Assim esta foi a concentração de lucigenina escolhida para ensaios posteriores.

O efeito da concentração de H_2O_2, a utilizar na reacção com a lucigenina, na amplitude dos sinais analíticos foi estudado para o intervalo de 0,5 a 3,0 mol l^{-1}. Estes valores de concentração são substancialmente mais elevados do que os utilizados na reacção com o luminol porque a reacção é mais lenta e menos sensível. Verificou-se então que uma concentração de H_2O_2 inferior a 2 mol l^{-1} não fornecia massa de oxidante suficiente para a oxidação completa da lucigenina, resultando num duplo pico. De facto, como o H_2O_2 desempenha também funções de transportador, existe em maior quantidade nas extremidades da zona reaccional e em menor quantidade no interior da mistura, resultando numa completa oxidação da lucigenina apenas nas extremidades da zona reaccional. Aumentando a concentração de H_2O_2 obtinha-se uma oxidação completa da lucigenina em toda a zona reaccional o que resultava num aumento do sinal analítico e na eliminação do duplo pico. Para valores superiores a 2,5 mol l^{-1} não se observava um aumento significativo na amplitude do sinal analítico, tendo sido escolhida a concentração de 2,5 mol l^{-1} para prosseguir os estudos de optimização.

O pH é um dos factores que afecta a intensidade de radiação emitida numa reacção de quimiluminescência. Foi estabelecido um valor de pH de 7,4 unidades para o tampão Tris usado na preparação da solução de lucigenina de modo a simular um pH semelhante ao fisiológico, de forma que os compostos em estudo apresentem uma actividade antioxidante semelhante à que apresentam no organismo.

Como já foi referido no Capítulo 1, nos sistemas de fluxo multi-impulsão o volume de amostra, estabelecido pelo número de pulsos de amostra, é sempre um múltiplo do volume de pulso da microbomba. O estudo de optimização do volume de amostra foi efectuado com volumes de 32, 48, 64 e 80 µl, que correspondem a 4, 6, 8 e 10 pulsos de

amostra, respectivamente. Estes volumes de amostra foram avaliados usando diferentes reactores uma vez que este é um dos parâmetros que influencia significativamente a dispersão e homogeneização da zona de reacção. O comprimento do reactor também é importante porque pode determinar, em conjunto com o caudal, se o máximo de emissão de luz ocorre antes, no interior ou após a célula de fluxo do detector. Este parâmetro deve ser optimizado de acordo com a cinética da reacção de modo a assegurar que o máximo de emissão de radiação ocorre quando a zona de reacção se encontra no interior da célula de fluxo, em frente ao fotomultiplicador, assegurando uma completa medida da radiação emitida em consequência da reacção e assim, garantindo maior sensibilidade. Uma vez que a oxidação do luminol e da lucigenina exibem diferentes velocidades de reacção (muito mais elevada para o luminol), foram avaliados reactores mais curtos para o luminol, de 5 a 30 cm, e reactores mais longos para a lucigenina de 10 a 150 cm.

Para o luminol os resultados demonstraram que para reactores inferiores a 10 cm a mistura entre a amostra e o reagente era insuficiente, resultando em fraca repetibilidade dos sinais analíticos enquanto que para reactores de 30 cm o máximo de emissão ocorria antes da zona de reacção atingir o detector. Este facto afectava a sensibilidade da determinação uma vez que diminuía a diferença entre o sinal da amostra e o sinal do branco. Um reactor de 20 cm providenciava um tempo de residência que obviava as dificuldades anteriormente referidas, quer em termos de homogeneização da amostra quer em termos de desenvolvimento da reacção. Para a lucigenina verificou-se que o tempo de residência no percurso analítico e a homogeneização adequados eram obtidos com um reactor de 50 cm, uma vez que este comprimento promovia um grau de dispersão que facilitava o desenvolvimento da reacção sem ocorrer diluição significativa do produto formado.

No que concerne ao volume de amostra, um parâmetro relacionado com as dimensões do reactor, verificou-se que com o luminol ocorria um ligeiro aumento do sinal com o aumento do volume de amostra até 48 µl (6 pulsos) apresentando, para volumes mais elevados, tendência para se manter constante. Este valor correspondia à maior diferença entre a amplitude do sinal da amostra e a amplitude do sinal do branco. Por outro lado, volumes de amostra superiores a 64 µl levavam ao aparecimento de picos duplos como consequência da insuficiente mistura entre a amostra e o reagente e uma homogeneização incompleta da zona central do segmento de amostra. A lucigenina exibia um comportamento similar, todavia, o aumento do sinal analítico era mais pronunciado em relação ao luminol, devendo ser salientado que para valores idênticos de concentração de amostra o sinal analítico obtido com a reacção com o luminol era maior do que o sinal analítico obtido para a lucigenina. Uma diferença importante entre os dois compostos quimiluminogénicos é que os sinais do branco para o luminol quase não eram afectados por variações no volume introduzido, enquanto que para a lucigenina aumentando o comprimento do reactor verificava-se uma maior variação no sinal do branco em função do volume introduzido.

A avaliação do volume de transportador foi efectuada, variando o número de pulsos de transportador entre 40 e 100 pulsos o que corresponde a um volume de 320 e 800 µl respectivamente. Os resultados demonstraram que quer para o luminol, quer para a lucigenina, a utilização de 60 pulsos de transportador, o que corresponde a um volume de cerca de 480 µl, era o suficiente para efectuar o transporte da zona reaccional para detecção e para o retorno do sinal à linha de base.

No sistema de fluxo desenvolvido o caudal era controlado em termos de tempo de pulso que é definido como a soma dos tempos de paragem da microbomba nas posições activada e desactivada. A influência do caudal foi avaliada estabelecendo tempos de

pulso de 1,0 a 0,4 s e de 1,6 a 0,4 s para o luminol e lucigenina, respectivamente, correspondendo a caudais de 0,48 a 1,2 e de 0,3 a 1,2 ml min^{-1} para cada solução. Para o luminol os sinais do branco e da amostra praticamente não eram afectados pelas variações do caudal, o que pode ser explicado pela forte influência do fluxo pulsado no grau de mistura, particularmente durante a fase de inserção da amostra e reagentes no ponto de confluência. Como compromisso entre reprodutibilidade e ritmo de amostragem, foi considerado mais apropriado um tempo de pulso de 0,6 s correspondendo a um caudal de 0,8 ml min^{-1} para cada solução. No que diz respeito à lucigenina, quer o sinal do branco, quer o sinal da amostra sofriam um ligeiro aumento com a diminuição do caudal, provavelmente como consequência do aumento do tempo de reacção. Além disso para caudais mais elevados verificava-se menor reprodutibilidade tendo sido seleccionado para ensaios posteriores, um caudal de 0,6 ml min^{-1} que corresponde a um tempo de pulso de 0,8 s.

Tabela 6.1 – Valores optimizados dos parâmetros analíticos

Parâmetros analíticos	**Luminol**	**Lucigenina**
Concentração do reagente quimiluminogénico	$1,0 \times 10^{-3}$ mol l^{-1}	$3,5 \times 10^{-3}$ mol l^{-1}
Concentração do peróxido de hidrogénio	$1,0 \times 10^{-3}$ mol l^{-1}	2,5 mol l^{-1}
Volume de amostra (número de pulsos)	48 µl (6 pulsos)	48µl (6 pulsos)
Volume de transportador (número de pulsos)	480 µl (60 pulsos)	480 µl (60 pulsos)
Reactor	20 cm	50 cm
Caudal (por solução)	0,8 ml min^{-1}	0,6 ml min^{-1}

A metodologia analítica desenvolvida foi utilizada, nas condições optimizadas e apresentadas na Tabela 6.1, para avaliação do comportamento antioxidante do ácido ascórbico, do trolox e do resveratrol. Usando o luminol como reagente quimiluminogénico obteve-se uma zona de resposta linear até 6,0 x 10^{-4} mol l^{-1}para o trolox, 1,1 x 10^{-3} mol l^{-1} e 2,0 x 10^{-5} mol l^{-1} para o ácido ascórbico e resveratrol, respectivamente. Para a lucigenina obtive-se uma zonas de resposta linear até 1,0 x 10^{-2} mol l^{-1} para o trolox e 4,5 x 10^{-3} mol l^{-1} para o ácido ascórbico. Os valores de percentagem de inibição expressos em mol l^{-1} são apresentados na Tabela 6.2. Usando o luminol como reagente quimiluminogénico, o resveratrol exibiu maior actividade antioxidante, seguido pelo ácido ascórbico e trolox. Para a lucigenina o ácido ascórbico exibiu maior actividade antioxidante do que o trolox. O procedimento envolvendo a lucigenina foi muito menos sensível do que usando luminol, assim eram necessárias concentrações mais elevadas dos antioxidantes testados. Consequentemente, e devido à fraca solubilidade do resveratrol o valor correspondente de IC_{50} obtido com a lucigenina, não foi determinado uma vez que a concentração IC_{50} correspondia a um valor superior à solubilidade do resveratrol.

Tabela 6.2 – Percentagens de inibição dos antioxidantes estudados relativamente ao luminol e lucigenina.

Reagente	Antioxidante	Curva de Inibição	r^2	IC_{50}
Luminol	Trolox	I% = 46,8(±6,9)logC + 203,7(±24,9)	0,998	5,2 x 10^{-4}
	Ácido ascórbico	I% = 18,2(±5,6)logC + 117,2(±19,5)	0,991	2,0 x 10^{-4}
	Resveratrol	I% = 41,4(±12,4)logC + 256,3(±63,8)	0,991	1,0 x 10^{-5}
Lucigenina	Trolox	I% = 79,1(±5,1)logC + 219,5(±11,2)	0,999	7,2 x 10^{-3}
	Ácido ascórbico	I% = 55,3(±5,5)logC + 201,9(±3,7)	0,998	1,7 x 10^{-3}

A metodologia desenvolvida permitia efectuar aproximadamente 90 e 70 determinações por hora para o luminol e lucigenina respectivamente, e o consumo de amostra e reagente foi cerca de: 48 µl de amostra, 85 µg luminol e 87 µg lucigenina e 158 e 446 µg de H_2O_2 (luminol e lucigenina).

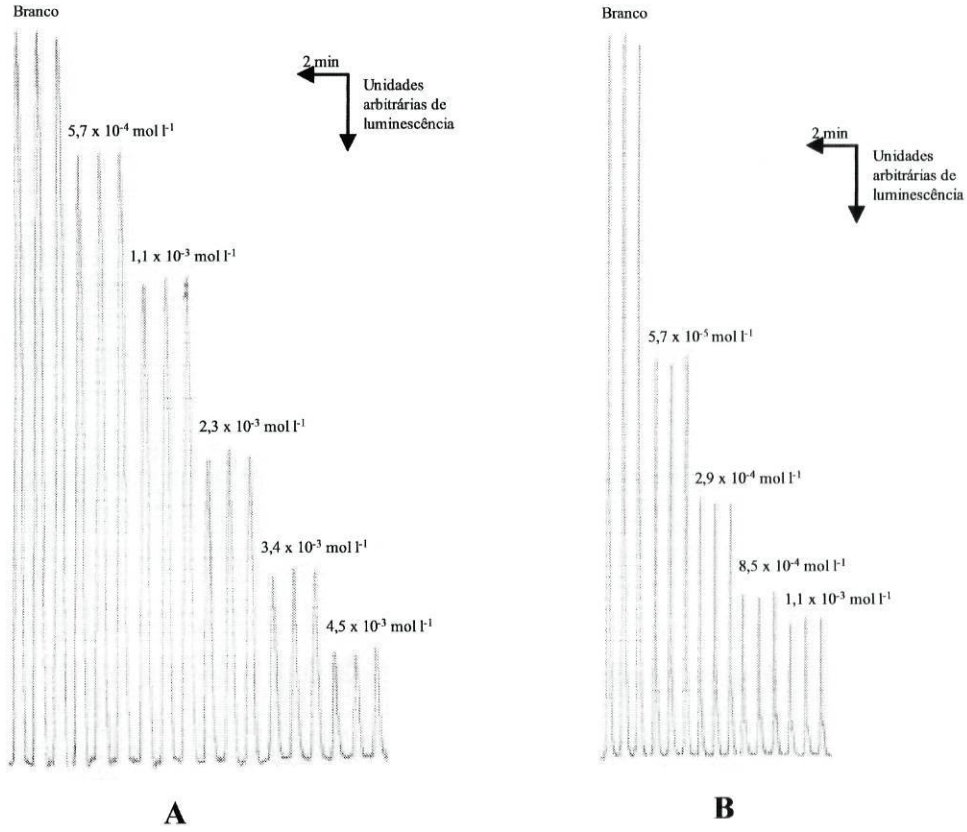


Figura 6.3 – Registo gráfico obtido na elaboração das curvas de calibração de àcido ascórbico com lucigenina (A) e de uma amostra com luminol (B), para determinação do IC_{50}, pela metodologia desenvolvida para avaliação da actividade antioxidante.

6.3.2 Análise de formulações farmacêuticas

A metodologia desenvolvida foi avaliada na determinação da actividade antioxidante de várias formulações farmacêuticas contendo ácido ascórbico e extracto de ginkgo biloba, existentes no mercado português.

As soluções das diferentes amostras foram preparadas, a partir das formulações em estudo, como referido na secção Experimental deste capítulo e posteriormente analisadas no sistema de fluxo multi-impulsão optimizado.

A análise repetida de amostras (n = 10) de diferentes concentrações resultou em desvios padrão relativos inferiores a 2%.

Os resultados das determinações das amostras encontram-se resumidos na Tabela 6.3 e encontram-se expressos em mol l^{-1}, excepto para o extracto de ginkgo biloba (Gincoben) para o qual se encontram expressos em mg l^{-1}. Tanto os resultados obtidos para as amostras como os resultados obtidos para o ácido ascórbico, trolox e resveratrol, demonstram que o procedimento envolvendo o luminol é muito mais sensível do que com a lucigenina.

Tabela 6.3 – Percentagens de inibição das amostras relativamente ao luminol e a lucigenina.

Reagente	**Amostra**	**IC_{50}**
Luminol	Redoxon	$1,6 \times 10^{-4} \pm 2,2 \times 10^{-5}$
	Cecrisina	$1,2 \times 10^{-4} \pm 2,1 \times 10^{-5}$
	Vit C Alter	$2,2 \times 10^{-4} \pm 4,3 \times 10^{-5}$
	Gincoben	$3,7 \times 10^{-3} \pm 8,6 \times 10^{-4}$
Lucigenina	Redoxon	$1,5 \times 10^{-3} \pm 2,0 \times 10^{-4}$
	Cecrisina	$1,3 \times 10^{-3} \pm 1,8 \times 10^{-4}$
	Vit C Alter	$6,8 \times 10^{-4} \pm 5,7 \times 10^{-5}$
	Gincoben	$0,96 \pm 0,04$

6.4 Conclusões

Um procedimento em fluxo, totalmente automatizado foi desenvolvido para a determinação da capacidade antioxidante, permitindo um elevado ritmo de amostragem e características favoráveis de precisão, exactidão e sensibilidade. O procedimento rentabiliza as reacções de quimiluminescência do luminol e lucigenina com o peróxido de hidrogénio. Nas condições optimizadas, a reacção do luminol com o peróxido de hidrogénio é relativamente rápida, levantando algumas dificuldades operacionais, quando se pretende implementar em método discreto como é o caso dos luminómetros de célula única ou equipamentos com microplaca. O sistema desenvolvido permite realizar de forma automática todas as tarefas analíticas, incluindo a adição de reagentes e a medição da amostra, factor fundamental para atingir a precisão e exactidão requeridas. Assim a metodologia proposta está menos sujeita à intervenção do operador e a todos os erros associados a esta intervenção.

Quando comparada com os métodos discretos a metodologia desenvolvida apresenta ainda as vantagens de ser mais rápida, mais barata e mais fácil de operar.

É de salientar, também que o sistema proposto permite uma rápida mistura de amostra e reagente e exibe uma elevada flexibilidade, assegurando uma fácil adaptação do sistema às exigências das diferentes reacções de quimiluminescência sem requerer reconfiguração física do sistema. De facto para realizar o procedimento envolvendo o luminol e o procedimento envolvendo a lucigenina, a única alteração física necessária foi a alteração do reactor.

A metodologia desenvolvida foi aplicada com sucesso à determinação da actividade antioxidante de formulações farmacêuticas, podendo ser ainda aplicada a análises de alimentos e amostras biológicas.

6.5 Referências Bibliográficas

[1] B.N. Ames, M.K. Shigenaga, T.M. Hagen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 7915.

[2] D. Harman, Age 16 (1993) 23.

[3] E. Lissi, M. Salim-Hanna, C. Pascual, M.D. del Castillo, Free Radic. Biol. Med. 18 (1995) 153.

[4] R.L. Prior, G.H. Cao, Free Radic. Biol. Med. 27 (1999) 1173.

[5] C.W. Mulholland, J.J. Strain, Clin. Biochem. 24 (1991) 437.

[6] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Free Radic. Biol. Med. 26 (1999) 1231.

[7] G.H. Cao, H.M. Alessio, R.G. Cutler, Free Radic. Biol. Med. 14 (1993) 303.

[8] G.W. Winston, F. Regoli, A.J. Dugas, Jr., J.H. Fong, K.A. Blanchard, Free Radic. Biol. Med. 24 (1998) 480.

[9] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, Anal. Biochem. 239 (1996) 70.

[10] P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar, Anal. Biochem. 269 (1999) 337.

[11] O. Erel, Clin. Biochem. 37 (2004) 112.

[12] O. Erel, Clin. Biochem. 37 (2004) 277.

[13] A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, A. Ferro-Luzzi, Free Radic. Biol. Med. 18 (1995) 29.

[14] Y.M.A. Naguib, Anal. Biochem. 284 (2000) 93.

[15] M. Paździoch-Czochra, A. Windeńska, Anal. Chim. Acta 452 (2002) 177.

[16] K. Höner, R. Cervallati, Eur. Food Res. Technol. 215 (2002) 437.

[17] W.R. Sousa, C. Rocha, C.L. Cardoso, D.H.S. Silva, M.V.B. Zanoni, J. Food Compos. Anal. 17 (2004) 619.

[18] M.S. Cosio, S. Buratti, S. Mannino, S. Benedetti, Food Chem. 97 (2006) 725.

[19] J.W. Costin, N.W. Barnett, S.W. Lewis, D.J. McGillivery, Anal. Chim. Acta 499 (2003) 47.

[20] T. Triantis, A. Stelakis, D. Dimotikali, K. Papadopoulos, Anal. Chim. Acta 536 (2005) 101.

[21] D. Costa, A. Gomes, S. Reis, J.L.F.C. Lima, E. Fernandes, Life Sci. 76 (2005) 2841.

[22] O. Hirayama, M. Takagi, K. Hukumoto, S. Katoh, Anal. Biochem. 247 (1997) 237.

[23] F. Visioli, C. Galli, Anal. Biochem. 249 (1997) 244.

[24] A. Krasowska, D. Rosiak, K. Szkapiak, M. Lukaszewicz, Curr. Top. Biophys. 24 (2000) 89.

[25] T.P Whitehead, G.H.G. Thorpe, S.R.J. Maxwell, Anal. Chim. Acta 266 (1992) 265.

[26] O. Hirayama, M. Yida, Anal. Biochem. 251 (1997) 297.

[27] S. Girotti, E. Ferri, L. Maccagnani, R. Budini, G. Bianchi, Talanta 56 (2002) 407.

[28] V.M. Di Mambro, A.E.C.S. Azzolini, Y.M.L. Valim, M.J.V. Fonseca, Int. J. Pharm. 262 (2003) 93.

[29] S. Girotti, E.Ferri, F. Fini, L. Bolelli, A.G. Sabatini, R. Budini, D. Sichertova, Talanta 64 (2004) 665.

[30] S. Mannino, O. Brenna, S. Buratti, M.S. Cosio, Electroanalysis 10 (1998) 908.

[31] S. Mannino, S. Buratti, M.S. Cosio, Analyst 124 (1999) 1115.

[32] H. Ukeda, Y. Adachi, M. Sawamura, Talanta 58 (2002) 1279.

[33] B. Tang, L. Zhang, Y. Geng, Talanta 65 (2005) 769.

[34] H.Y. Choi, J.H. Song, D.K. Park, Anal. Biochem. 264 (1998) 291.

[35] N.K. Thanasoulias, A. Vlessidis, N.P. Evmiridis, Anal. Chim. Acta 401 (1999) 197.

[36] H.Y. Choi, E.J. Jhun, B.O. Lim, I.M. Chung, S.H. Kyung, D.K. Park, Phytother. Res. 14 (2000) 250.

[37] M. Sariahmetoglu, R.A. Wheatley, Ý. Çakýcý, Ý. Kanzýk, A. Townshend, Pharmacol. Res. 48 (2003) 361.

[38] M. Sariahmetoglu, R.A. Wheatley, Ý. Çakýcý, Ý. Kanzýk, A. Townshend, Anal. Lett. 36 (2003) 749.

[39] E.P. Labrinea, C.A. Georgiou, Anal. Chim. Acta 526 (2004) 63.

[40] M. Polášek, P. Skála, P. Opletal, L. Jahodář, Anal. Bioanal. Chem. 379 (2004) 754.

[41] P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F.S. Saraiva, S. Reis, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 531 (2005) 25.

[42] L.M. Magalhães, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 558 (2006) 310.

[43] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Anal.Chim. Acta 466 (2002) 125.

CAPÍTULO 7

Determinação de fluoxetina

7. Determinação de fluoxetina

7.1 Introdução

A serotonina tem sido implicada na etiologia de algumas das doenças mentais mais comuns, tais como: depressão, ansiedade, esquizofrenia, desordens alimentares, desordem obsessivo-compulsiva, pânico, etc. De facto, durante os últimos anos, vários antidepressivos foram introduzidos no mercado, entre os quais, os inibidores selectivos da recaptação de serotonina (ISRS). A fluoxetina, ((3RS)-N-metil-3-fenil-3-[4-trifluorometilfenoxi]1-propanamida) (Figura 7.1) é um forte inibidor da recaptação de serotonina potenciando a sua acção no sistema nervoso central (SNC) o que lhe confere actividade antidepressiva [1]. Os inibidores selectivos da recaptação de serotonina, como a fluoxetina, inibem preferencialmente a recaptação de serotonina comparativamente com a recaptação de noradrenalina, e têm acção directa limitada nos receptores de outros neurotransmissores, incluindo os receptores muscarínicos. Assim, apresentam menos efeitos antimuscarínicos e cardiotóxicos do que os antidepressivos tricíclicos, levando a que os inibidores selectivos da recaptação de serotonina sejam frequentemente usados como fármacos de escolha no tratamento de depressões.

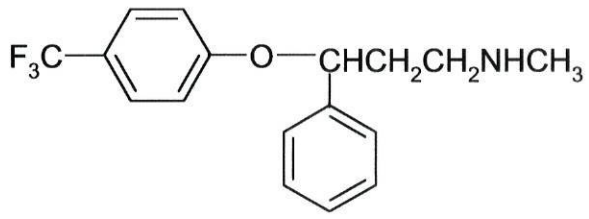


Figura 7.1 – Estrutura da fluoxetina

No entanto a fluoxetina apresenta também alguns efeitos adversos característicos, que incluem problemas gastrointestinais como náuseas e vómitos, ou distúrbios no sono e ansiedade que podem ser mais intensos no início do tratamento. Além disso a fluoxetina pode interagir com outros compostos devido à sua acção inibidora sobre as isoenzimas do citocromo P450 [2].

A enorme popularidade e importância alcançada pela fluoxetina como agente terapêutico no tratamento da depressão, teve como resultado que fosse objecto de numerosos estudos, que conduziram ao desenvolvimento de diversas metodologias analíticas para o seu doseamento, tanto em formulações farmacêuticas como em amostras biológicas.

As técnicas cromatográficas são sem dúvida as mais divulgadas na determinação deste composto, sobretudo no que concerne à cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC), sendo a metodologia recomendada pelas Farmacopeias Portuguesa [3] e dos Estados Unidos [4] para a determinação de fluoxetina. A cromatografia líquida de elevada eficiência, com detecção ultravioleta ou fluorimétrica foi aplicada à determinação de fluoxetina isolada [5-7] e à sua determinação em simultâneo com a norfluoxetina [8-11] que é um metabolito da fluoxetina sendo também um inibidor da recaptação de serotonina. Esta técnica cromatográfica tem sido ainda usada na separação e determinação dos enantiómeros da fluoxetina e da norfluoxetina [12-15]. A detecção por espectrometria de massa com electrospray foi também associada à técnica de HPLC para a determinação simultânea de fluoxetina, citalopram, paroxetina e venlafaxina [16]. Raggi *et al* fazem a comparação entre a determinação de fluoxetina por HPLC com detecção ultravioleta e fluorimétrica e a determinação de fluoxetina por espectrofotometria UV/Vis directa e indirecta em formulações farmacêuticas [17]. Kovacevic *et al* efectuam a comparação entre a utilização de cromatografia líquida com

detecção por fluorescência e cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa [18] para a determinação de fluoxetina e norfluoxetina em plasma. Outra técnica cromatográfica bastante aplicada á determinação de fluoxetina é a cromatografia gasosa com detecção por captura electrónica [19], espectrometria de massa [20-22], detector de azoto e fósforo [23] e por ionização de chama [24,25].

No que concerne às técnicas espectrofotométricas UV/Vis, foram propostas metodologias que envolvem a formação de um complexo amarelo com laranja de metilo em meio ácido e com azul de timol em meio alcalino, com determinação da absorvência do composto formado a 433 e 410 nm, respectivamente [26]. Outra metodologia baseia-se na formação de complexos de fluoxetina com cloranil, DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona) ou iodo com medição da absorvência dos complexos formados a 550, 450 e 263 nm, respectivamente [27]. Foram ainda desenvolvidos métodos espectrofotométricos baseados na reacção com cromoazurol S [28] e com cianina de eriocromo R [29] com avaliação da absorvência dos compostos formados a 500 e 520 nm, respectivamente.

As metodologias analíticas propostas até ao momento para a determinação de fluoxetina incluem ainda o uso da electroforese capilar [30] a qual foi também aplicada na determinação da mistura de fluoxetina com a norfluoxetina [31]. Mandrioli *et al* desenvolveram e compararam dois métodos para a determinação de fluoxetina baseados na técnica de electroforese capilar e em fluorescência [32]. As técnicas fluorimétricas foram ainda usadas para a determinação de fluoxetina por formação de um complexo com a metil-β-ciclodextrina [33]. As técnicas electroquímicas foram pouco aplicadas à determinação de fluoxetina encontrando-se na literatura apenas uma metodologia baseada na voltametria de redissolução adsorptiva [34].

No que diz respeito à determinação de fluoxetina usando metodologias de fluxo, apesar das numerosas metodologias analíticas para a sua determinação, nenhum deles recorre à implementação deste tipo de técnicas.

A oxidação do luminol pelo hipoclorito, tem sido utilizada para a determinação de espécies que não estão directamente envolvidas na reacção de quimiluminescência, mas que podem reagir com o hipoclorito inibindo a emissão de radiação [35-37]. Considerando que o hipoclorito oxida as aminas secundárias convertendo-as em aminas primárias e posteriormente em cloroaminas, facto que é utilizado na derivatização de aminas secundárias para posterior detecção fluorimétrica [38-40], a fluoxetina pode ser oxidada pelo hipoclorito, o que poderá viabilizar a sua determinação por inibição da quimiluminescência emitida pelo sistema luminol-hipoclorito.

As técnicas quimiluminométricas não foram ainda utilizadas na determinação de fluoxetina, assim, neste trabalho é proposta pela primeira vez a determinação quimiluminométrica de fluoxetina baseada na inibição da radiação emitida pelo sistema luminol-hipoclorito, num sistema de fluxo multi-impulsão e a sua aplicação à análise de produtos farmacêuticos.

As vantagens apresentadas pela quimiluminescência são reforçadas pela sua utilização como técnica de detecção em sistemas de fluxo. Neste trabalho será desenvolvido um sistema de fluxo multi-impulsão que se caracteriza pela utilização de microbombas solenóides, que são simultaneamente responsáveis pela introdução de soluções de amostra e reagentes, formação e propulsão da zona de reacção e elementos comutadores, resultando num sistema de fluxo totalmente automatizado, caracterizado pela elevada simplicidade.

7.2 Experimental

7.2.1 Reagentes e soluções

Foi preparada uma solução de luminol 5,0 x 10^{-3} mol l^{-1} dissolvendo 44,3 mg em 50 ml de carbonato de sódio 0,1 mol l^{-1}.

A solução de hipoclorito de sódio 1,4 x 10^{-2} mol l^{-1} foi preparada por diluição de uma solução mais concentrada, após doseamento por iodometria segundo a Farmacopeia Portuguesa VII [3]. As soluções de luminol e hipoclorito de sódio eram mantidas protegidas da luz.

Foi preparada uma solução 500 mg l^{-1} de cloridrato de fluoxetina por dissolução de 25 mg em 50 ml de água desionizada. Diariamente preparavam-se as soluções padrão por diluição rigorosa da solução mais concentrada.

7.2.2 Equipamento

O sistema de fluxo multi-impulsão desenvolvido para a determinação de fluoxetina (Figura 7.2) era constituído por três microbombas solenóides com um volume de pulso de 8µl, as quais foram já caracterizadas no Capítulo 2.

Usou-se ainda uma confluência em perspex, em forma de "Y"e a ligação entre todos os componentes do sistema era efectuada através de tubo de teflon com diâmetro interno de 0,8 mm.

A determinação de fluoxetina nas formulações farmacêuticas pelo procedimento de referência recomendado pela Farmacopeia dos Estados Unidos USP 24 [4] foi efectuada num cromatógrafo da marca Merck Hitachi modelo Lachrom, equipado com um detector L-7455, já referido no Capítulo 2.

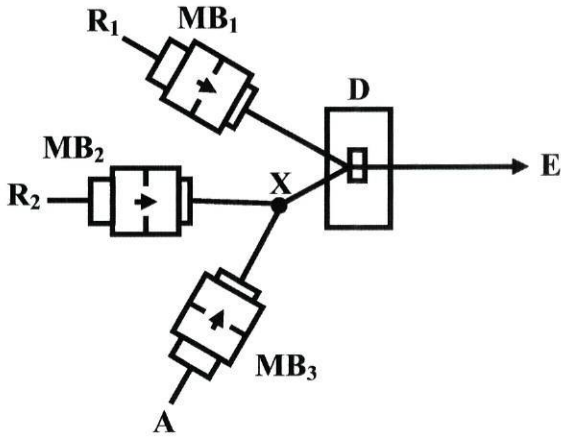


Figura 7.2 – Esquema da montagem de fluxo multi-impulsão usado na determinação de fluoxetina em formulações farmacêuticas: MB_1, MB_2 e MB_3 – microbombas solenóides; D – detector; E – esgoto; X – confluência; A – amostra; R_1 – solução de luminol; R_2 – solução de hipoclorito de sódio.

7.2.3 Montagem de fluxo

A montagem de fluxo multi-impulsão para a determinação quimiluminométrica de fluoxetina (Figura 7.2) era constituída por três microbombas solenóides (MB_1,MB_2 e MB_3) que eram responsáveis pela inserção individual das soluções. MB_1 era responsável pela inserção da solução de luminol, MB_2 e MB_3 eram responsáveis pela inserção da solução de hipoclorito e amostra, respectivamente. As microbombas actuavam simultaneamente como dispositivos propulsores e comutadores, controlando os volumes de amostra e reagentes, caudais, tempo e a sequência de inserção e

transporte para a detecção. A ligação entre todos os componentes da montagem tinha apenas o comprimento mínimo necessário.

O ciclo analítico (Figura 7.3) iniciava-se com a activação de MB_1, a uma frequência de pulso pré-definida, propulsionando o luminol para o detector, estabelecendo-se a linha de base. Para inserção da amostra as microbombas MB_2 e MB_3 eram activadas simultaneamente, a uma determinada frequência de pulso que em conjunto com o volume de pulso, estabelecia o volume de amostra. Deste modo as soluções de hipoclorito e de fluoxetina convergiam no ponto de confluência X misturando-se rapidamente por acção dos pulsos resultantes da actuação das microbombas. Durante a inserção da amostra e da solução de hipoclorito a microbomba MB_1 continuava em funcionamento, mas alternada com a actuação de MB_2 e MB_3, implementando-se a estratégia de amostragem binária. Assim, um número definido de pequenas alíquotas da mistura fluoxetina-hipoclorito era intercalado com pequenas alíquotas de luminol à entrada da célula de fluxo, sofrendo uma rápida homogeneização, originando o sinal analítico. Posteriormente MB_2 e MB_3 eram desactivadas enquanto a MB_1 continuava em funcionamento para limpeza.

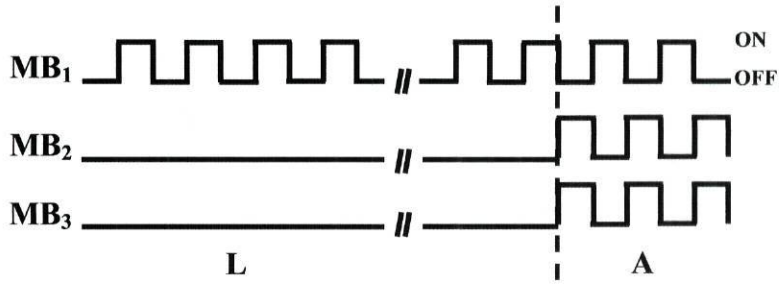


Figura 7.3 – Representação esquemática da posição das microbombas durante o ciclo analítico. MB_1, MB_2 e MB_3 – microbombas solenóides; ON – microbomba activada; OFF – microbomba desactivada; L – definição da linha de base (40 pulsos); A – fase de inserção da amostra (3 pulsos).

7.2.4 Método de referência

A exactidão da metodologia desenvolvida e a sua aplicabilidade à determinação de cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas foi avaliada analisando as amostras por cromatografia líquida de elevada eficiência de acordo com a metodologia de referência preconizada pela Farmacopeia do Estados Unidos [4] e pelo procedimento automático proposto neste Capítulo.

A preparação das soluções de amostra foi efectuada por pesagem e pulverização em almofariz de porcelana do conteúdo de 20 cápsulas de cada uma das formulações analisadas. Calculava-se a quantidade correspondente ao peso médio de uma unidade de cada formulação e dissolvia-se uma quantidade de amostra equivalente a 10 mg de fluoxetina numa mistura de metanol, trietilamina e tetrahidrofurano (1:3:6), que foi também usada como eluente. A solução obtida era filtrada e analisada por HPLC. O

sistema cromatográfico incorporava uma coluna C_{18} e usava como eluente a mistura referida anteriormente. A detecção da fluoxetina era efectuada por determinação da absorvência a 227 nm.

No caso da solução oral, a solução de amostra era preparada por diluição do volume referente a 10 mg de fluoxetina numa mistura de metanol, trietilamina e tetrahidrofurano (1:3:6), seguindo-se o mesmo procedimento realizado para as formulações sólidas.

As soluções em água desionizada, de amostra para análise pela metodologia desenvolvida, eram preparadas por pesagem e dissolução da quantidade de formulação pulverizada correspondente a 5 mg de cloridrato de fluoxetina, obtida como já foi descrito anteriormente para os procedimentos de referência. A solução oral era preparada por diluição em água desionizada do volume de amostra correspondente a 1 mg de cloridrato de fluoxetina.

7.3 Resultados e discussão

Tal como se referiu anteriormente, a metodologia desenvolvida foi baseada no efeito inibidor da fluoxetina na reacção de quimiluminescência entre o luminol e o hipoclorito por consumo do hipoclorito, levando a uma diminuição da intensidade de radiação emitida. Assim a avaliação do efeito inibidor (ΔI), o qual é linearmente proporcional à concentração de fluoxetina, foi efectuado através da diferença entre a intensidade de radiação emitida na ausência de fluoxetina (I_B) e a intensidade de radiação emitida pela amostra (I_A), $\Delta I = I_B - I_A$. A emissão de radiação é afectada por vários parâmetros químicos e instrumentais, tendo a optimização do sistema sido efectuada de forma a obter o efeito inibidor mais elevado.

7.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos

Um dos parâmetros da montagem analítica que mais influenciam o efeito inibidor é a sequência de adição dos reagentes. Esta situação justifica-se pelo facto do efeito inibidor na radiação emitida ser devido ao consumo do hipoclorito pela fluoxetina, deixando menos hipoclorito disponível para reagir com o luminol. Assim, efectuando em primeiro lugar a mistura das soluções de amostra e hipoclorito, as quais são inseridas no sistema de fluxo em simultâneo, sendo a solução resultante posteriormente misturada com a solução de luminol, promove-se o desenvolvimento da reacção responsável pelo efeito inibidor. A versatilidade da manipulação da amostra que caracteriza os sistemas de fluxo multi-impulsão permite estabelecer diferentes estratégias de mistura da amostra com os reagentes (volume único, confluência de zonas e amostragem binária). Assim, foram realizados ensaios para avaliar o efeito das diversas estratégias de mistura de soluções quer na mistura da fluoxetina com a solução

de hipoclorito, quer na mistura da solução resultante (fluoxetina-hipoclorito) com a solução de luminol. Os melhores resultados foram obtidos quando as soluções de hipoclorito e de fluoxetina eram misturadas por confluência de zonas. De facto, a natureza pulsante do fluxo criado pela actuação das microbombas solenóides é suficiente para uma rápida homogeneização das soluções no ponto de confluência. No que concerne à mistura da solução proveniente da confluência X e a solução de luminol à entrada da célula onde ocorre a emissão de radiação, observou-se que o efeito inibidor era ligeiramente superior quando as soluções eram misturadas segundo a estratégia de amostragem binária em comparação com o efeito inibidor obtido com a sua mistura em confluência de zonas. A combinação da amostragem binária com o fluxo pulsado criado pelas microbombas promove uma homogeneização rápida e eficiente, que neste caso, em que a mistura ocorre à entrada da célula, já muito próximo do fotomultiplicador, resulta numa ligeira melhoria relativamente à estratégia de confluência de zonas.

O tempo de reacção entre o hipoclorito e a fluoxetina é um parâmetro importante na obtenção de um elevado efeito inibidor. Uma das estratégias para aumentar o tempo de reacção é a incorporação de um reactor entre o ponto de confluência X e o luminómetro onde a solução resultante da mistura da fluoxetina com o hipoclorito se vai misturar com a solução de luminol. Foi avaliada a influência de um reactor e do seu comprimento na intensidade de radiação emitida e no efeito inibidor, variando a ligação entre a confluência e o luminómetro com reactores de 3 até 73 cm. Verificou-se que o efeito inibidor era maior quando se utilizava o reactor de 3 cm, que era o comprimento mínimo que permitia fisicamente fazer a ligação da confluência ao luminómetro. Este resultado demonstra que rapidamente se obtém uma mistura eficiente entre a fluoxetina e o hipoclorito, em consequência da natureza pulsante do fluxo que promove uma extensa mistura no ponto onde a confluência de fluidos ocorre, reduzindo o uso de

reactores ao mínimo necessário. Aumentando o comprimento do reactor observava-se uma diminuição da amplitude do sinal analítico e do efeito inibidor o que pode ser explicado pelo ao aumento da dispersão do segmento de amostra.

Posteriormente avaliou-se a influência do tempo de reacção entre o luminol e o hipoclorito restante da reacção com a fluoxetina, aumentando a distância entre o ponto onde ocorria a mistura e o fotomultiplicador em frente ao qual se encontra a célula de fluxo. Para tal, realizaram-se ensaios em que a mistura do luminol com a solução resultante da mistura da fluoxetina com o hipoclorito ocorria em três pontos diferentes: à entrada da célula de fluxo, à entrada do luminómetro incorporando mais uma confluência no sistema e com um reactor de 20 cm entre a confluência e o luminómetro. Observou-se que os sinais analíticos de maior amplitude eram obtidos quando a mistura do luminol com a solução resultante da mistura da fluoxetina com o hipoclorito ocorria à entrada da célula de fluxo.

Quando se compara a mistura à entrada da célula de fluxo com a mistura na confluência à entrada do luminómetro verifica-se, neste último caso, uma diminuição drástica da amplitude dos sinais analíticos. Este resultado está de acordo com o esperado, uma vez que a reacção de quimiluminescência entre o luminol e o hipoclorito é uma reacção rápida e cujo desenvolvimento se encontra favorecido pela natureza pulsante do fluxo resultante da actuação das microbombas. Este facto leva a que quando a mistura é efectuada à entrada do luminómetro, a emissão do máximo de intensidade de radiação possa ocorrer antes da zona reaccional chegar ao fotomultiplicador, originando um sinal analítico de baixa amplitude, sendo também menos notório o efeito inibidor da fluoxetina. Enquanto que quando a mistura é realizada à entrada da célula de fluxo, a emissão do máximo de radiação ocorre em frente ao fotomultiplicador obtendo-se um

sinal analítico de maior amplitude e uma maior sensibilidade ao efeito inibidor da fluoxetina.

Outra variável importante, em termos de intensidade do sinal analítico, é o volume de amostra inserido no sistema de fluxo. Como já foi referido no Capítulo 1, uma das características da multi-impulsão é a inserção da amostra com base numa contagem do número de pulsos, sendo o volume de amostra inserido, múltiplo do volume de pulso das microbombas, 8 x n pulsos no caso das bombas utilizadas neste trabalho. A avaliação da influência do volume de amostra na determinação foi efectuada avaliando a amplitude do sinal analítico para volumes no intervalo de 8 a 48 µl que corresponde a um número de pulsos de amostra de 1 a 6. Como se pode ver na Figura 7.4 para a solução sem fluoxetina (branco) a intensidade de radiação aumentava até 3 pulsos de amostra enquanto que para a solução padrão de fluoxetina a intensidade de radiação emitida aumentava até 2 pulsos de amostra, e que para valores superiores decrescia ligeiramente tendendo para a estabilização. Assim verificou-se um maior efeito inibidor para um volume de 24µl, ou seja 3 pulsos de amostra o qual foi fixado para prosseguir a optimização da montagem. Como já foi referido anteriormente a amostra era inserida (via MB_3) em simultâneo com a solução de hipoclorito (via MB_2) sendo o volume de solução de hipoclorito semelhante ao volume de amostra inserido, ou seja eram inseridos no sistema de fluxo 24 µl de solução de hipoclorito (3 pulsos).

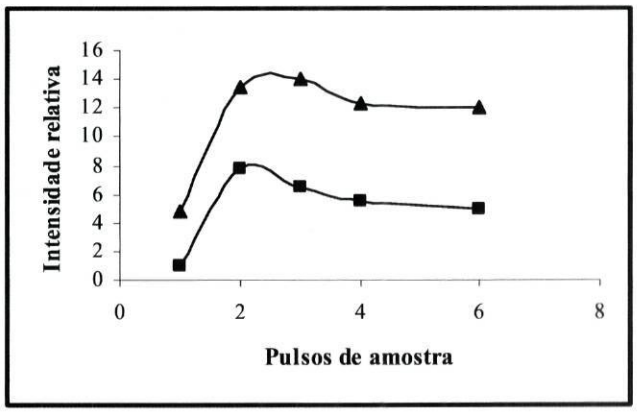


Figura 7.4 – Influência do volume de amostra na intensidade de radiação emitida. Os resultados referem-se à análise do branco (▲) e de um padrão de fluoxetina de concentração 5 mg l^{-1}(■).

A avaliação da influência do volume de luminol durante a fase de retorno à linha de base foi realizada variando o volume de 160 a 640 µl correspondendo a um número de pulsos de 20 a 80. Verificou-se que o volume de luminol não afecta significativamente o efeito inibidor, e que a utilização de 40 pulsos de luminol o que corresponde a um volume de cerca de 320 µl, era suficiente para o retorno do sinal analítico à linha de base.

Nas reacções de quimiluminescência desenvolvidas em sistemas de fluxo, o caudal é um parâmetro crítico, uma vez que afecta não só o tempo de reacção mas também o tempo de residência da zona de reacção na célula de fluxo. No sistema de fluxo desenvolvido o caudal era controlado em termos de tempo de pulso que é definido como a soma dos tempos de paragem da microbomba nas posições activada e desactivada. Nestes ensaios foram testados tempos de pulso entre 0,4 e 1,6 s, que correspondem a frequências de

actuação entre 150 e 38 pulsos min^{-1} e a caudais de 1,2 a 0,3 ml min^{-1} para cada solução. Para a fase de inserção de amostra e de solução de hipoclorito, o maior efeito inibidor foi obtido para um tempo de pulso de 0,6 s, que corresponde a uma frequência de pulso de 100 min^{-1} e a um caudal de 0,8 ml min^{-1} para cada solução. Durante a fase de retorno à linha de base o caudal foi avaliado variando a frequência de pulso também entre 38 e 150 pulsos min^{-1} e o maior efeito inibidor foi obtido para um tempo de pulso de 0,8 s que corresponde a uma frequência de 75 pulsos min^{-1} e a um caudal de 0,6 ml min^{-1} para a solução de luminol.

A intensidade da quimiluminescência emitida é marcadamente influenciada pela concentração de luminol e hipoclorito, afectando também o efeito inibidor que é a base da metodologia desenvolvida. O efeito da concentração de luminol na intensidade de quimiluminescência foi estudado para o intervalo de concentrações de 5,0 x 10^{-6} a 2,5 x 10^{-5} mol l^{-1}. Verificou-se um maior efeito inibidor para a concentração de 1,0 x 10^{-5} mol l^{-1} a qual foi escolhida para os ensaios posteriores. Além disso a concentração de 2,5 x 10^{-5} mol l^{-1} causava saturação do detector impossibilitando a avaliação da s variações de emissão de luz.

O efeito da concentração de hipoclorito foi avaliado para um intervalo de concentrações entre 1,1 x 10^{-5} e 7,1 x 10^{-5} mol l^{-1} e o maior efeito inibidor foi obtido para a concentração 2,8 x 10^{-5} mol l^{-1} verificando-se que para a concentração 7,1 x 10^{-5} mol l^{-5} ocorria, tal como para a concentração mais elevada de luminol, a saturação do detector não sendo possível avaliar a amplitude do sinal analítico.

Outro parâmetro com influência directa na intensidade de radiação emitida é o pH. A influência do pH em termos de desenvolvimento da reacção foi avaliada por inserção de várias soluções de luminol com uma concentração de 1,0 x 10^{-5} mol l^{-1}, as quais foram preparadas em soluções de carbonato de sódio com valores de pH entre 9,5 e 12

unidades. Como se pode observar na Figura 7.5 a maior intensidade de radiação emitida e o maior efeito inibidor ocorrem a pH 10,5.

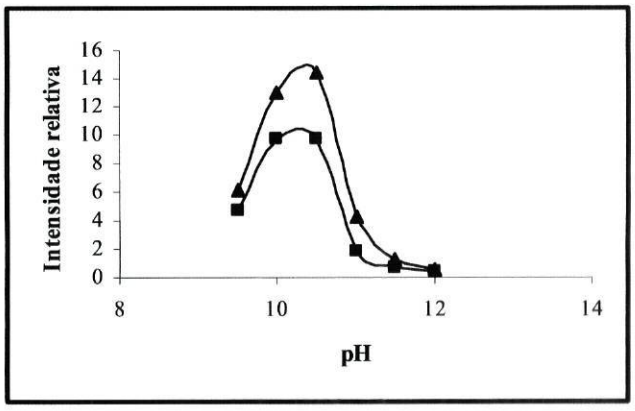


Figura 7.5 – Influência do pH nos sinais analíticos. Os resultados referem-se à análise do branco (▲) e de um padrão de fluoxetina de concentração 5 mg l^{-1} (■).

Após optimização e usando as condições experimentais definidas anteriormente e apresentadas na Tabela 7.1 para o estabelecimento da curva de calibração, obteve-se uma zona de resposta linear até 10 mg l^{-1} de cloridrato de fluoxetina.

A curva de calibração obtida é representada pela equação $\Delta I = 1{,}38(\pm 0{,}04)C - 0{,}17(\pm 0{,}19)$ onde ΔI se refere à diferença entre a intensidade de radiação emitida na ausência de fluoxetina e a intensidade de radiação emitida pela amostra e C à concentração de cloridrato de fluoxetina expressa em mg l^{-1} com um coeficiente de correlação de 0,9995.

O limite de detecção, calculado como já foi exposto no Capítulo 2, era 0,31 mg l^{-1} e a metodologia permitia efectuar cerca de 136 determinações por hora.

Tabela 7.1 – Valores optimizados dos parâmetros analíticos.

Parâmetros analíticos	
Concentração de luminol	$1,0 \times 10^{-5}$ mol l^{-1}
Concentração de hipoclorito de sódio	$2,8 \times 10^{-5}$ mol l^{-1}
pH (luminol)	10,5 unidades
Volume de amostra (número de pulsos)	24 µl (3 pulsos)
Volume de luminol (número de pulsos)	320 µl (40 pulsos)
Caudal da fase de inserção de amostra	0,8 ml min^{-1} (por solução)
Caudal da fase de retorno à linha de base	0,6 ml min^{-1}

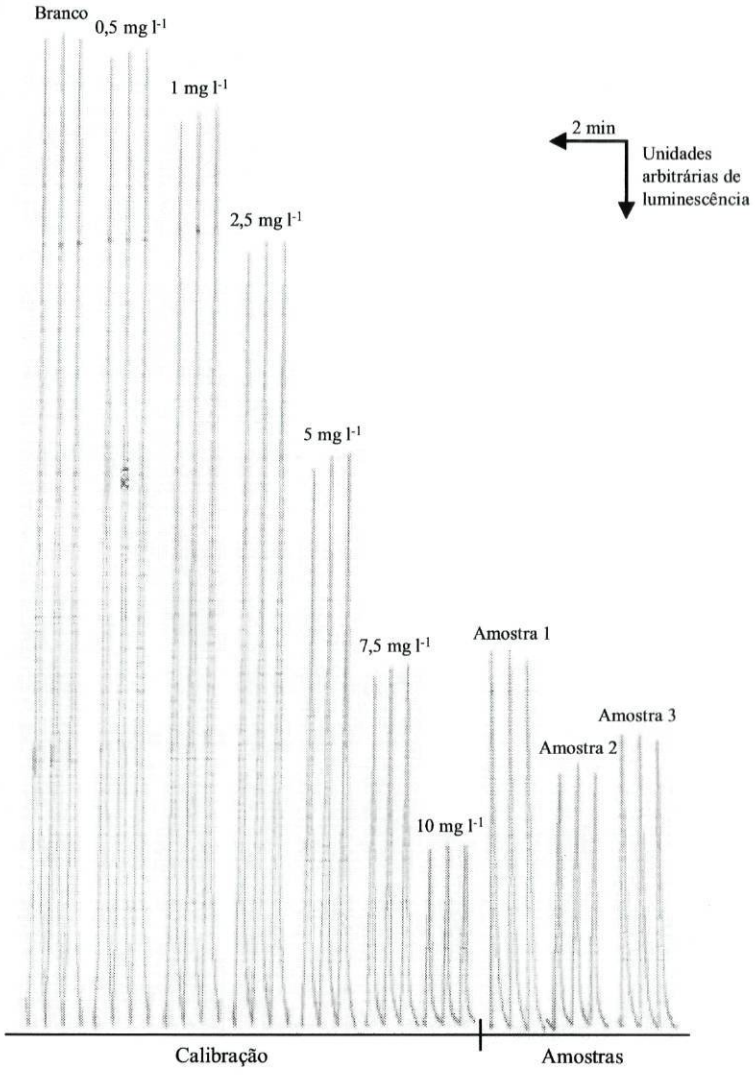


Figura 7.6 – Registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração referente ao efeito inibidor da fluoxetina e análise das amostras de formulações farmacêuticas.

7.3.2 Avaliação de interferentes

Considerando que a metodologia desenvolvida iria ser aplicada à análise de formulações farmacêuticas existentes no mercado português, contendo fluoxetina foi avaliado o efeito sobre os sinais analíticos de vários compostos utilizados como excipientes. Este estudo foi efectuado, analisando soluções contendo cloridrato de fluoxetina numa

concentração fixa de 1,45 x 10^{-5} mol l^{-1} e concentrações crescentes de cada um dos excipientes. Foi estabelecido o critério de que um composto era considerado interferente se a variação do sinal analítico para a concentração fixada de analito, relativamente ao obtido na sua ausência, fosse superior a 3%. Os resultados obtidos demonstraram que nas condições optimizadas a lactose, sacarose, galactose, glucose, sorbitol e ácido benzóico não interferiam para uma razão molar até 100 (excipiente:fluoxetina), o glicerol não interferia para uma razão molar até 50 (excipiente:fluoxetina) enquanto o estearato de magnésio não interferia para uma razão molar até 10 (excipiente:fluoxetina). Uma vez que a massa média dos comprimidos é cerca de 10 vezes a massa de fluoxetina presente, nenhum dos excipientes está presente numa concentração capaz de causar interferência.

7.3.3 Análise de formulações farmacêuticas

Com vista à avaliação do desempenho da metodologia desenvolvida, o sistema de fluxo multi-impulsão descrito, foi aplicado na análise de formulações farmacêuticas contendo fluoxetina disponíveis no mercado português.

As soluções das diferentes amostras foram preparadas, a partir das formulações em estudo, como referido na secção Experimental deste Capítulo e posteriormente analisadas no sistema de fluxo multi-impulsão optimizado.

Os resultados obtidos encontram-se esquematizados na Tabela 7.2 e apresentam desvios relativos da metodologia desenvolvida em relação à metodologia de referência, inferiores a 2,5%.

A realização do teste t de Student, para um nível de confiança de 95%, confirmou a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos ($t_{calculado} = 0,629$, $t_{tabelado} = 2,447$).

A análise repetida (n = 10) de solução de amostra de fluoxetina de concentração 5 mg l^{-1} pela metodologia desenvolvida, originou desvios padrão relativos inferiores a 2 % revelando uma boa repetibilidade.

Tabela 7.2 – Resultados da análise de formulações farmacêuticas contendo fluoxetina.

Formulação farmacêutica	**Concentração declarada (mg/formulação)**	**Concentração encontrada (mg/formulação)**		**Desvio relativo***
		Método de referência	**Metodologia desenvolvida**	**(%)**
Prozac (cápsulas)	20	19,75 ± 0,30	19,73 ± 0,46	-0,10%
Digassim (cápsulas)	20	19,08 ± 0,04	19,53 ± 0,60	2,36%
Nodepe (cápsulas)	20	19,30 ± 0,08	19,11 ± 0,67	-0,98%
Nodepe (solução oral)	20	19,31 ± 0,21	19,21 ± 0,72	-0,52%
Fluoxetina Alter (cápsulas)	20	17,64 ± 0,19	17,40 ± 0,64	-1,36%
Fluoxetina Labesfal (cápsulas)	20	18,61 ± 0,05	19,07 ± 0,47	2,48%
Fluoxetina Farmoz (cápsulas)	20	19,10 ± 0,03	19,22 ± 0,44	0,63%

* Desvio relativo expresso em percentagem, da metodologia desenvolvida relativamente à metodologia de referência.

7.4 Conclusões

A metodologia desenvolvida revelou ser possível determinar a fluoxetina por quimiluminescência através do seu efeito inibidor na emissão de radiação resultante da reacção do luminol com o hipoclorito. Além disso, veio confirmar as vantagens de associar uma metodologia sensível e simples como a quimiluminescência a uma das mais recentes técnicas de fluxo – a multi-impulsão. Efectivamente, esta associação contribuiu para a implementação de uma metodologia analítica precisa, reprodutível, simples e versátil, com elevado nível de automação.

A presença das microbombas originava um fluxo pulsado que revelou favorecer a mistura de amostra e reagentes no interior do sistema. De facto os resultados permitiram observar uma elevada eficiência na mistura que possibilitou por exemplo, a redução dos reactores ao mínimo necessário para efectuar a ligação entre os diferentes componentes, o que resulta numa redução da dispersão e aumenta a sensibilidade da determinação.

A metodologia proposta revelou ser uma alternativa credível e vantajosa para a determinação de fluoxetina em formulações farmacêuticas, especialmente se tivermos em consideração que as metodologias normalmente propostas e recomendadas pelas diferentes Farmacopeias são caracterizadas por serem lentas, laboriosas, e requerem a utilização de inúmeros reagentes com elevada toxicidade, nomeadamente o metanol.

Efectivamente, a metodologia desenvolvida mostrou ser mais rápida, apresentando um elevado ritmo de amostragem, cerca de 136 determinações por hora, mais económica, o equipamento utilizado é simples e de baixo custo. Além disso, é uma metodologia direccionada para o conceito de química verde, pois apresenta um consumo mínimo de reagentes e produção reduzida de efluentes, concretamente por cada determinação eram gastos cerca de 0,6 μg de luminol, 55 ng de hipoclorito de sódio e gerava-se cerca de 0,4 ml de efluente.

7.5 Referências Bibliográficas

[1] Martindale, The Complete Drug Reference, 33rd ed., Pharmaceutical Press, 2002, p.284.

[2] B.G. Katzung, Basic & Clinical Pharmacology, 7th ed., Appleton & Lance, 1998, p.493.

[3] Farmacopeia Portuguesa VII, vol. I, Lisboa, 2002, p. 417, 1182.

[4] 24th United States Pharmacopoeia and 19th National Formulary, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, 1999, p. 739.

[5] M.T. Maya, C.R. Domingos, M.T. Guerreiro, J.A. Morais, J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 989.

[6] M.A. El-dawy, M.M. Mabrouk, F A. El-Barbary, J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002) 561.

[7] A. Ramaiya, C. March, H.T. Karnes, J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) 729.

[8] A. Llerena, P. Dorado, R. Berecz, A. González, M. J. Norberto, A. Rubia, M. Cáceres, J. Chromatogr. B 783 (2003) 25.

[9] K.M. Li, M.R. Thompson, I.S. McGregor, J. Chromatogr. B 804 (2004) 319.

[10] C. Sabbioni, F. Bugamelli, G. Varani, L. Mercolini, A. Musenga, M.A. Saracino, S. Fanali, M.A. Raggi, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 351.

[11] R.F. Suckow, M.F. Zhang, T.B. Cooper, Clin. Chem. 38 (1992) 1758.

[12] M.A. Raggi, R. Mandrioli, G. Casamenti, F. Bugamelli, V. Volterra, J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1998) 193.

[13] B.A. Olsen, D.D. Wirth, J.S. Larew, J. Pharm. Biomed. Anal. 17 (1998) 623.

[14] X. Guo, T. Fukushima, F. Li, K. Imai, Analyst 127 (2002) 480.

[15] G. Gatti, I. Bonomi, R. Marchiselli, C. Fattore, E. Spina, G. Scordo, R. Pacifici, E. Perucca, J. Chromatogr. B 784 (2003) 375.

[16] H. Juan, Z. Zhiling, L. Huande, J. Chromatogr. B 820 (2005) 33.

[17] M.A. Raggi, F. Bugamelli, G. Casamenti, R. Mandrioli, D. De Ronchi, V. Volterra, J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1998) 699.

[18] I. Kovacevic, M. Pokrajac, B. Miljkovic, D. Jovanovic, M. Prostran, J. Chromatogr. B 830 (2006) 372.

[19] J.F. Nash, R.J. Bopp, R.H.Carmichael, K.Z. Farid, L. Lemberger, Clin. Chem. 28 (1982) 2100.

[20] C.B. Eap, N. Gaillard, K. Powell, P. Baumann, J. Chromatogr. B 682 (1996) 265.

[21] R.S. Addison, M.E. Franklin, W.D. Hooper, J. Chromatogr. B 716 (1998) 153.

[22] J.P. Lamas, C. Salgado-Petinal, C. Garcia-Jares, M. Llompart, R. Cela, M. Gómez, J. Chromatogr. A 1046 (2004) 241.

[23] P. Fontanille, N. Jourdil, C. Villier, G. Bessard, J. Chromatogr. B 692 (1997) 337.

[24] J.J. Berzas, C. Guiberteau, M.J. Villaseñor, V. Rodriguez, Anal. Chim. Acta 519 (2004) 219.

[25] J.J.B. Nevado, M.J.V. Llerena, A.M.C. Salcedo, E.A. Nuevo, J. Pharm. Biomed. Anal. 38 (2005) 52.

[26] A.H. Prabhakar, V.B.Patel, R. Giridhar, J. Pharm. Biom. Anal. 20 (1999) 427.

[27] L.I. Bebawy, N. El-Kousy, J.K. Suddik, M. Shokry, J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (1999) 133.

[28] B. Starczewska, K. Mielech, J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 243.

[29] B. Starczewska, H. Puzanowska-Tarasiewicz, K. Baranowska, J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 477.

[30] J.J.B. Nevado, A.M.C. Salcedo, M.J.V. Llerena, E.A. Nuevo, Anal. Chim. Acta 417 (2000) 169.

[31] J.R. Flores, J.J.B. Nevado, G.C. Peñalvo, N.M. Diez, Talanta 65 (2005) 163.

[32] R. Mandrioli, V. Pucci, D. Visini, G. Varani, M.A. Raggi, J. Pharm. Biomed. Anal. 29 (2002) 1127.

[33] J.J. Berzas, A. Alañon, J.A. Lázaro, Talanta 58 (2002) 301.

[34] A.M.S. Roque da Silva, J.C. Lima, M.T.O. Teles, A.M.O. Brett, Talanta 49 (1999) 611.

[35] C. Zhang, J. Huang, Z. Zhang, M. Aizawa, Anal. Chim. Acta 374 (1998) 105.

[36] W. Qin, Z. Zhang, B. Li, Y. Peng, Talanta 48 (1999) 225.

[37] J. Li, P.K. Dasgupta, Anal. Chim. Acta 398 (1999) 33.

[38] A. Himuro, H. Nakamura, Z. Tamura, Anal. Chim. Acta 147 (1983) 317.

[39] C. López-Erroz, P. Viñas, N. Campillo, M. Hernandez-Córdoba. Analyst 121 (1996) 1043.

[40] C. Vannecke, E. V. Gyseghem, M.S. Bloomfield, T. Coomber, Y. V. Heyden, D.L. Massart, Anal. Chim. Acta 446 (2001) 413.

CAPÍTULO 8

Determinação de carvedilol

8. Determinação de carvedilol

8.1 Introdução

O carvedilol ((±)-1-(4-oxicarbazol)-3-[2-(2-metoxifenoxi)etilamino]-propano-2-ol) (Figura 8.1), é um bloqueador-β não-cardioselectivo que tem sido utilizado no tratamento de hipertensão e angina pectoris, sendo frequentemente associado a outros fármacos [1]. O carvedilol apresenta também actividade bloqueadora-α_1, o que lhe confere propriedades vasoldilatadoras e adicionalmente quando administrado em concentrações elevadas pode apresentar actividade bloqueadora do canal de cálcio. O carvedilol é administrado como mistura racémica dos enantiómeros S (-) e R (+), os quais exibem efeitos farmacológicos diferentes. A actividade β-bloqueadora reside principalmente no enantiómero S e ambos os enantiómeros apresentam actividade α-bloqueadora semelhante.

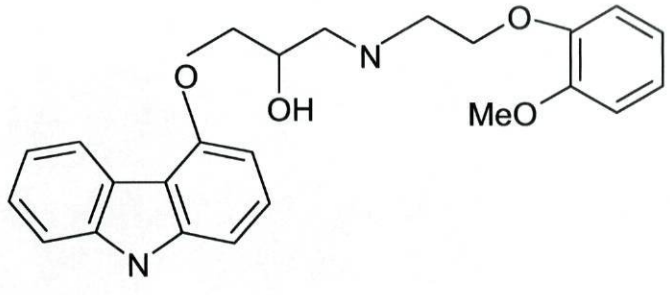


Figura 8.1 – Estrutura do carvedilol

Ultimamente o carvedilol tem sido reconhecido como agente efectivo para o tratamento de insuficiência cardíaca. Devido à sua actividade antioxidante [2], o carvedilol é eficaz na supressão da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas ou na inibição da geração de espécies reactivas de oxigénio [3]. Reduzindo o nível de stress oxidativo no miocárdio o carvedilol tem um efeito protector sobre o coração que é benéfico para pacientes com insuficiência cardíaca.

Por vezes o carvedilol é usado por atletas para aumentar o desempenho físico, uma vez que os bloqueadores-β ajudam a controlar a ansiedade e o tremor, baixam o ritmo cardíaco e reduzem a pressão sanguínea. Deste modo o carvedilol foi classificado como substância proibida pela Agência Mundial Antidoping e pelo Comité Olímpico Internacional [4].

Uma vez que o seu uso com fins terapêuticos é relativamente recente, são escassas as metodologias disponíveis para a determinação de carvedilol. Neste contexto, uma das técnicas mais utilizadas para a sua determinação é a cromatografia líquida de elevada eficiência com detecção por fluorescência [5-8], amperometria [9], espectrometria de massa [10] e espectrofotometria de UV/Vis [11], a qual foi aplicada à análise de amostras biológicas como plasma e tecido cardíaco [12], e mais recentemente à análise de formulações farmacêuticas [11].

Deve também ser destacada a utilização da electroforese capilar para a determinação de carvedilol em amostras de plasma e soro, com detecção fluorimétrica [13] e espectrofotométrica UV/Vis [14]. Os enantiómeros do carvedilol apresentam diferentes efeitos farmacológicos pelo que em algumas situações a sua determinação é recomendável, assim, alguns dos métodos referidos anteriormente, descrevem a separação enantiomérica do carvedilol [5,10,13,14]. Clohs *et al* fazem a comparação

entre a cromatografia líquida de elevada eficiência e a electroforese capilar para a análise enantiomérica do carvedilol em soro [15].

Outras técnicas cromatográficas foram aplicadas à análise de carvedilol tais como a cromatografia líquida [16] e a cromatografia gasosa [17], ambas associadas à espectrometria de massa e usadas na análise de amostras de urina.

A fluorimetria foi também aplicada à determinação simultânea de carvedilol e ampicilina [18] e à determinação simultânea de carvedilol e dopamina [19] em amostras de soro e urina. Para a análise de formulações farmacêuticas, foram propostos dois métodos fluorimétricos para a determinação de carvedilol [20,21].

Recentemente, foi desenvolvido, um procedimento envolvendo voltametria diferencial de pulsos usando um eléctrodo de carbono vítreo para a análise de carvedilol em comprimidos [22]. No que diz respeito aos métodos electroquímicos foi também proposto um método por voltametria de redissolução adsorptiva que foi aplicado à análise de carvedilol em comprimidos e em soro [23]. A determinação de carvedilol em formulações farmacêuticas foi ainda realizada por espectrofotometria de UV/Vis e titulação com ácido perclórico em meio não aquoso [24].

A maioria das metodologias referidas anteriormente requer equipamento dispendioso, operadores qualificados e exige uma laboriosa preparação das amostras, resultando em processos morosos, pouco adequados à análise de rotina. Para a rotina laboratorial de controlo de qualidade, para investigação e/ou para o rastreio rápido de amostras biológicas é necessário o desenvolvimento de procedimentos analíticos rápidos, simples, fiáveis e robustos, os quais poderiam ser desenvolvidos recorrendo a técnicas de análise em fluxo. No entanto, até ao momento não se encontra descrito na literatura nenhuma metodologia para a determinação de carvedilol com aplicação de técnicas de fluxo.

Tal como foi referido no Capítulo 1, uma das mais recentes técnicas de fluxo é a análise em sistemas de fluxo multi-impulsão, os quais são caracterizados pela utilização de microbombas solenóides como únicos dispositivos activos [25], cuja actuação origina um fluxo pulsado com uma elevada capacidade de mistura das soluções. A utilização de menos componentes activos executando um maior número de tarefas resulta em excelentes vantagens, como elevada simplicidade, facilidade de controlo e obtenção de níveis de automação mais elevados.

O objectivo do trabalho apresentado neste capítulo consistiu em desenvolver um sistema de fluxo seguindo a estratégia de multi-impulsão para a determinação quimiluminométrica de carvedilol. A determinação é baseada no efeito inibidor do carvedilol na reacção de quimiluminescência do luminol com o hipoclorito, devido à sua capacidade "scavenging". O sistema de fluxo desenvolvido foi aplicado à análise de produtos farmacêuticos.

8.2 Experimental

8.2.1 Reagentes e soluções

Foi preparada uma solução 6,15 x 10^{-4} mol l^{-1} de carvedilol dissolvendo 6,25 mg do sólido em 1 ml de etanol 4 % (m/v) e completando o volume de 25 ml com água desionizada. Quando fora de uso, esta solução era mantida ao abrigo da luz. As soluções padrão de carvedilol eram preparadas, diariamente, por diluição rigorosa da solução concentrada.

A solução 5,0 x 10^{-3} mol l^{-1} de luminol foi preparada dissolvendo 88,8 mg de sólido em 100 ml de carbonato de sódio 0,1 mol l^{-1}.

A solução de hipoclorito 1,5 x 10^{-3} mol l^{-1} foi preparada, diariamente, por diluição rigorosa de uma solução mais concentrada, após doseamento por iodometria segundo a Farmacopeia Portuguesa VII [26]. As soluções de luminol e hipoclorito eram mantidas, protegidas da luz.

As soluções de amostras de formulações farmacêuticas contendo carvedilol, foram preparadas por pesagem de vinte comprimidos que de seguida eram pulverizados em almofariz de porcelana. Calculava-se a quantidade correspondente ao peso médio de uma unidade de cada formulação e dissolvia-se em cerca de 4 ml de etanol 4% (m/v) uma quantidade de amostra referente a 1,0 mg de carvedilol completando o volume de 100 ml com água desionizada.

8.2.2 Equipamento

O sistema de fluxo multi-impulsão desenvolvido para a determinação de carvedilol (Figura 8.2) era constituído por três microbombas solenóides com um volume de pulso de 8µl, as quais foram já caracterizadas no Capítulo 2.

Usou-se ainda uma confluência em perspex, em forma de "Y" e a ligação entre todos os componentes do sistema era efectuada através de tubo de teflon com diâmetro interno de 0,8 mm.

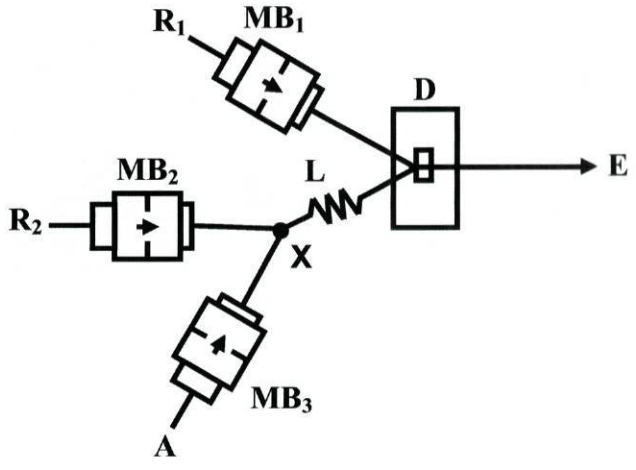


Figura 8.2 – Esquema da montagem de fluxo multi-impulsão usado na determinação de carvedilol em formulações farmacêuticas: MB_1, MB_2 e MB_3 – microbombas solenóides; D – detector; E – esgoto; X – confluência; L – reactor (50 cm); A – amostra; R_1 – solução de luminol; R_2 – solução de hipoclorito de sódio.

8.2.3 Montagem de fluxo

A montagem de fluxo multi-impulsão desenvolvida para a determinação quimiluminométrica de carvedilol (Figura 8.2) era constituída por 3 microbombas solenóides (MB_1, MB_2 e MB_3) que actuavam como únicos dispositivos activos, sendo responsáveis quer pela inserção, quer pela propulsão das soluções, permitindo maior facilidade na montagem e controlo do sistema. MB_1 era responsável pela inserção de luminol, MB_2 e MB_3 eram responsáveis pela inserção da solução de hipoclorito de sódio e amostra, respectivamente. A frequência de pulso em conjunto com o volume de pulso determinava o caudal, permitindo estabelecer assim uma rotina baseada na contagem dos pulsos, que definia o volume de cada solução inserida no percurso analítico.

Inicialmente estabelecia-se a linha de base com a solução de hipoclorito, a qual era inserida no percurso analítico por activação da microbomba MB_2. O ciclo analítico propriamente dito, começava com a inserção de um determinado volume de amostra por actuação de MB_3, enquanto a solução de hipoclorito era simultaneamente adicionada por actuação de MB_2 (Figura 8.3). A amostra e a solução de hipoclorito convergiam no ponto de confluência X, misturando-se rapidamente por acção dos pulsos resultantes da actuação das microbombas, e a reacção ocorria no interior do reactor L. De seguida, MB_3 era desactivada e a solução de hipoclorito transportava a zona da amostra para a detecção. Quando a zona reaccional de amostra e hipoclorito atingia a entrada da célula de fluxo a solução de luminol era inserida em simultâneo, via MB_1, e as soluções eram misturadas por acção do fluxo pulsado, sofrendo uma rápida homogeneização, permitindo o rápido desenvolvimento da reacção de quimiluminescência no interior da célula de fluxo, obtendo-se o sinal analítico.

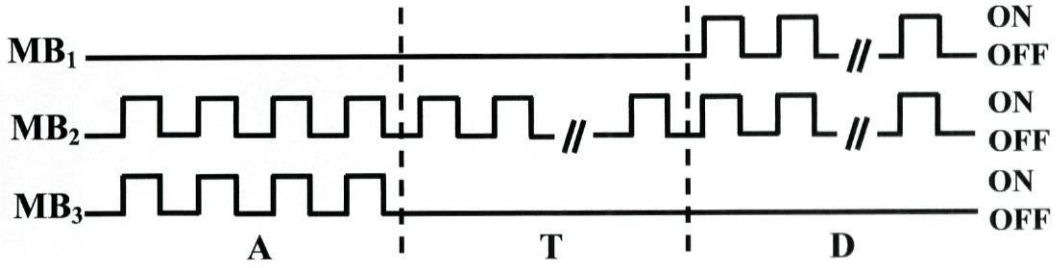


Figura 8.3 – Representação esquemática da posição das microbombas durante o ciclo analítico. MB_1, MB_2 e MB_3 – microbombas solenóides; ON – microbomba activada; OFF – microbomba desactivada; A- fase de inserção da amostra (4 pulsos); T – fase de transporte (25 pulsos); D – fase de detecção (10 pulsos).

8.3 Resultados e discussão

Considerando a actividade antioxidante do carvedilol, foi avaliada a possibilidade de implementar um método quimiluminométrico para a sua determinação baseado na inibição da oxidação de um reagente quimiluminogénico.

Os resultados dos ensaios preliminares efectuados confirmaram a possibilidade de realizar a determinação do carvedilol por quimiluminescência, particularmente quando o hipoclorito era usado como oxidante. O luminol foi escolhido como reagente quimiluminogénico pois é uma das espécies que exibe maior rendimento quântico. O procedimento proposto envolve a inibição da quimiluminescência resultante da reacção entre o luminol e o hipoclorito através da capacidade "scavenging" do carvedilol. Assim, a avaliação do efeito inibidor (ΔI), o qual é linearmente proporcional à concentração de carvedilol, foi efectuado através da diferença entre a intensidade de radiação emitida na ausência de carvedilol (I_B) e a intensidade de radiação emitida pela amostra (I_A), $\Delta I = I_B - I_A$.

8.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos

O mecanismo de geração de luz na reacção de luminol com o hipoclorito é complexo e não se encontra totalmente esclarecido. Aparentemente, o luminol é oxidado pelo hipoclorito formando uma diazoquinona, a qual sendo instável em meio aquoso origina o 3-aminoftalato no estado excitado [27]. A capacidade do carvedilol em inibir a oxidação do luminol provém do facto da reactividade do hipoclorito com luminol ser semelhante à sua reactividade com os grupos amina. Assim o mecanismo de inibição parece estar relacionado com a competição entre os grupos amina do carvedilol e o luminol pelo hipoclorito. Deste modo aumentando o tempo de reacção entre o carvedilol

e o hipoclorito é possível obter um efeito inibidor significativo, mesmo para baixas concentrações. Assim, o sistema de fluxo foi configurado de forma a permitir a mistura das soluções de amostra e hipoclorito antes de entrarem em contacto com o luminol, promovendo, desta forma, o desenvolvimento da reacção responsável pelo efeito inibidor. As soluções de amostra e hipoclorito eram inseridas, em simultâneo, no ponto de confluência X, através das microbombas MB_2 e MB_3, segundo uma configuração análoga à estratégia de confluência de zonas, misturando-se rapidamente devido ao movimento caótico das soluções provocado pelo funcionamento das microbombas e a zona reaccional formada só iria entrar em contacto com o luminol numa fase posterior do ciclo analítico.

Considerando que a máxima emissão de radiação ocorre imediatamente após a mistura do luminol com o hipoclorito, e a intensidade de radiação diminui rapidamente, a mistura entre o luminol e o hipoclorito restante da reacção com a amostra era efectuada à entrada da célula de fluxo, de modo a garantir a detecção do máximo de radiação emitida e obter maior sensibilidade.

Como a inserção da amostra e da solução de hipoclorito era efectuada em simultâneo, o número de pulsos era igual para ambas as soluções, assim a amostra e o hipoclorito eram usados com volumes iguais, definidos pelo número de pulsos e pelo volume de pulso das microbombas. Quando se avaliou a influência do volume de amostra, foram tidos em conta dois objectivos complementares: (i) obter sinais do branco elevados, o que é afectado pelo número de pulsos do hipoclorito; (ii) obter um elevado efeito inibidor, o que é afectado pelo número de pulsos da amostra. Estudou-se o efeito do volume de amostra avaliando a amplitude dos sinais analíticos no intervalo de 16 a 48 µl que corresponde a um número de pulsos de amostra de 2 a 6. Observou-se que a inibição da radiação aumentava com o aumento do número de pulsos, contudo acima

dos 4 pulsos ocorria a saturação do detector devido ao aumento da quantidade de hipoclorito, impossibilitando a avaliação da variação de amplitude dos sinais analíticos. Seleccionou-se, então, um volume de amostra de 32 µl que corresponde a 4 pulsos de amostra, usando-se um volume equivalente de hipoclorito.

Considerando que o objectivo principal da optimização da montagem de fluxo é a obtenção do maior efeito inibidor e que este resulta da reacção entre o carvedilol e o hipoclorito foi avaliada a influência de um reactor L entre o ponto de confluência X e o detector, com a finalidade de aumentar o tempo de reacção. A influência do comprimento do reactor no efeito inibidor foi avaliada variando a ligação entre a confluência e detector com reactores de 10 a 100 cm. Quando era usado um reactor L de 10 cm a amostra e o hipoclorito eram misturados quase de imediato com o luminol à entrada da célula de fluxo e a diminuição da intensidade de radiação não era significativa pois o tempo de reacção entre o hipoclorito e a amostra era curto. Com o aumento do comprimento do reactor L o efeito inibidor era mais acentuado atingindo um máximo para um reactor de 50 cm. Para reactores mais longos observou-se uma diminuição da amplitude do sinal analítico causada pela dispersão da amostra antes da chegada ao detector.

Após definir o processo de inserção da amostra, o parâmetro da montagem a optimizar foi sincronizar a confluência da zona reaccional carvedilol-hipoclorito com o luminol. Esta sincronização era importante para evitar a adição continua de luminol, o qual era apenas adicionado quando a zona de amostra atingia a entrada da célula de fluxo, reduzindo assim o consumo de luminol e consequentemente o custo da determinação. Os pulsos do transporte da amostra pelo reactor L até ao detector foram sucessivamente aumentados e o maior efeito inibidor verificou-se quando a mistura com a solução de luminol ocorria após 25 pulsos de transporte. O aumento do número de pulsos além

deste valor resultava numa diminuição significativa do efeito inibidor, pois quando o luminol era inserido no interior da célula já não coincidia com a totalidade da zona de amostra.

O caudal é um parâmetro especialmente importante quando os reagentes são misturados à entrada da célula de fluxo, pois determina o tempo disponível para o desenvolvimento da reacção de quimiluminescência e a emissão de radiação. Além disso, a influência do caudal é mais pronunciada para reacções de quimiluminescência rápidas [28]. Como está envolvido um procedimento de duas etapas, sendo a primeira a reacção do hipoclorito com o carvedilol, a qual é responsável pelo efeito inibidor e a segunda, a reacção do luminol com o hipoclorito restante, a qual é responsável pela emissão de radiação, a influência do caudal foi avaliada separadamente para cada uma das reacções. No sistema de fluxo multi-impulsão desenvolvido o caudal era estabelecido em termos de tempo de pulso que é definido como a soma dos tempos de paragem da microbomba nas posições activada e desactivada. A influência do caudal foi avaliada estabelecendo tempo de pulso entre 0,2 e 1,0 s o que corresponde a frequências de 300 e 60 pulsos min^{-1}, ou seja caudais de 2,4 a 0,48 ml min^{-1}, para cada solução. Observou-se que durante a fase da reacção do carvedilol com o hipoclorito, a variação do caudal não afectava significativamente a intensidade de radiação emitida, verificando-se apenas, um ligeiro aumento do efeito inibidor para um caudal de 0,8 ml min^{-1}, que corresponde a um tempo de pulso de 0,6 s, o que pode ser explicado pela forte influência do fluxo pulsado no grau de mistura, particularmente durante a fase de inserção da amostra e hipoclorito no ponto de confluência X. No caso da reacção entre o luminol e o hipoclorito, considerando a elevada velocidade de reacção e o facto de coincidir com a detecção, observou-se um efeito pronunciado do caudal na emissão de radiação (Figura 8.4), obtendo-se uma maior intensidade de radiação para um caudal de 0,8 ml min^{-1}.

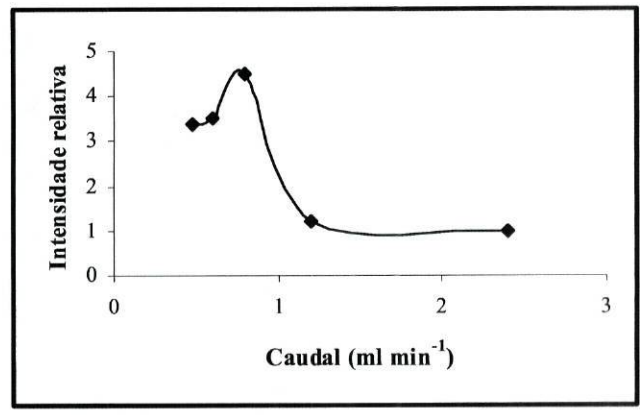


Figura 8.4 – Influência do caudal da fase de reacção entre o luminol e o hipoclorito na intensidade de radiação emitida.

As concentrações de reagente quimiluminogénico e de oxidante são um parâmetro também importante na amplitude da emissão de radiação. O efeito da concentração de luminol na intensidade de radiação emitida foi avaliado para um intervalo de concentrações de 1,0 x 10^{-3} a 7,5 x 10^{-3} mol l^{-1}. Os resultados demonstraram que o efeito inibidor aumentava até 5,0 x 10^{-3} mol l^{-1} (Figura 8.5), diminuindo para valores superiores. Assim foi fixado um valor de concentração de luminol de 5,0 x 10^{-3} mol l^{-1} para prosseguir a optimização da montagem.

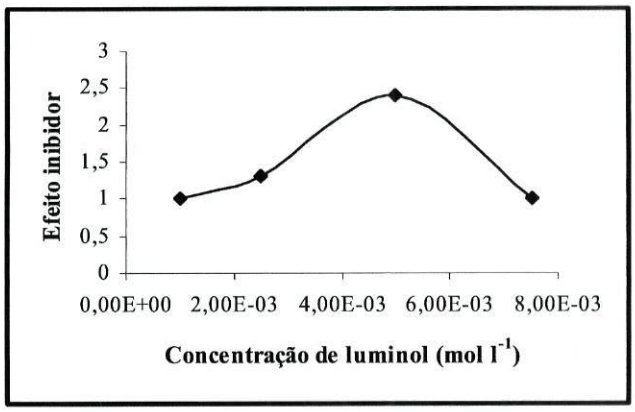


Figura 8.5 – Influência da concentração de luminol no efeito inibidor. Os resultados referem-se à análise do branco e de um padrão de carvedilol de concentração 0,5 mg l^{-1}.

O efeito da concentração de hipoclorito de sódio foi avaliado para um intervalo de concentrações entre 7,1 x 10^{-6} e 3,6 x 10^{-5} mol l^{-1}. O sinal analítico sofria um aumento acentuado com o aumento da concentração de hipoclorito e para valores superiores a 1,4 x 10^{-5} mol l^{-1} ocorria a saturação do detector, ficando obviamente insensível às variações da intensidade de luz emitida. Assim foi escolhida a concentração de 1,4 x 10^{-5} mol l^{-1} de hipoclorito de sódio para os estudos posteriores.

A reacção quimiluminométrica do luminol é favorecida pelas condições alcalinas, sendo o pH um parâmetro importante no desenvolvimento do sistema. A influência do pH na intensidade de radiação emitida, foi avaliada preparando diferentes soluções de luminol com uma concentração de 5,0 x 10^{-3} mol l^{-1} em carbonato de sódio 0,1 mol l^{-1} com o pH ajustado a valores entre 7 e 12 unidades. A intensidade de radiação aumentava com o aumento do pH até 10,5, que correspondia ao maior efeito inibidor, e depois diminuía

significativamente. Tendo em conta estes resultados foi fixado um valor de pH de 10,5 unidades.

Após optimização do sistema e usando as condições experimentais definidas anteriormente e apresentadas na Tabela 8.1 para o estabelecimento da curva de calibração, obteve-se um intervalo de relação linear entre a concentração e o sinal analítico de 0,05 a 1,25 mg l^{-1} de carvedilol.

Tabela 8.1 – Valores optimizados dos parâmetros analíticos.

Parâmetros analíticos	
Concentração de luminol	$5,0 \times 10^{-3}$ mol l^{-1}
Concentração de hipoclorito de sódio	$1,4 \times 10^{-5}$ mol l^{-1}
pH do luminol	10,5 unidades
Volume de amostra (número de pulsos)	32 µl (4 pulsos)
Reactor	50 cm
Caudal	0,8 ml min^{-1}

A curva de calibração obtida pode ser representada por $\Delta I = 10,274C + 0,6097$, onde ΔI se refere à diferença entre a intensidade de radiação emitida na ausência de carvedilol e a intensidade de radiação emitida pela amostra e C à concentração de carvedilol expressa em mg l^{-1} com um coeficiente de correlação de 0,9992.

O limite de detecção, calculado como já foi exposto no Capítulo 2, era 3,5 µg l^{-1} e a metodologia permitia efectuar cerca de 150 determinações por hora.

8.3.2 Avaliação de interferentes

Considerando que a metodologia desenvolvida iria ser aplicada à determinação de carvedilol em formulações farmacêuticas, existentes no mercado português, foi avaliado o efeito sobre os sinais analíticos de vários compostos utilizados como excipientes. Este estudo foi efectuado, analisando soluções contendo carvedilol numa concentração fixa de 1,2 x 10^{-6} mol l^{-1} e concentrações crescentes de cada um dos excipientes. Estabeleceu-se o critério de que um composto era considerado interferente se a variação do sinal analítico, para a concentração fixada de analito, relativamente ao obtido na sua ausência, fosse superior a 3%. Os resultados obtidos demonstraram que nas condições optimizadas e para uma razão molar até 100 (excipiente:carvedilol), compostos como a galactose, lactose, frutose, sacarose, glucose e estearato de magnésio não interferiam na reacção.

8.3.3 Análise de formulações farmacêuticas

Com o objectivo de avaliar o desempenho da metodologia desenvolvida, o sistema de fluxo multi-impulsão descrito foi aplicado na análise de formulações farmacêuticas contendo carvedilol, disponíveis no mercado português.

As soluções das diferentes amostras foram preparadas, a partir das formulações em estudo, como referido na secção Experimental deste capítulo e posteriormente analisadas no sistema de fluxo multi-impulsão optimizado.

Com o objectivo de confirmar os resultados obtidos e avaliar possíveis efeitos de matriz, foram efectuados ensaios de recuperação adicionando a cada amostra 0,25 e 0,75 mg l^{-1} de carvedilol, uma vez que nas várias Farmacopeias não se encontram metodologias para a determinação desta espécie. As amostras adicionadas de padrão

eram depois analisadas pela metodologia optimizada. Os resultados da análise das amostras e dos ensaios de recuperação estão esquematizados na Tabela 8.2, tendo-se obtido valores de recuperação entre 90 e 110 %.

A análise repetida (n = 10) de solução de amostra de carvedilol de concentração 0,5 mg l^{-1} pela metodologia desenvolvida originou desvios padrão relativos inferiores a 1,3 %, revelando uma boa repetibilidade.

Tabela 8.2 – Resultados da análise das amostras e dos ensaios de recuperação.

Formulação farmacêutica	**Concentração declarada (mg/formulação)**	**Concentração encontrada (mg/formulação)**	**Recuperação (%)**	
			0,25 mg l^{-1}	**0,75 mg l^{-1}**
Dilbloc (comprimidos)	25	25,4	110	95
Coronat (comprimidos)	6,25	6,4	104	96
Coronat (comprimidos)	25	25,4	94	97
Ratiopharm (comprimidos)	6,25	6,2	90	99
Ratiopharm (comprimidos)	25	25,4	92	104

8.4 Conclusões

O procedimento automático proposto para a determinação de carvedilol em formulações farmacêuticas é caracterizado por elevada selectividade, sensibilidade, robustez, facilidade de operação e de automação, características estas, que constituem uma recomendação para a sua aplicação como uma alternativa para os escassos métodos disponíveis para a determinação de carvedilol.

Os resultados obtidos para a metodologia desenvolvida confirmam-na como uma metodologia perfeitamente adequada para a execução de análises de rotina e de controlo de qualidade de carvedilol em matéria-prima e em produtos farmacêuticos, o que é reforçado pela inexistência de efeito interferente dos compostos normalmente usados como excipientes.

O favorecimento do carvedilol na competição pelo hipoclorito, aumentando o tempo de reacção entre os dois, permitiu obter um efeito inibidor significativo mesmo para baixas concentrações de carvedilol, resultando num limite de detecção de cerca de 3,5 $\mu g\ l^{-1}$. A obtenção de um limite de detecção tão baixo possibilita a aplicação da metodologia desenvolvida em ensaios de dissolução de formas farmacêuticas sólidas. No entanto, uma vez que o intervalo de resposta linear não é suficientemente amplo para alcançar todas as concentrações obtidas num ensaio de dissolução, seria necessário implementar uma estratégia de diluição em linha, por exemplo reduzindo o volume de amostra inserida, aumentando o caudal transportador ou recorrendo ao conceito de amostragem de zonas, além disso poderia ser incorporada uma linha de retorno capaz de ajustar os parâmetros da montagem à concentração de amostra de modo a abranger um intervalo de concentrações mais amplo.

Importa salientar que a metodologia desenvolvida utiliza equipamento simples e é totalmente automatizada, reduzindo ao mínimo a intervenção do operador e possibilita a

realização de elevado número de determinações por hora de forma reprodutível, não sendo necessária uma manipulação extensiva da amostra.

A implementação desta reacção quimiluminométrica num sistema de fluxo multi-impulsão totalmente automatizado resultou ainda num baixo consumo de reagentes e produção de efluentes. De facto por cada determinação eram gastos cerca de 71 μg de luminol e 0,33 μg de hipoclorito de sódio e gerava-se cerca de 0,42 ml de efluente.

8.5 Referências bibliográficas

[1] Martindale, The Complete Drug Reference, 33rd ed., Pharmaceutical Press, London, 2002 p. 855.

[2] K. Nakamura, K. Kusano, Y. Nakamura, M. Kakishita, K. Ohta, S. Nagase, M. Yamamoto, K. Miyaji, H. Saito, H. Morita, T. Emori, H. Matsubara, S. Toyokuni, T. Ohe, Circulation 105 (2002) 2867.

[3] P. Dandona, R. Karne, H. Ghanim, W. Hamouda, A. Aljada, C.H. Magsino, Circulation 101 (2000) 122.

[4] Lista de Substâncias proibidas e Métodos proibidos, Código Mundial de Antidopagem, disponível a partir de: URL: http://www.idesporto.pt/cnad.asp.

[5] E.J. Eisenberg, W.R. Patterson, G.C. Kahn, J. Chromatogr. B: Biomed. Appl. 493 (1989) 105.

[6] N. Hokama, N. Hobara, H. Kameya, S. Ohshiro, M. Sakanashi, J. Chromatogr. B 732 (1999) 233.

[7] P. Ptáček, J. Macek, J. Klíma, J. Chromatogr. B 789 (2003) 405.

[8] G. Lamprecht, K. Stoschitzky, Chromatographia 59 (2004) 551.

[9] M. Machida, M. Watanabe, S. Takechi, S. Kakinoki, A. Nomura, J. Chromatogr. B 798 (2003) 187.

[10] E. Yang, S. Wang, J. Kratz, M.J. Cyronak, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 609.

[11] J. Stojanović, V. Marinković, S. Vladimirov, D. Veličković, P. Sibinović, Chromatographia 62 (2005) 539.

[12] F. Behn, S. Läer, H. Scholz, J. Chromatogr. Sci. 39 (2001) 121.

[13] F. Behn, S. Michels, S. Läer, G. Blaschke, J. Chromatogr. B 755 (2001) 111.

[14] L. Clohs, K.M. McErlane, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2001) 545.

[15] L. Clohs, K.M. McErlane, J. Pharm. Biomed. Anal. 31 (2003) 407.

[16] K. Deventer, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 90.

[17] S.W. Myung, C.H. Jo, J. Chromatogr. B 822 (2005) 70.

[18] H.Y. Wang, Y. Xiao, J. Han, Anal. Sci. 21 (2005) 537.

[19] H.Y. Wang, Y. Xiao, J. Han, X.S. Chang, Anal. Sci. 21 (2005) 1281.

[20] Y. Xiao, H.Y. Wang, J. Han, Spectrochim. Acta A 61 (2005) 567.

[21] L.X. Xu, N. Hui, L.Y. Ma, H.Y. Wang, Spectrochim. Acta A 61 (2005) 855.

[22] A. Radi, T. Elmogy, Il Fármaco, 60 (2005) 43.

[23] B. Dogan, S.A. Ozkan, Electroanalysis, 17 (2005) 2074.

[24] C.V.S. Ieggli, S.G. Cardoso, L.P Belle, J. AOAC Int. 88 (2005) 1299.

[25] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 466 (2002) 125.

[26] Farmacopeia Portuguesa VII, vol. I, Lisboa, 2002, pp 417.

[27] J.Arnhold, S. Mueller, K. Arnold, K. Sonntag, J. Biolumin. Chemilumin. 6 (1993) 307.

[28] J. Li, P.K. Dasgupta, Anal. Chim. Acta 398 (1999) 33.

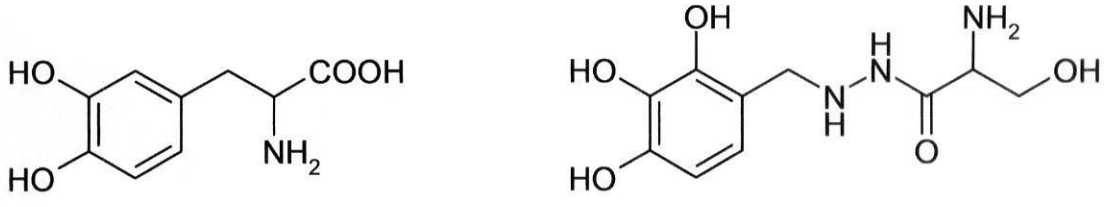
CAPÍTULO 9

Determinação simultânea de levodopa e benserazida com tratamento quimiométrico do sinal analítico

9. Determinação simultânea de levodopa e benserazida com tratamento quimiométrico do sinal analítico.

9.1 Introdução

A levodopa ((-)-3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina) (Figura 9.1 A) é um aminoácido natural, percursor do neurotransmissor dopamina, que é usado no tratamento da doença de Parkinson cujos sintomas estão relacionados com a depleção de dopamina no sistema nervoso central (SNC). Ao contrário da dopamina, a levodopa atravessa a barreira hemato-encefálica, sendo convertida em dopamina no cérebro. Quando administrada oralmente a levodopa é rapidamente descarboxilada a nível periférico (fígado, intestino, rins), deixando apenas uma pequena fracção de fármaco inalterado disponível para ser transportado para o SNC. Por este motivo, a levodopa é frequentemente administrada em conjunto com um inibidor da dopa-descarboxilase como a benserazida ((RS)-2-amino-3-hidroxi-2'-(2,3,4-tri-hidroxibenzil)propano-hidrazida) (Figura 9.1 B).



A **B**

Figura 9.1 – Estrutura da levodopa (A) e da benserazida (B)

A benserazida inibe a descarboxilação da levodopa a nível periférico, deixando mais levodopa disponível para ser transportada para o SNC. Este facto permite uma redução da dose de levodopa diminuindo assim os efeitos periféricos laterais, tais como náuseas, vómitos e arritmias cardíacas, bloqueando a produção periférica de dopamina [1].

São inúmeras as metodologias descritas para a determinação da levodopa individualmente quer em formulações farmacêuticas quer em amostras biológicas.

No que concerne às técnicas cromatográficas destaca-se a utilização da cromatografia líquida de elevada eficiência com detecção electroquímica [2-4] para a determinação de levodopa em plasma.

A utilização da espectrofotometria de UV/Vis para a determinação de levodopa, está amplamente divulgada, destacando-se: a reacção com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno, catalisada pelo brometo de cetiltrimetilamónio [5]; a reacção com o *p*-aminofenol na presença de KIO_4 e determinação da absorvência do composto formado a 574 nm [6]; a reacção com Ce(IV) [7] e oxidação enzimática [8] com determinação da absorvência dos produtos formados a 510 e a 480 nm, respectivamente. Naraja *et al* propuseram a determinação espectrofotométrica de levodopa baseada na oxidação com a N-bromossuccinimida e posterior derivatização com isoniazida formando-se um composto vermelho com avaliação da absorvência a 480 nm [9]. Outro método baseado na oxidação da levodopa por Pb (IV) foi proposto, determinando a absorvência do produto formado a 520 nm [10]. A espectrofotometria de UV/Vis foi ainda utilizada para a determinação simultânea de levodopa e carbidopa em produtos farmacêuticos recorrendo a métodos quimiométricos [11].

As técnicas fluorimétricas têm sido pouco aplicadas à determinação de levodopa, havendo a referir duas metodologias baseadas na inibição da reacção entre o rosa bengala [12] ou a floxina [13] e o ácido etilenodiaminotetracético.

Foram também propostas metodologias de electroforese capilar para a determinação de levodopa individualmente [14], e em simultâneo com a carbidopa [15].

As metodologias analíticas envolvendo métodos electroquímicos para a determinação de levodopa incluem a potenciometria [16] e a amperometria [17].

A levodopa foi ainda determinada por quimiluminescência directamente por reacção com o permanganato [18] ou indirectamente por inibição da radiação emitida pelo sistema luminol-hipoclorito [19] ou ainda por produção de peróxido de hidrogénio por reacção com imidazol [20].

A implementação de metodologias analíticas em sistemas de fluxo tem vindo a crescer numa tentativa de tornar as determinações mais rápidas e económicas, de modo que actualmente existe uma quantidade razoável de metodologias FIA para a determinação de levodopa com diversos sistemas de detecção [5,6,8,10,13,17-19].

No que concerne à determinação simultânea de levodopa e benserazida são ainda escassos os métodos disponíveis, sendo a maioria baseados em espectrofotometria de UV/Vis. Devido às semelhanças entre as estruturas químicas dos dois compostos a sua determinação simultânea foi efectuada recorrendo à espectrofotometria diferencial [21] e espectrofotometria derivativa [22,23] a qual foi também usada na determinação simultânea de levodopa, benserazida e ácido ascórbico de modo discreto e em FIA [24].

As técnicas espectrofotométricas foram ainda utilizadas no desenvolvimento de dois métodos cinéticos para a determinação simultânea de levodopa e benserazida [25,26] um dos quais foi implementado em FIA [25].

Podem ainda encontrar-se descritas metodologias analíticas envolvendo técnicas de electroforese capilar para a determinação simultânea de benserazida e levodopa [27,28].

A quimiluminescência apresenta inúmeras características vantajosas que a tornam atractiva para aplicação como metodologia analítica, contudo a sua principal desvantagem é a falta de selectividade da maioria das reacções quimiluminométricas.

No entanto nos últimos anos, a utilização combinada das técnicas de fluxo e dos métodos de calibração multivariada revelou ser uma estratégia promissora para a análise multicomponente de misturas sem necessidade de separação prévia. Deste ponto de vista, as redes neuronais artificiais constituídas por um conjunto de métodos matemáticos e algoritmos computacionais especialmente projectados para simular o processamento de informações e aquisição de conhecimento do cérebro humano, têm suscitado um elevado interesse que se traduz num aumento da sua aplicação em diferentes técnicas de detecção incluindo a quimiluminescência [29-31], confirmando o seu potencial como técnica de modelação para a eliminação ou redução de interferências.

O objectivo deste trabalho consiste em desenvolver um sistema de fluxo multi-impulsão com detecção por quimiluminescência combinado com a calibração por rede neuronal artificial para a determinação simultânea de levodopa e benserazida. A metodologia é baseada na reacção de quimiluminescência entre a benserazida e o luminol que aqui é descrita pela primeira vez, e no efeito inibidor da levodopa sobre esta reacção quer a nível do máximo de radiação emitida quer a nível cinético. A utilização da estratégia de paragem de fluxo permite a monitorização do desenvolvimento da reacção, medindo a intensidade de radiação emitida em função do tempo. O método desenvolvido foi aplicado na análise de formulações farmacêuticas contendo levodopa e benserazida.

9.2 Métodos de calibração multivariada

Os perfis de emissão de quimiluminescência em função do tempo para uma série de amostras resultam numa matriz bidimensional com dimensões (amostra versus tempo). Uma vez que em quimiluminescência a intensidade detectada é a intensidade total, não havendo discriminação dos comprimentos de onda para auxiliar a determinação simultânea, é necessário recorrer a métodos multivariados para estimar as concentrações dos analitos presentes nas amostras. Adicionalmente, se não existe nenhum conhecimento a-priori acerca do mecanismo da reacção é necessário usar métodos multivariados empíricos os quais podem ser divididos em métodos supervisionados e métodos não supervisionados. Os métodos supervisionados requerem um passo de regressão e são usados para relacionar duas quantidades (por exemplo: regressão multivariada, regressão de mínimos quadrados parciais, regressão por passos). Os métodos não supervisionados são usados na análise preliminar de dados e são geralmente usados em problemas de classificação (por exemplo, a análise de factores, a análise de agrupamentos e a análise de componentes principais) [32].

Uma vez que o objectivo deste trabalho é estimar a concentração de dois analitos a partir de perfis de emissão de quimiluminescência é necessário recorrer a métodos de regressão. A regressão por mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares-PLS) (linear) e as redes neuronais pró-alimentadas (feed-forward neuronal networks) (não-lineares) estão entre os métodos de regressão mais usados devido à sua ampla aplicabilidade e qualidades estatísticas.

9.2.1 Análise em componentes principais (PCA)

A análise em componentes principais é um processo que permite projectar o espaço original de variáveis num espaço de dimensão mais reduzida [32]. É um modelo linear baseado na decomposição singular de uma matriz de dados de dimensão amostras x tempo, resultando em duas matrizes: os componentes principais ("scores") (T) (amostras x componentes) que representam a variabilidade entre os ensaios e os factores ("loadings") (P) (tempo x componentes) contendo informação da dimensão do tempo. A matriz dos resíduos (E) (ensaios x tempo) é a matriz de resíduos que depende do número de componentes seleccionados (Equação 9.1) [33].

$$X = TP^T + E \qquad (9.1)$$

As variáveis derivadas das originais são designadas por componentes principais (T). O procedimento de PCA faz uma partição da variância nas componentes principais sendo que cada componente principal é calculada de forma a reter a maior quantidade de variância presente nas variáveis originais. A primeira componente principal é calculada por forma a reter a maior quantidade possível de variância, a segunda é calculada da mesma forma tendo sido retirada dos dados originais a variância já contabilizada pela primeira componente e assim sucessivamente, até serem obtidas tantas componentes principais quantas as variáveis originais. As primeiras componentes principais retêm a maior parte da variância e factores como ruído ou correlação são descritos pelas restantes componentes.

9.2.2 Regressão de mínimos quadrados parciais

A regressão por mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares – PLS) é uma técnica estátistica multivariada usada no desenvolvimento de modelos de regressão entre uma ou mais variáveis dependentes (ex: concentração do analito) e um conjunto de variáveis independentes derivadas do processo [34]. O método PLS é baseado no cálculo de variáveis latentes as quais são calculadas de modo a maximizar a covariância entre as variáveis latentes ("scores") de um bloco independente (X) e as variáveis latentes de um bloco dependente (Y). O modelo PLS decompõe o bloco independente num conjunto de componentes principais (T) através de um conjunto de pesos ($W=X^Ty$) que explicam a estrutura dos dados [35].

$$X=TP^t+E \tag{9.2}$$

$$y=Tq^t+F \tag{9.3}$$

Nas Equações 9.2 e 9.3, X é a matriz dos estimadores e y é o vector resposta, E e F são os resíduos de X e y respectivamente, T são as variáveis latentes e P e q são os factores dos dados independentes e dependentes respectivamente. O modelo PLS pode ser expresso com um vector de regressão b e as previsões podem ser obtidas como: $y = Xb$. Existem alguns aspectos que devem ser considerados de modo a construir um modelo PLS robusto, nomeadamente as variáveis a incluir no modelo e o número de componentes. O número de componentes pode ser obtido por validação cruzada [36]. Para tal foi adoptado o método "deixa-um-fora" ("leave-one-out") como método de optimização do número de variáveis latentes (uma vez que o número de soluções padrão de calibração é reduzido). Quando está disponível um número elevado de padrões de calibração, métodos como o "deixa-bloco-contiguo-fora" ("contiguous-leave-block-

out") podem produzir resultados menos enviesados. Os limites de confiança para modelos de previsão podem ser estimados por uma estratégia de amostragem ("bootstrapping") [37]. Considerando um conjunto de dados composto por n soluções padrão, para cada solução i (i=1,...,n), vários modelos PLS são calibrados a partir de um conjunto de soluções padrão obtidas por amostragem com substituição de n soluções pelas restantes n-1 (excluindo a solução padrão teste). De seguida a solução padrão teste é projectada em cada modelo e os resíduos de previsão são usados para estimar o desvio padrão do erro. O desvio padrão é usado para estimar o limite de confiança da previsão para determinado nível de confiança (geralmente 95%) [38].

9.2.3 Redes neuronais

Redes neuronais artificiais pró-alimentadas ("feed-forward neural networks") são funções matemáticas não-lineares aplicadas ao campo da engenharia (bio)química para modelar relações de entrada-saída desconhecidas [39]. O algoritmo de treino típico para estimar os parâmetros é denominado retro-propagação. Os métodos de optimização de segunda ordem, como o algoritmo Levenberg-Marquardt [39] são geralmente utilizados para estimar os parâmetros de rede (pesos e incrementos). Devido à ausência de significado físico dos parâmetros, as redes neuronais são consideradas modelos de caixa negra. Contudo é possível extrair informação importante destes modelos por análise da sensibilidade das saídas em função das entradas. Um aspecto muito importante no treino da rede neuronal é evitar o sobre-ajuste de dados. Os parâmetros de treino como o número de nodos (número de nodos ocultos em redes de três camadas), algoritmo de treino, iterações de treino e erro devem ser optimizados. Os últimos são geralmente evitados através da validação cruzada da rede. Uma estratégia comum é dividir os dados

em conjunto de calibração, conjunto de validação e conjunto teste. A calibração é usada para ajustar os parâmetros e a validação é usada durante o processo iterativo para avaliar os erros de validação. Assim que o erro de validação começa a aumentar o treino deve ser interrompido. O conjunto teste é usado para verificar o desempenho da rede. Com o objectivo de optimizar as previsões, podem ser treinadas em paralelo mais do que uma rede, sendo a real previsão de rede uma média das previsões individuais de cada previsão de rede. O número ideal de nodos ocultos pode ser estimado comparando os resultados de diferentes topologias de rede, variando o número de nodos ocultos. Na maioria das aplicações, redes de três camadas com um pequeno número de nodos ocultos (geralmente menos de 10), funções de activação não-lineares para as camadas ocultas e lineares para a última camada, tendem a fornecer os melhores resultados. O aumento do número de nodos e de camadas só se justifica se os conjuntos de dados forem muito grandes ou para sistemas muito complexos com elevada razão sinal/ruído. Os erros de previsão para as previsões de redes neuronais artificiais podem ser avaliados pela estratégia de amostragem já descrita para o PLS [37].

9.3 Experimental

9.3.1 Reagentes e soluções

Uma solução 5,0 x 10^{-3} mol l^{-1} de luminol foi preparada dissolvendo 88,8 mg de sólido em 100 ml de carbonato de sódio 0,1 mol l^{-1}.

Foram preparadas diariamente soluções 300 mg l^{-1} de levodopa e de benserazida dissolvendo 15 mg do respectivo sólido em 50 ml de água desionizada.

As soluções padrão de levodopa e benserazida eram preparadas por diluição rigorosa das soluções concentradas. Todas as soluções eram mantidas protegidas da luz.

As soluções de amostra de formulações farmacêuticas contendo levodopa e benserazida, foram preparadas por pesagem de vinte comprimidos que de seguida eram pulverizados em almofariz de porcelana. Calculava-se a quantidade correspondente ao peso médio de uma unidade de cada formulação e dissolvia-se em 50 ml de água desionizada uma quantidade de amostra referente a 5 mg de levodopa e 1,25 mg de benserazida. A solução obtida era posteriormente diluída em água desionizada numa proporção de 1:5.

9.3.2 Equipamento e software

O sistema de fluxo multi-impulsão desenvolvido para a determinação simultânea de levodopa e benserazida (Figura 9.2) era constituído por três microbombas solenóides com um volume de pulso de 8µl, cujas características já foram descritas detalhadamente no Capítulo 2.

Usou-se ainda uma confluência em perspex, em forma de "+" e a ligação entre todos os componentes do sistema era efectuada através de tubo de teflon com diâmetro interno de 0,8 mm.

O sinal de quimiluminescência produzido era registado usando um microcomputador equipado com uma interface de aquisição de dados. O tratamento de dados foi realizado com o Matlab versão 6.5 (Mathworks) usando as ferramentas (toolbox) de redes neuronais (Mathworks) e PLS (Eigenvector).

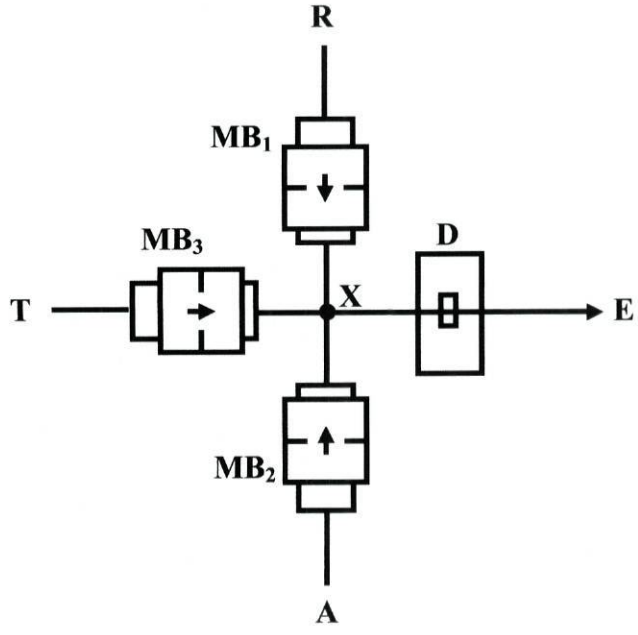


Figura 9.2 – Esquema da montagem de fluxo multi-impulsão usado na determinação simultânea de levodopa e benserazida em formulações farmacêuticas: MB_1, MB_2 e MB_3 – microbombas solenóides; D – detector; E – esgoto; X – confluência; A – amostra; R – solução de luminol; T – transportador (água desionizada).

9.3.3 Montagem de fluxo

A montagem de fluxo multi-impulsão desenvolvida para a determinação quimiluminométrica simultânea de levodopa e benserazida (Figura 9.2) era constituída por 3 microbombas solenóides (MB_1, MB_2 e MB_3) que actuavam como únicos dispositivos activos, sendo responsáveis quer pela inserção, quer pela propulsão das soluções, permitindo maior facilidade na montagem e controlo do sistema. MB_1 era responsável pela inserção de luminol, MB_2 e MB_3 eram responsáveis pela inserção da solução de amostra e de transportador, respectivamente.

O ciclo analítico (Figura 9.3) iniciava-se com a inserção de transportador (água desionizada) activando a microbomba MB_3, que preenchia todo o sistema estabelecendo-se a linha de base. De seguida as soluções de amostra e luminol eram inseridas numa configuração semelhante à estratégia de confluência de zonas por activação simultânea de MB_1 e MB_2. O fluxo pulsado resultante da actuação das microbombas assegurava uma mistura eficiente no ponto de confluência das soluções (X), de modo que o reactor entre o ponto X e o detector tinha apenas o comprimento necessário para efectuar a ligação entre estes dois componentes. Posteriormente era activada a bomba MB_3 (MB_1 e MB_2 eram desactivadas) que efectuava o transporte da zona de reacção para a detecção. Quando a zona reaccional atingia a célula de fluxo MB_3 era desactivada e recorrendo a uma estratégia de paragem de fluxo era obtido o sinal analítico que correspondia ao perfil da intensidade de radiação emitida em função do tempo. A utilização de microbombas solenóides como únicos dispositivos activos facilita o controlo automático do processo de transporte e paragem da zona de amostra permitindo monitorizar o desenvolvimento da reacção de forma reprodutível.

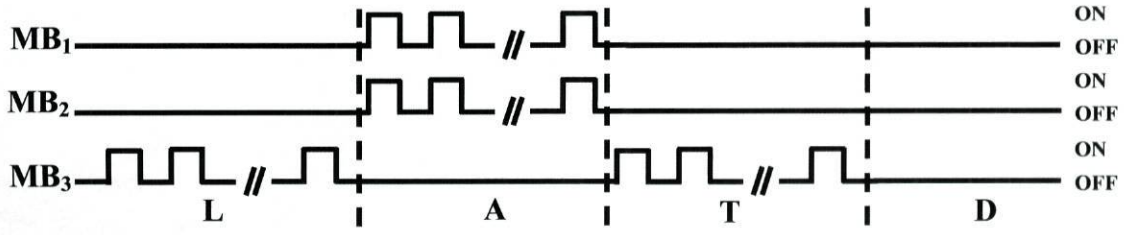


Figura 9.3 – Representação esquemática da posição das microbombas durante o ciclo analítico. MB_1, MB_2 e MB_3 – microbombas solenóides; ON – microbomba activada; OFF – microbomba desactivada; L – estabelecimento da linha de base (30 pulsos); A- fase de inserção da amostra (12 pulsos); T – fase de transporte (5 pulsos); D – fase de detecção, paragem de fluxo (100 s).

9.3.4 Processamento de dados

Os dados obtidos foram processados por PLS e por redes neuronais, realizando-se previamente a análise por componentes principais no caso dos modelos com redes neuronais. As componentes do modelo PCA, foram usadas como dados de entrada na rede neuronal, o que reduz o tempo de treino da rede sem perda da informação. O número de componentes principais foi optimizado e para este número foram obtidas as concentrações do conjunto de previsão.

Para o modelo optimizado foram seleccionados dois parâmetros para testar a capacidade de previsão do modelo quimiométrico para cada componente: a raiz do erro médio quadrado (RMSE) e o erro médio relativo (MRE), os quais podem ser obtidos de acordo com:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \tag{9.4}$$

$$MRE = \frac{\sum_{i=1}^{n}\left(\frac{|y_i - \hat{y}_i|}{y_i}\right)}{n} \times 100 \tag{9.5}$$

Onde, $_{yi}$ e $_{\hat{y}i}$ são a concentração real e a concentração prevista pelo modelo, para a amostra i e n representa o número de amostras. Os erros do modelo são divididos em erros de calibração e erros de validação. Os erros de calibração são baseados na estratégia de validação cruzada, usados para optimizar a estrutura do modelo. Os erros de validação são obtidos usando os modelos calibrados em novos dados, os quais são obtidos a partir de amostras reais.

No modelo PLS o número de variáveis latentes é optimizado pela validação cruzada de tipo "deixa-um-fora" para calibração dos dados. Para cada número específico de variáveis latentes são desenvolvidos n modelos (sendo n o número de soluções padrão de calibração) cada um sem a i-ésima solução padrão (i=1,...,n). De seguida cada modelo é utilizado para prever i-ésima solução padrão correspondente. As previsões são depois usadas para calcular o RMSE (neste caso denominado raiz do erro médio quadrado de validação cruzada MSECV), correspondendo o melhor número de variáveis latentes ao menor RMSECV.

Um modelo final é obtido usando todas as soluções padrão de calibração e o melhor número de variáveis latentes, o qual é usado para prever as amostras de validação. É também calculado o erro de previsão RMSEP.

A estratégia adoptada para as redes neuronais é equivalente à descrita para o PLS com alguns ajustes. Neste caso o parâmetro a optimizar é o número de nodos ocultos e não

de variáveis latentes. É também usada a validação cruzada "deixa-um-fora", em que cada rede treinada depende de uma inicialização aleatória de parâmetros (pesos e incrementos). Assim são treinadas 150 redes em cada caso e as previsões são obtidas fazendo a média das previsões individuais. Dos 150 modelos são utilizados os 100 melhores, sendo cada previsão a média de 100 previsões diferentes. Esta estratégia permite ainda estimar o intervalo de previsão para cada amostra prevista usando o desvio padrão das previsões. Os intervalos de previsão são obtidos após a determinação do desvio padrão.

9.3.5 Calibração multivariada

Como forma de verificar a robustez do procedimento analítico foram realizados ensaios abrangendo concentrações de levodopa e cloridrato de benserazida de 5-30 mg l^{-1} e de 2,5-20 mg l^{-1} respectivamente. Estas concentrações foram definidas de modo a que as concentrações destas substâncias nas formulações farmacêuticas ficassem incluídas neste intervalo. Dada a possibilidade de inúmeras combinações foi usado um desenho experimental baseado na maximização do determinante da matriz de desenho (D-óptimo) para criar um conjunto de padrões e réplicas. Foi desenhado um total de 33 padrões, 20 dos quais eram réplicas. As réplicas são necessárias para analisar a robustez do procedimento experimental. Para cada padrão foi registado o sinal univariado de quimiluminescência em função do tempo (de 0 até cerca de 90 seg).

Para avaliar a capacidade do procedimento analítico em quantificar simultaneamente a levodopa e a benserazida, foram executados ensaios de 4 conjuntos de calibração, variando as concentrações de levodopa (5, 10, 15, 20 $mg.L^{-1}$) e de cloridrato de benserazida (2,5, 5, 10, 20 $mg.L^{-1}$) usando um desenho factorial (4^2). No total foram

realizados 16 ensaios os quais foram usados para desenvolver modelos de calibração multivariada para cada molécula. Para cada conjunto de ensaios foram também testadas amostras reais de formulações farmacêuticas, seguindo o mesmo procedimento experimental de modo a validar a calibração. Foram ainda usadas amostras com adição de padrão para verificar as percentagens de recuperação. A Tabela 9.1 resume todos os ensaios realizados.

Tabela 9.1 – Ensaios de quimiluminescência realizados.

Conjunto	**Soluções padrão de calibração(*)**	**Concentração de Levodopa (mg l^{-1})**	**Concentração de Benserazida (mg l^{-1})**	**Soluções de validação (**)**
#1	33 (20)	5-30	2.5-20	0 (0)
#2	16 (0)	5-30	2.5-20	6 (4)
#3	16 (0)	5-30	2.5-20	6 (4)
#4	16 (0)	5-30	2.5-20	9 (6)
#5	16 (0)	5-30	2.5-20	9 (6)

(*) Indicando entre parêntesis o número de réplicas.

(**) Indicando entre parêntesis o número de amostras com adição de padrão.

9.4 Resultados e discussão

Os métodos de calibração multivariada permitem efectuar a análise multicomponente de uma mistura sem a necessidade de recorrer à separação das espécies em causa, usando para tal os dados obtidos da análise espectral da mistura. Em quimiluminescência a intensidade detectada é a intensidade total em todos os comprimentos de onda não havendo discriminação espectral para auxiliar a determinação simultânea. Contudo, quando os analitos apresentam diferentes características cinéticas as misturas podem ser resolvidas usando as curvas de intensidade versus tempo. Recorrendo à estratégia de paragem de fluxo é possível reter a solução emissora na célula de fluxo, permitindo a obtenção do perfil do sinal transiente da quimiluminescência. Assim a montagem de fluxo foi optimizada de modo a obter o máximo de radiação emitida e a permitir a avaliação da intensidade de radiação emitida em função do tempo.

Para que os dados obtidos relativos à intensidade de radiação emitida fossem convertidos em informação útil, foi seleccionado o método de calibração multivariada adequado e procedeu-se à sua optimização.

9.4.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos

Tal como foi referido anteriormente, a metodologia desenvolvida é baseada na reacção de quimiluminescência entre o luminol e a benserazida e no efeito inibidor causado pela levodopa. A presença de levodopa resulta não só na diminuição do máximo de radiação mas também afecta o decaimento da intensidade de radiação emitida pela reacção da benserazida com o luminol.

Uma vez que a reacção responsável pela emissão de radiação é a reacção da benserazida com o luminol a montagem de fluxo foi optimizada para esta reacção, tendo por

objectivo obter o máximo de intensidade de radiação emitida e que toda a intensidade de radiação emitida fosse detectada. Assim toda a optimização foi efectuada em fluxo, implementando-se a paragem de fluxo apenas quando todos os outros parâmetros já se encontravam optimizados, de modo a que no momento da paragem de fluxo o segmento de amostra se encontrasse centrado em frente ao fotomultiplicador, permitindo a detecção de todo o perfil de emissão versus tempo.

Na metodologia desenvolvida a inserção da solução de amostra (benserazida) era efectuada em simultâneo com a solução de luminol numa configuração análoga à estratégia de confluência de zonas. A actuação das microbombas solenóides resultava num fluxo pulsado que assegurava uma mistura rápida e eficiente entre a amostra e reagente no ponto de confluência das soluções (Figura 9.2, X), facto que é suportado pela semelhança entre os sinais analíticos obtidos quando se efectuava a mistura das soluções segundo a estratégia de confluência de zonas e os sinais obtidos quando a mistura de amostra e reagente era efectuada por amostragem binária.

Um dos parâmetros importantes na intensidade de radiação emitida é o volume de amostra e de reagente. Como já foi referido no Capítulo 1, nos sistemas de fluxo multi-impulsão o volume de amostra é definido em termos de número de pulsos de amostra. Assim, a avaliação do efeito do volume de amostra na intensidade de radiação emitida foi efectuada variando o número de pulsos de amostra entre 2 e 14 pulsos o que corresponde a volumes de amostra de 16 a 112 µl. Observou-se um aumento da intensidade de radiação emitida com o aumento do volume de amostra, prosseguindo-se os estudos utilizando 96µl de amostra, já que, para valores superiores o sinal apresentava uma tendência para se manter constante.

Uma vez que a solução de luminol era inserida em simultâneo com a amostra, o volume de luminol inserido era semelhante ao volume de amostra, ou seja 96 µl.

Sendo o luminol percursor da espécie emissora de radiação, a sua concentração constitui um parâmetro importante a optimizar. A avaliação da influência da concentração de luminol foi efectuada para o intervalo de concentrações de $7,5 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol l^{-1}, tendo-se verificado que a intensidade de radiação emitida aumentava com o aumento da concentração de luminol, apresentando para valores superiores a $5,0 \times 10^{-4}$ mol l^{-1} uma tendência para se manter constante. Assim seleccionou-se uma concentração de luminol de $2,5 \times 10^{-4}$ mol l^{-1}, a qual apresentava uma maior linearidade representando também um compromisso entre sensibilidade e consumo de luminol, efectivamente para uma concentração de luminol $5,0 \times 10^{-4}$ mol l^{-1} duplicava o consumo de luminol e obtinha-se apenas um ligeiro aumento da sensibilidade.

Um dos factores que afecta de forma acentuada a intensidade de radiação emitida na oxidação do luminol é o pH. Deste modo avaliaram-se diferentes soluções de luminol com pH ajustado a valores entre 9,5 e 12 unidades. Verificou-se uma maior intensidade de radiação emitida para um valor de pH 11,5 unidades, o qual foi seleccionado para prosseguir com a optimização das condições experimentais.

A amplitude do sinal analítico é também afectada pelo caudal. No sistema de fluxo multi-impulsão desenvolvido o caudal era controlado em termos de frequência de actuação das microbombas, a qual é definida pelo tempo de pulso. Assim para avaliar o efeito do caudal na intensidade de radiação emitida foram testados tempos de pulso entre 0,4 e 1 s, que correspondem a uma frequência de pulso entre e 150 e 60 pulsos min^{-1} e a caudais de 1,2 a 0,48 ml min^{-1}. Verificou-se que aumentando da concentração de benserazida, o caudal para o qual se obtinha uma maior intensidade de radiação emitida era mais elevado. Este facto está, muito provavelmente, relacionado com aumento da velocidade de reacção originado pelo aumento da concentração de benserazida resultando na necessidade de um caudal mais elevado para detectar o

máximo de radiação emitida. Assim escolheu-se um caudal de 0,8 ml min^{-1} que corresponde a uma frequência de 100 pulsos min^{-1} e a um tempo de pulso de 0,6 segundos pois representa um compromisso entre os caudais óptimos para as diferentes concentrações e apresenta maior linearidade para o intervalo de concentrações em estudo.

Na metodologia desenvolvida além da obtenção do máximo de emissão de intensidade de radiação, pretende-se também avaliar a emissão de radiação em função do tempo, para tal o segmento de amostra deve ser transportado até à célula de fluxo e toda a emissão de radiação deve ocorrer em frente ao fotomultiplicador de modo a obter-se um sinal analítico o mais amplo possível. Deste modo foi implementada a estratégia de paragem de fluxo com o objectivo de monitorizar o desenvolvimento da reacção, funcionando como método cinético. A amostra é transportada de modo a obter o grau de mistura desejado com o reagente, e depois é retida no interior da célula de fluxo do luminómetro, onde é monitorizado o desenvolvimento da reacção. Tendo em consideração que o fluxo pulsado resultante da actuação das microbombas permite uma rápida e eficiente mistura entre amostra e reagente, a ligação entre o ponto de confluência X e a célula de fluxo onde ocorre a paragem de fluxo era assegurada por um reactor com o comprimento mínimo necessário. De facto aumentando o comprimento do reactor verifica-se uma diminuição acentuada do sinal analítico.

Tal como foi referido anteriormente, um requisito fundamental para a execução de uma medida cinética de forma reprodutível, é o controlo efectivo do processo de transporte e paragem da zona de amostra. Os sistemas de fluxo multi-impulsão possibilitam uma monitorização da posição da zona de amostra no interior do sistema através do controlo do número de pulsos e do caudal. A avaliação do número de pulsos necessários para o transporte da zona reaccional até á célula de fluxo, de modo a que a paragem de fluxo

ocorresse quando a zona reaccional se encontrava em frente ao fotomultiplicador de forma a detectar toda a emissão de radiação, foi realizada variando o número de pulsos entre 2 e 10, seguida de paragem do fluxo. Observou-se um aumento da amplitude do sinal analítico até 6 pulsos, apresentando para valores superiores uma tendência para se manter constante, utilizando-se para ensaios posteriores 6 pulsos de transportador.

Após o transporte até à célula de fluxo procedia-se à paragem de fluxo, medindo a intensidade de radiação emitida durante 100 s, até ao regresso à linha de base.

Após optimização do sistema e usando as condições experimentais definidas anteriormente e resumidas na Tabela 9.2 para o estabelecimento da curva de calibração univariada de benserazida, sem efectuar paragem de fluxo, obteve-se um intervalo de relação linear entre a concentração e o sinal analítico até 20 mg l^{-1} de benserazida. A curva de calibração obtida é representada por $I = 0,50(\pm0,06)C - 0,13(\pm0,62)$ onde I se refere à intensidade de radiação emitida e C à concentração de benserazida expressa em mg l^{-1} com um coeficiente de correlação de 0,994.

Tabela 9.2 – Valores optimizados dos parâmetros analíticos

Parâmetros analíticos	
Concentração de luminol	$2,5 \times 10^{-4}$ mol l^{-1}
pH do luminol	11,5 unidades
Volume de amostra (número de pulsos)	96 µl (12 pulsos)
Caudal	0,8 ml min^{-1}

Para a calibração univariada de benserazida, o limite de detecção, calculado como já foi exposto no Capítulo 2, era de 0,05 mg l^{-1} e a metodologia permitia efectuar cerca de 125 determinações por hora. Quando se efectuava a paragem de fluxo o ritmo de amostragem era de 28 determinações por hora.

9.4.2 Optimização do modelo quimiométrico

Após a optimização da montagem de fluxo e da definição de todos os parâmetros químicos e físicos, a etapa seguinte consistiu em seleccionar e optimizar o modelo quimiométrico para efectuar a determinação simultânea de levodopa e benserazida baseado no sinal analítico obtido nas condições anteriormente descritas.

Foram registados os perfis de quimiluminescência das soluções padrão do conjunto #1, os quais estão representados na Figura 9.4, onde podemos observar que alguns perfis estão quase sobrepostos e que correspondem às réplicas, o que constitui uma primeira indicação de que o procedimento analítico está a fornecer resultados correctos. Contudo, uma vez que são dados multivariados podemos usar a análise em componentes principais (PCA) para mais facilmente visualizar os resultados dos ensaios enquanto conservamos a informação original.

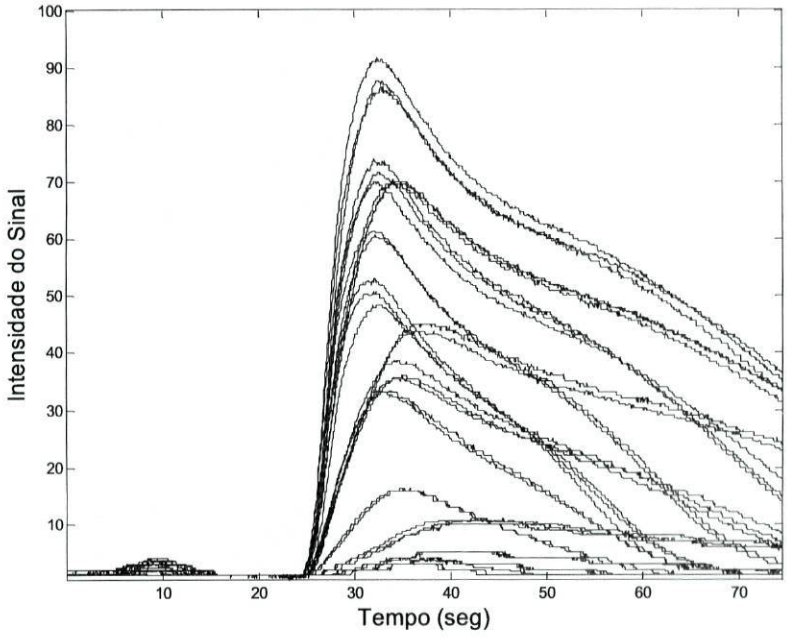


Figura 9.4 – Perfis de quimiluminescência versus tempo de 33 soluções padrão com diferentes concentrações de levodopa e de cloridrato de benserazida.

A representação dos dados num espaço de menores dimensões é conveniente para a visualização dos ensaios e das relações entre as diferentes soluções padrão, o que é efectuado através das componentes principais do PCA, principalmente quando um pequeno número de componentes explica uma quantidade substancial da variância original dos dados. Os perfis unidimensionais dos ensaios de quimiluminescência do conjunto de dados #1 foram então modelados por PCA. O PCA foi construído com 13 soluções padrão (sem as réplicas) de modo a avaliar os erros experimentais. Para construir o modelo foram usados dados provenientes apenas do intervalo de 24,8 a 74,4 s, uma vez que antes dos 24 s os perfis parecem não conter nenhuma informação. Os dados foram centrados na média antes da modelação por PCA. Os resultados demonstraram que os dois componentes principais em conjunto explicam cerca de 99,5% da variância dos dados originais.

Na Figura 9.5 podemos observar os dois componentes principais e as réplicas que foram projectadas no modelo e também representadas no esquema. Próximo de cada ensaio estão as concentrações de cloridrato de benserazida e de levodopa. Verifica-se que as réplicas ficaram próximo das soluções padrão equivalentes. Esta igualdade entre as soluções padrão e as réplicas indica uma boa reprodutibilidade do procedimento analítico. Da distribuição espacial das componentes principais é clara a existência de um padrão e que o sinal de quimiluminescência está relacionado com as concentrações de levodopa e benserazida.

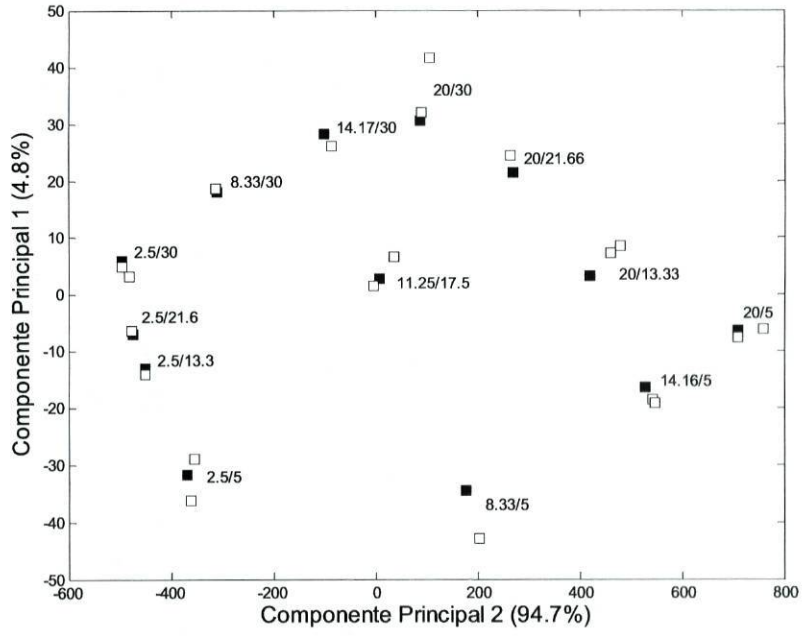


Figura 9.5 – Primeiros componentes principais do modelo PCA para os dados desenhados experimentalmente. ■ – corresponde às soluções padrão para construir o modelo (13 no total), □ – corresponde às projecções das réplicas (20 no total).

Com o intuito de analisar a relação entre o sinal de quimiluminescência e as concentrações dos analitos efectuou-se uma análise semelhante utilizando o conjunto #2, no qual as concentrações de levodopa e benserazida são distribuídas numa grelha de acordo com um desenho factorial. A distribuição dos componentes principais num mapa permite uma melhor interpretação. O objectivo é analisar a agregação das soluções padrão num espaço de menor dimensão e avaliar o impacto da variação da concentração dos analitos no perfil de quimiluminescência. Verificou-se que para os modelos PCA o intervalo que correspondia a uma maior variação dos dados era o intervalo de 28 a 42 segundos, sendo esta a região usada para extrair os componentes principais (Figura 9.6).

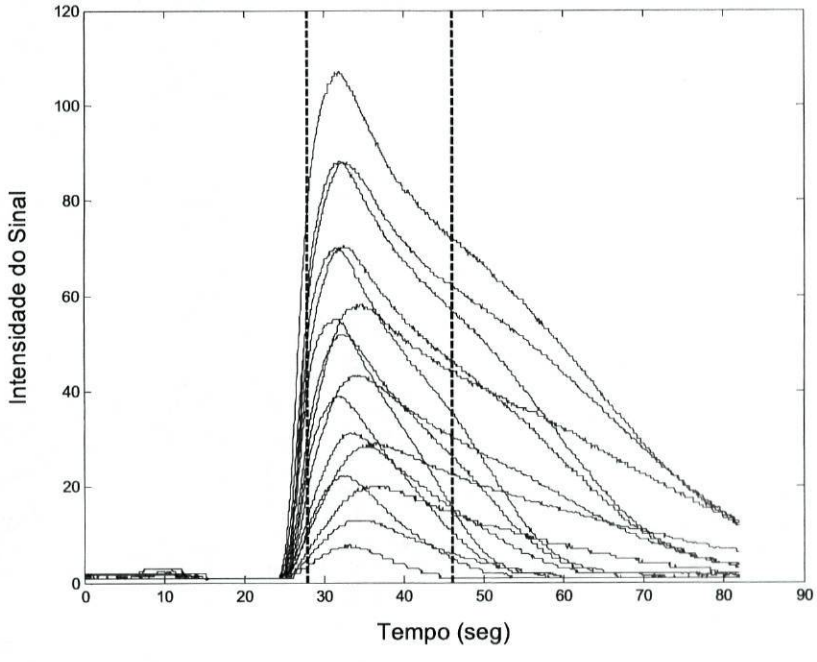


Figura 9.6 – Perfis de quimiluminescência de 16 soluções padrão (conjunto #2). As linhas verticais delimitam a região usada para aplicar a análise de componentes principais.

Os dados da janela de 28 a 42 s foram centrados na média e depois usados para construir o modelo PCA cuja representação das duas componentes principais se pode observar na Figura 9.7. Em conjunto os dois primeiros componentes principais capturam mais de 99 % do total da variância dos dados.

Para compreender mais facilmente a relação entre as concentrações e o sinal de quimiluminescência, as componentes representando as soluções padrão são ligadas por linhas contínuas e linhas a tracejado. As linhas contínuas correspondem aos ensaios com a mesma concentração de benserazida enquanto as linhas a tracejado correspondem a concentrações iguais de levodopa.

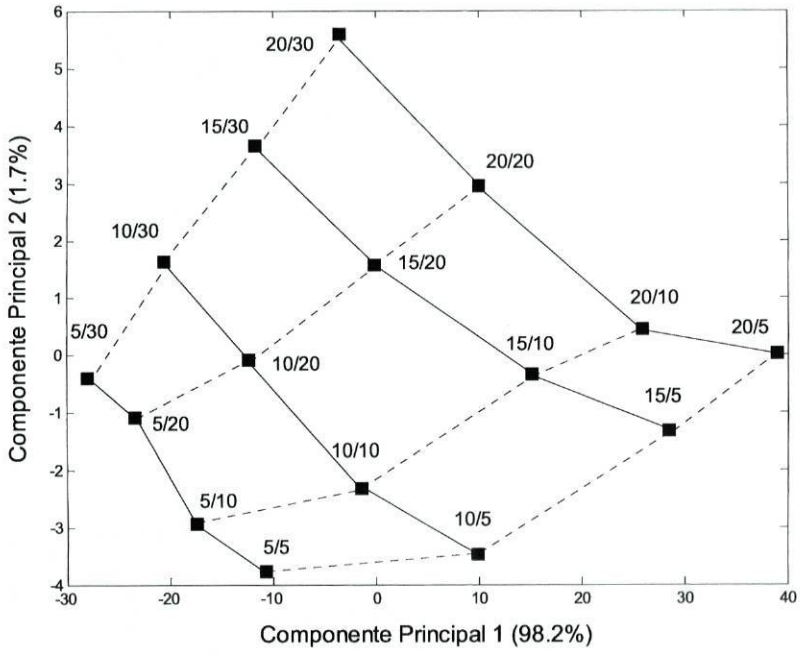


Figura 9.7 – Primeiros componentes principais obtidos de um modelo PCA com duas componentes principais usando os perfis de quimiluminescência de 16 soluções padrão (conjunto #2) com diferentes concentrações de levodopa e benserazida.

Assim podemos verificar no mapa produzido pelo modelo PCA, a existência de duas fontes de variação que são aproximadamente independentes. De uma forma aproximada a componente 1 pode ser interpretada com estando associada à benserazida, daí a principal direcção dos dados, e a componente 2 com a levodopa. Apesar desta evidência, nenhuma das componentes por si só pode explicar a variação de cada analito. Contudo tendo em conta as duas componentes em simultâneo é claro que o padrão de variação dos dois analitos é aproximadamente ortogonal, o que indica que a influência dos componentes na reacção química, monitorizada por quimiluminescência pode ser resolvida de forma adequada pelo modelo de análise de componentes principais. Além disso podemos esperar que a informação necessária para estimar simultaneamente as concentrações de benserazida e de levodopa esteja contida nos dados da monitorização de quimiluminescência em função do tempo. Isto contrasta com a informação disponível quando apenas o máximo de quimiluminescência é monitorizado (o pico da curva versus tempo), sendo impossível resolver a contribuição da benserazida e da levodopa. Outra conclusão que pode ser extraída das componentes principais está relacionada com a possível linearidade entre as componentes e as concentrações reais dos analitos. Apesar de ser possível correlacionar as componentes com as concentrações de analito existem algumas regiões de não linearidade, especialmente para baixas concentrações de analito. Este aspecto é particularmente relevante para o caso da levodopa e pode indicar que um modelo não linear (rede neuronal) pode produzir melhores resultados quando comparado com um modelo linear (PLS).

Uma análise aos factores do modelo PCA demonstrou que a primeira variável latente está principalmente relacionada com o perfil quimiluminescência versus tempo. Esta componente principal já tinha mostrado previamente estar relacionada com a benserazida. A segunda componente principal parece estar mais elevada na região de

aumento e diminuição do perfil de quimiluminescência, ou seja nas regiões de declive absoluto mais elevado. Assim podemos concluir que a segunda componente principal está mais relacionada com o declive do perfil de quimiluminescência, estando mais relacionada com a concentração de levodopa. Um elevado aumento do perfil (cerca de 28 s) e baixa diminuição (cerca de 40 s) parece estar relacionado com uma concentração de levodopa mais elevada.

Os resultados anteriores extraídos da análise de componentes principais demonstram que é possível prever as concentrações de levodopa e benserazida a partir dos perfis de quimiluminescência. Devido à elevada colinearidade foi adoptada a regressão PLS para modelar a concentração dos analitos com base nos perfis quimiluminescência-tempo. Apesar de ser possível construir um único PLS para ambos os analitos em simultâneo é geralmente aceite que um modelo para cada analito é melhor em termos de erro de previsão (bias) e erro de distribuição (variância) [34].

Uma vez que os modelos PLS podem ser muito diferentes dependendo dos estimadores usados (neste caso o sinal medido em função do tempo), foi estimada a melhor janela de dados para modelar a concentração dos analitos. O procedimento foi baseado na construção de vários modelos considerando diferentes janelas de tempo de diferentes tamanhos usando o conjunto #2. Os resultados são apresentados em termos de erro de validação cruzada "deixa-um-fora" (RMSECV). Os modelos foram testados considerando os dados de 24,5 até 90 s. Passos de 1,25 s foram considerados suficientes para obter um resultado, uma vez que a frequência de amostragem dos dados é de 0,05 s. A Figura 9.8 (A, B) apresenta os resultados para a levodopa.

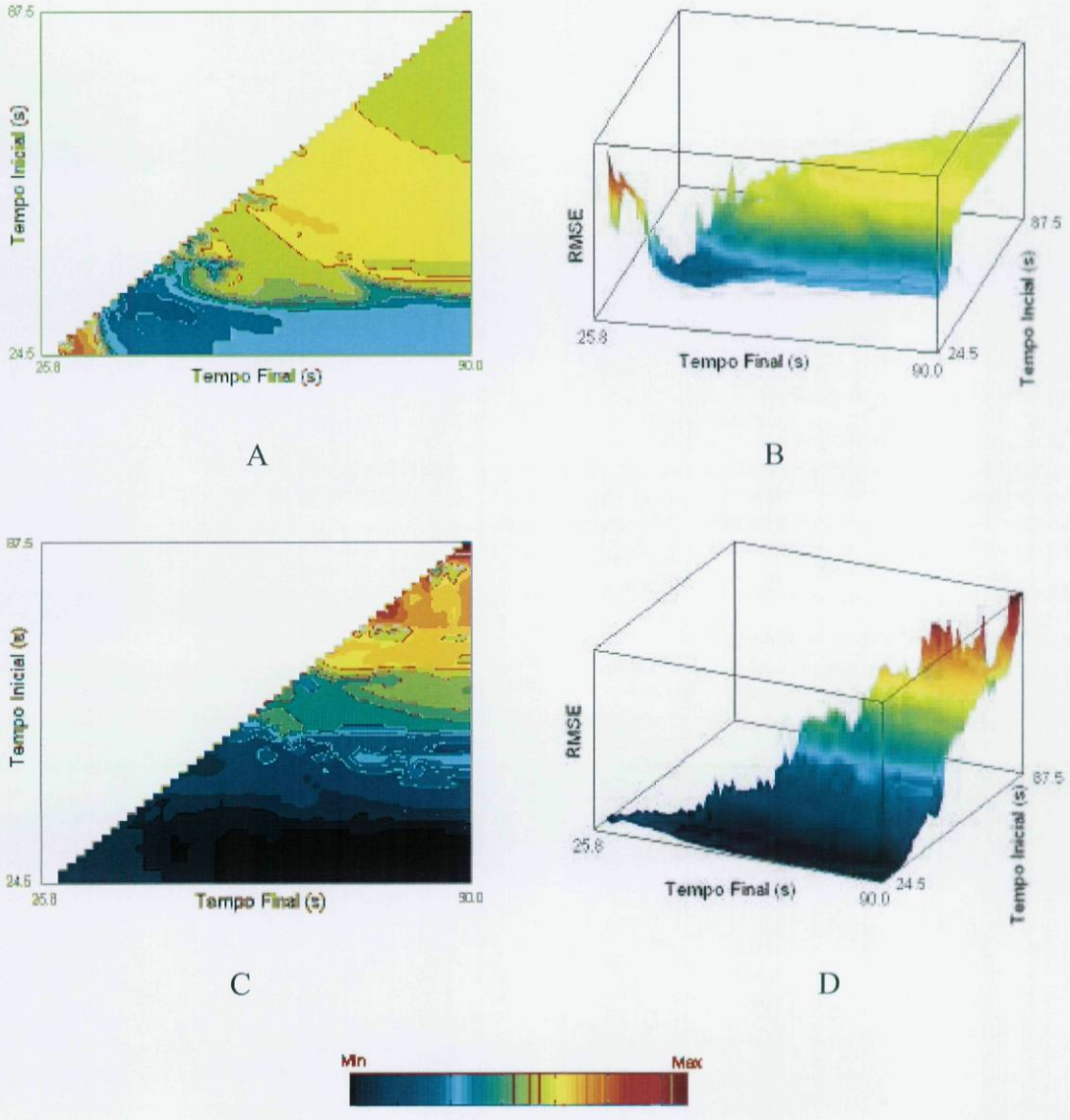


Figura 9.8 – Optimização das regiões do perfil de quimiluminescência para desenvolver os modelos de calibração PLS para a levodopa (A e B) e para a benserazida (C e D).

As cores representam o RMSECV, azul escuro para erros baixos e vermelho para erros elevados. Para a levodopa observa-se uma região onde o erro de validação cruzada é consideravelmente baixo, o que indica que a informação necessária para prever a concentração de levodopa está num região específica (Figura 9.8 A,B). Um erro mínimo

de 1,54 foi obtido para uma janela de tempo de 32,2 até 45,1 s (modelo para 3 variáveis latentes). Do mesmo modo para a previsão de benserazida (Figura 9.8 C, D) os resultados mostram a região onde o modelo dá melhores resultados. Contudo neste caso são mais as janelas possíveis (região azul plana) indicando que para este analito o modelo é mais fácil de obter. O mínimo absoluto de 0,69 foi obtido para uma janela de 29,6 até 68,2 s com um modelo de duas variáveis latentes.

Apesar do PLS dar um modelo satisfatório para a previsão da benserazida, verificou-se que não é obtido um bom ajuste para a levodopa. Este facto está de acordo com os resultados anteriores, nomeadamente os modelos PCA que destacaram a possível não linearidade da concentração de levodopa. Para confirmar estes resultados foram desenvolvidos modelos baseados em redes neuronais pró-alimentadas para levodopa e benserazida para construir uma comparação e avaliar os benefícios de uma estratégia de modelação não linear. A modelação de múltiplos processos de entradas por redes neuronais (neste caso pontos de tempo) não é um procedimento muito aceitável devido ao risco de sobre-ajuste. Para evitar que isto aconteça é comum processar os dados de entrada com um algoritmo de selecção de modo a reduzir a dimensão original dos dados. Neste caso a análise de componentes principais foi seleccionado para extrair as componentes principais as quais foram usadas como entradas da rede neuronal. Em todos os casos mais de 99,5% da variância foi explicada pelas 3 componentes principais, as quais foram usadas como entradas da rede. Uma rede neuronal de 3 camadas foi seleccionada como modelo básico. A tangente hiperbólica e uma função linear foram usadas como funções de activação para os nodos ocultos e nodo de saída respectivamente. Para cada rede o número de nodos da camada oculta foi optimizado por validação cruzada. A Figura 9.9 ilustra a estrutura da rede neuronal do modelo.

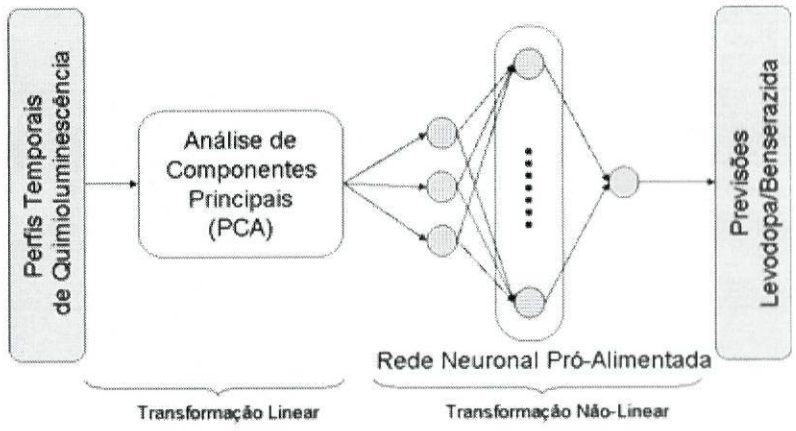


Figura 9.9 – Estrutura da rede neuronal para modelação da levodopa e benserazida.

Os modelos do PLS e rede neuronal foram desenvolvidos para os conjuntos #2 a #5. Os parâmetros mais importantes para o PLS (número de variáveis latentes) e para as redes neuronais (número de nodos da camada oculta) foram optimizados usando a estratégia de validação cruzada descrita anteriormente. Os modelos de optimização foram baseados apenas nos dados de calibração. Ambos os erros de validação cruzada do PLS e da rede neuronal são baseados na estratégia de "deixa-um-fora". Os resultados de validação foram obtidos usando os modelos com dados de validação ou seja, dados de amostras reais. A Tabela 9.3 descreve os resultados obtidos para os conjuntos #2 a #5 usando os modelos de PLS (linear) e rede neuronal (não linear).

Tabela 9.3 – Resumo dos modelos desenvolvidos para as soluções padrão de calibração.

	MODELO PLS					MODELOS DE REDES NEURONAIS				
Conjunto	**LV**	**RMSECV**	R^2_{CV}	**RMSEP**	**Erro Médio (%)**	**HN**	**RMSECV**	R^2_{CV}	**RMSEP**	**Erro Médio (%)**
Levodopa										
#2	4	1.54	96.3	2.38	9.5	4	1.67	96.1	0.84	3.5
#3	4	2.31	92.4	2.45	9.5	2	2.01	94.1	1.20	4.4
#4	4	2.59	90.5	2.20	7.7	6	1.27	97.1	1.94	5.9
#5	3	2.97	89.9	1.50	10.9	2	0.5	99.2	0.60	4.3
Média	---	**2.35**	---	**2.13**	**9.4**	---	**1.36**	---	**1.14**	**4.5**
Benserazida										
#2	2	0.69	98.1	0.60	5.9	2	0.43	98.8	0.45	4.8
#3	2	0.5	99.0	0.68	7.6	2	0.36	99.1	0.60	5.7
#4	2	0.6	98.6	0.40	4.4	2	0.67	98.4	0.51	4.6
#5	2	0.42	99.5	0.58	5.4	2	0.27	99.8	0.32	3.0
Média	---	**0.55**	---	**0.55**	**5.8**	---	**0.44**	---	**0.47**	**4.5**

A Tabela 9.3 mostra que de uma forma geral a substituição dos modelos de PLS (linear) pelas redes neuronais permite uma diminuição do erro de previsão. O que é particularmente importante no caso da levodopa. Para a levodopa o erro de validação médio com calibração por PLS era de 9,4 % enquanto que com a rede neuronal era de 4,5%. Para a benserazida a regressão de PLS fornecia uma estimativa com aproximadamente 6% de erro relativo. Neste caso as redes neuronais permitiram apenas uma pequena redução para 4,5%. Os resultados obtidos destes modelos de regressão confirmam o que foi verificado com os modelos PCA. Confirma-se que é difícil fornecer uma boa estimativa da levodopa em amostras reais através do modelo PLS. O que pode ser explicado pelo facto da variação dos dados ser primeiramente devida à variação da benserazida. Foi também observado que para a levodopa os erros de validação cruzada também são mais severos quando comparados com a benserazida. Pode ser argumentado que a falta de ajuste dos modelos de PLS para a levodopa em amostras reais poderia ser devido a diferentes efeitos de matriz. De facto as amostras reais contêm mais espécies químicas do que a levodopa e a benserazida enquanto as soluções de calibração apenas contêm estas duas. Assim e uma vez que o modelo PLS

com estes dados não pode usar a denominada vantagem de segunda ordem [40], interferentes na matriz das amostras reais podem levar a mudanças no perfil de quimiluminescência esperadas. Uma vez que estes interferentes não foram tidos em conta na calibração, o modelo não seria adequado. Contudo, isto não se verifica no caso dos modelos de redes neuronais. Assim desempenho superior das redes neuronais em relação ao PLS no caso da levodopa pode ser devido a não linearidades (que não são explicadas pelo PLS).

9.4.3 Avaliação de interferentes

Considerando que a metodologia desenvolvida iria ser aplicada à determinação de benserazida e levodopa em formulações farmacêuticas existentes no mercado português, foi avaliado o efeito sobre os sinais analíticos de vários compostos utilizados como excipientes. Este estudo foi realizado, sem efectuar paragem de fluxo, analisando soluções contendo benserazida e levodopa em concentrações fixas de $1,0 \times 10^{-4}$ mol l^{-1} e $1,7 \times 10^{-5}$ mol l^{-1}, respectivamente, e concentrações crescentes de cada um dos excipientes. Estabeleceu-se o critério de que um composto era considerado interferente se a variação do sinal analítico, para a concentração fixada de analito, relativamente ao obtido na sua ausência, fosse superior a 3%. Os resultados obtidos demonstraram que nas condições optimizadas e para uma razão molar até 100 (excipiente:levodopa), o ácido cítrico, a glucose, a galactose, a sacarose o manitol e o estearato de magnésio não interferiam, a gelatina não interferia para uma razão molar até 10 (excipiente:levodopa). Uma vez que a massa média dos comprimidos é cerca de 2 vezes a massa de levodopa e benserazida presente, nenhum dos excipientes está presente numa concentração capaz de causar interferência.

9.4.4 Análise de formulações farmacêuticas

Com o objectivo de avaliar o desempenho da metodologia desenvolvida, o sistema de fluxo multi-impulsão descrito foi aplicado na análise de formulações farmacêuticas contendo benserazida e levodopa, disponíveis no mercado português.

As soluções das diferentes amostras foram preparadas, a partir das formulações em estudo, como referido na secção Experimental deste capítulo e posteriormente analisadas no sistema de fluxo multi-impulsão optimizado, sendo os dados obtidos processados pelo modelo de rede neuronal optimizado.

Com o objectivo de confirmar os resultados obtidos e na ausência de método de referência, foram efectuados ensaios de recuperação, adicionando a cada amostra 5 e 7,5 mg l^{-1} de levodopa e benserazida. As amostras adicionadas de padrão eram depois analisadas pela metodologia optimizada. Os resultados da análise das amostras e dos ensaios de recuperação estão esquematizados na Tabela 9.4, tendo-se obtido valores de recuperação entre 92 e 102 %.

Tabela 9.4 – Resultados da análise das amostras e dos ensaios de recuperação.

Formulação farmacêutica (lote)	Princípio activo	Concentração declarada (mg/formulação)	Concentração encontrada (mg/formulação)	Recuperação (%)	
				5 mg l^{-1}	7,5 mg l^{-1}
Madopar 05JQ083	Levodopa	200	211,80 ± 24,73	97	97
	Benserazida	50	47,29 ± 2,44	92	96
Madopar 06AQ059	Levodopa	200	213,60 ± 22,22	102	100
	Benserazida	50	50,62 ± 3,03	94	98
Madopar 05FQ009	Levodopa	200	214,60 ± 22,30	96	96
	Benserazida	50	49,22 ± 2,89	97	96

9.5 Conclusões

Pela primeira vez foi proposta uma metodologia para a determinação simultânea de levodopa e benserazida com detecção por quimiluminescência.

Foi desenvolvido um sistema de fluxo multi-impulsão combinado com calibração por rede neuronal artificial, o qual foi aplicado com sucesso à determinação simultânea de benserazida e levodopa em formulações farmacêuticas sem separação prévia.

A versatilidade e automatização do sistema de fluxo desenvolvido possibilitaram a fácil implementação da estratégia de paragem de fluxo de forma reprodutível permitindo a obtenção dos perfis de quimiluminescência usados nos modelos quimiométricos.

Os métodos quimiométricos aplicados foram a regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) e as redes neuronais artificiais, para efectuar a determinação simultânea de levodopa e de benserazida, obtendo-se melhores resultados com as redes neuronais uma vez que a relação entre a levodopa e a emissão de radiação é não linear.

Este trabalho demonstra as possibilidades da combinação da calibração por rede neuronal artificial com os métodos quimiluminométricos e também como os métodos quimiluminométricos podem ser usados para a determinação simultânea de vários analitos na mesma amostra.

O procedimento proposto é sensível, simples, preciso, robusto, e de fácil operação, constituindo uma alternativa aos escassos métodos disponíveis para a determinação simultânea de levodopa e benserazida.

Comparando com as metodologias de fluxo [24,25] existentes para a determinação simultânea de benserazida e levodopa, a metodologia proposta é mais rápida, com um ritmo de amostragem de cerca de 28 amostras por hora. Além disso apresenta um baixo consumo de reagente e gera um volume reduzido de efluentes. De facto eram gastos por determinação cerca de 4,3 μg de luminol e gerava-se cerca de 0,5 ml de efluente.

9.6 Referências bibliográficas

[1] Martindale, The Complete Drug Reference, 33rd ed. Pharmaceutical Press, p. 1169, 1164.

[2] Y. Michotte, M. Moors, D. Deleu, P. Herregodts, G. Ebinger, J. Pharm. Biomed. Anal. 5 (1987) 659.

[3] A. Tolokán, I. Klebovich, K. Balogh-Nemes, G. Horvai, J. Chromatogr. B 698 (1997) 201.

[4] F. Blandini, E. Martignoni, C. Pacchetti, S. Desideri, D. Rivellini, G. Nappi, J. Chromatogr. B 700 (1997) 278.

[5] C.A. Georgiou, M.A. Koupparis, T.P. Hadjiioannou, Talanta 38 (1991) 689.

[6] B.A. Hasan, K.D. Khalaf, M. De la Guardia, Talanta 42 (1995) 627.

[7] M.I.H. Helaleh, N. Rahman, E.S.M. Abu-Nameh, Anal. Sci. 13 (1997) 1007.

[8] O. Fatibello-Filho, I.C. Vieira, Analyst 122 (1997) 345.

[9] P. Naraja, K.C.S. Murthy, K.S. Rangappa, N.M.M. Gowda, Talanta 46 (1998) 39.

[10] L.H. Marcolino-Júnior, M.F.S. Teixeira, A.V. Pereira, O. Fatibello-Filho, J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 393.

[11] P.C. Damiani, A.C. Moschetti, A.J. Rovetto, F. Benavente, A.C. Olivieri, Anal. Chim. Acta 543 (2005) 192.

[12] C. Martínez-Lozano, T. Pérez-Ruiz, V. Tomás, O. Val, Analyst 116 (1991) 857.

[13] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez_lozano, V. Tomás, O. Val, Talanta 40 (1993) 1625.

[14] X. Chen, J. Zhang, H. Zhai, X. Chen, Z. Hu, Food Chem. 92 (2005) 381.

[15] L. Zhang, G. Chen, Q. Hu, Y. Fang, Anal. Chim. Acta 431 (2001) 287.

[16] S.S. Badawy, Y.M. Issa, A.S. Tag-Eldin, Electroanalysis 8 (1996) 1060.

[17] E.M. Garrido, J.L.F.C. Lima, C. Delerue-Matos, J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) 845.

[18] N.T. Deftereos, A.C. Calokerinos, C.E. Efstathiou, Analyst 118 (1993) 627.

[19] J.C. Huang, C.X. Zhang, Z.J. Zhang, Chinese J. Anal. Chem. 27 (1999) 41.

[20] O. Nozaki, T. Iwaeda, H. Moriyama, Y. Kato, Luminescence 14 (1999) 123.

[21] A.G. Davidson, J. Pharm. Biomed. Anal. 3 (1985) 235.

[22] S.T. Hassib, Anal. Lett. 23 (1990) 2195.

[23] B. Uslu, S.A. Özkan, Anal. Lett. 35 (2002) 303.

[24] J. Karpińska, J. Smyk, E. Wolyniec, Spectr. Acta A 62 (2005) 213.

[25] M. Pistonesi, M.E. Centurión, B.S.F. Band, P.C. Damiani, A.C. Olivieri, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 541.

[26] J. Coello, S. Maspoch, N. Villegas, Talanta 53 (2000) 627.

[27] S. Fanali, V. Pucci, C. Sabbioni, M.A. Raggi, Electrophoresis 21 (2000) 2432.

[28] M. Blanco, I. Valverde, J. Pharm. Biomed. Anal. 31 (2003) 431.

[29] J.V. Samsonova, M.Y. Rubtsova, A.V. Kiseleva, A.A. Ezhov, A.M. Egorov, Biosens. Bioelectr. 14 (1999) 273.

[30] J.S. Shen, X.S. Zang, S.W. Li, X.R. Li, American Laboratory 35 (2003) 14.

[31] B. Li, Y. He, J. Lv, Z. Zhang, Anal. Bioanal. Chem. 383 (2005) 817.

[32] H. Martens, T. Naes, Multivariate Calibration, John Wiley and Sons, UK, 1992.

[33] P. Nomikos, J. MacGregor, Technometrics 37 (1995) 41.

[34] P. Geladi, B. Kowalsky, Anal. Chim. Acta 185 (1986) 1.

[35] I.S. Helland, Commun. Statist. Simulation 17 (1988) 581.

[36] D. Massart, B. Vandeginste, S. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, Chemometrics: a textbook, Elsevier, Amsterdam, 1988.

[37] M. Denham, J. Chemom. 11 (1997) 39.

[38] J.A. Lopes and J.C. Menezes, Chemom. Intell. Lab Syst. 68 (2003) 75.

[39] M. Hagan, H. Demuth and M. Beale, Neural Network Design, PWS Publishing, Boston, USA, 1996.

[40] K. S. Booksh, B.R. Kowalski, Anal. Chem. 66 (1994) 782.

CAPÍTULO 10

Conclusões finais

10. Conclusões finais

O trabalho realizado no âmbito desta dissertação de doutoramento visou a implementação de metodologias analíticas automáticas baseadas em sistemas de fluxo multicomutado ou multi-impulsão explorando as potencialidades da sua aplicação à detecção por quimiluminescência.

O desenvolvimento e aplicação analítica das montagens apresentadas, permitiram reforçar a ideia de grande versatilidade e robustez associada às técnicas de multicomutação e multi-impulsão.

As metodologias desenvolvidas com base na multicomutação permitiram comprovar que a elevada direccionalidade da rede de fluxo, característica deste tipo de sistema, facilita a gestão de amostras e reagentes, abrindo inúmeras possibilidades em termos de manipulação da zona de amostra. Este facto encontra-se particularmente evidenciado na metodologia desenvolvida para a determinação de clomipramina, em que a utilização das válvulas solenóides permitiu implementar todo o procedimento analítico usando apenas uma bomba de pistão para a propulsão das soluções, o que facilitou a automatização do sistema.

No que diz respeito à técnica de fluxo multi-impulsão, foi pela primeira vez associada à determinação por quimiluminescência, no trabalho apresentado nesta dissertação. O uso de microbombas solenóides como único elemento activo confere elevada versatilidade ao sistema de fluxo e facilita o controlo de todo o sistema.

As características hidrodinâmicas do fluxo pulsado permitiram uma mistura entre amostra e reagentes mais eficiente, mesmo em condições de dispersão limitada, facilitando o desenvolvimento da reacção. Esta situação é particularmente vantajosa para a quimiluminescência, uma vez que o sinal analítico resulta da emissão de radiação originada pela mistura entre amostra e reagentes na entrada da célula de fluxo.

A elevada capacidade de mistura dos sistemas de fluxo multi-impulsão foi confirmada pelos resultados obtidos na determinação de fluoxetina, em que a mistura rápida e eficaz permitiu a redução dos reactores ao mínimo necessário para efectuar a ligação entre os diferentes componentes da montagem.

A versatilidade da multi-impulsão possibilitou ainda a implementação da estratégia de paragem de fluxo de forma simples e reprodutível, permitindo a determinação simultânea de levodopa e benserazida sem a necessidade de separação prévia, através da obtenção dos perfis dos sinais de quimiluminescência.

As metodologias propostas proporcionam um controlo versátil sobre o processo de inserção da amostra, dado que a utilização de uma amostragem com base de tempo como é normal nas determinações por multicomutação, ou com base no número de pulsos característica da multi-impulsão, permite a inserção reprodutível de alíquotas de amostra com volumes variáveis, possibilitando a manipulação da dispersão em função do volume amostrado.

A possibilidade da implementação de amostragem binária, baseada na intercalação de pequenas alíquotas de amostra e reagente, permite uma mistura mais eficiente das soluções, o que resulta numa mais rápida homogeneização da zona de reacção favorecendo o seu desenvolvimento.

De uma forma geral os sistemas desenvolvidos são simples, de fácil operação e permitem realizar de forma automática todas as tarefas analíticas, incluindo a adição de reagentes e a medição do sinal analítico, aspectos importantes para atingir a precisão e exactidão requeridas, deste modo as metodologias propostas estão menos sujeitas à intervenção do operador e a todos os erros associados a esta intervenção.

O controlo computorizado dos sistemas de fluxo desenvolvidos acrescenta-lhes flexibilidade, permitindo a fácil alteração das condições de análise sem reconfiguração

física dos sistemas. Assim, sistemas com estas características podem ser aplicados na análise de diferentes espécies e distintos tipos de amostra, com base em reacções diversas e envolvendo uma gama alargada de intervenções sobre a zona de amostra, sem que para isso seja necessário alterar a configuração do sistema analítico, bastando apenas alterar a temporização das válvulas que o compõem, no caso de um sistema multicomutado, ou das microbombas solenóides no caso de um sistema multi-impulsão. Esta flexibilidade é evidenciada no trabalho referente à avaliação da actividade antioxidante, em que o sistema proposto exibe uma fácil adaptação às exigências das diferentes reacções de quimiluminescência. De facto para realizar o procedimento envolvendo o luminol e o procedimento envolvendo a lucigenina, a única alteração física necessária foi a alteração do reactor.

Outro atributo das metodologias desenvolvidas é o baixo consumo de reagentes. Efectivamente, a adição sincronizada dos reagentes à zona de amostra, inserindo no percurso analítico apenas a quantidade de reagente necessária ao desenvolvimento da reacção resulta numa redução do consumo dos reagentes e consequente redução do volume de efluentes gerados.

Além da automatização das determinações quimiluminométricas recorrendo às técnicas de fluxo referidas anteriormente, pretendeu-se também aplicar este tipo de detecção a substâncias para as quais as metodologias analíticas por quimiluminescência eram escassas ou não se encontravam descritas na literatura, como foi o caso da fluoxetina, do carvedilol e da benserazida, para as quais foi aplicada a detecção quimiluminométrica pela primeira vez.

As metodologias desenvolvidas demonstraram ser sensíveis e precisas, os estudos de avaliação da reprodutibilidade, efectuados nos sistemas desenvolvidos, revelaram

valores de desvio padrão inferiores a cerca de 2%, demonstrando um comportamento satisfatório em todas as situações estudadas.

Os resultados obtidos, por aplicação das metodologias desenvolvidas a amostras de formulações farmacêuticas, foram em todos os casos estatisticamente comparáveis aos fornecidos por métodos de referência, quando estes existiam. Quando se recorreu à avaliação da qualidade dos resultados implementando ensaios de recuperação, os resultados foram de igual forma adequados ao controlo de formulações farmacêuticas. Este facto demonstra que a quimiluminescência é uma técnica válida para a análise de produtos farmacêuticos, o que é reforçado pela limitada interferência das substâncias normalmente utilizadas como excipientes.

As metodologias desenvolvidas para a determinação de produtos farmacêuticos demonstraram ser alternativas vantajosas comparativamente com as metodologias normalmente propostas e recomendadas pelas diferentes Farmacopeias, as quais são geralmente laboriosas e demoradas, envolvendo por vezes a utilização de reagentes de difícil manuseamento, ou então requerem equipamento dispendioso, como no caso das metodologias de referência que recorrem ao HPLC. Pelo contrário as metodologias de fluxo propostas apresentavam uma configuração simples, grande versatilidade e flexibilidade tendo-se adaptado aos objectivos analíticos para que foram idealizadas. Além disso, confirmaram que as técnicas de fluxo multicomutação e multi-impulsão podem ser utilizadas com vantagem na implementação de metodologias analíticas automáticas, simples, de baixo custo, versáteis, eficientes e com ritmos de amostragem adequados à rotina laboratorial da área farmacêutica.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA