

**João Luís Machado dos Santos**

Licenciado em Ciências Farmacêuticas

**SISTEMAS DE FLUXO MULTICOMUTADO  
APLICADOS À ANÁLISE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS**

**Universidade do Porto**

**Faculdade de Farmácia**

**PORTO, 2000**

**João Luís Machado dos Santos**  
Licenciado em Ciências Farmacêuticas

**SISTEMAS DE FLUXO MULTICOMUTADO**  
**APLICADOS À ANÁLISE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS**

**Universidade do Porto**  
**Faculdade de Farmácia**  
**PORTO, 2000**

**Dissertação de candidatura ao grau de Doutor  
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**

**Trabalho realizado no Serviço de  
Química-Física da Faculdade de  
Farmácia da Universidade do Porto**

## RESUMO

Desenvolveram-se metodologias analíticas automáticas baseadas em sistemas de fluxo multicomutado, as quais foram aplicadas na análise de produtos de interesse farmacêutico. As montagens de fluxo implementadas possibilitaram diferentes formas de intervenção sobre a zona de amostra, incluindo a sua diluição, recirculação e paragem, permitindo avaliar o desempenho da multicomutação em distintas situações analíticas.

Implementou-se um procedimento analítico para determinação de ácido fólico, baseado na detecção fluorimétrica dos produtos formados por fotodegradação deste composto. O controlo temporizado do volume de amostragem permitiu adequar o nível de dispersão da amostra em função da sua concentração e do intervalo operacional do detector.

Foi igualmente concebida uma nova estratégia para eliminação do efeito *Schlieren* baseada na supressão dos gradientes de concentração, o que foi conseguido através do processamento em linha da solução transportadora, conferindo-lhe um perfil de concentração semelhante ao da zona de amostra. Esta estratégia foi implementada na determinação de pindolol por complexação com o catião ferro(III).

Aproveitando a elevada versatilidade operacional proporcionada pela multicomutação, desenvolveu-se um sistema de fluxo para recirculação da zona de amostra, possibilitando a diluição contínua da amostra, a renovação da interface amostra/reagente e a realização de multidetecções, para aplicação na determinação espectrofotométrica de cloreto em soluções parenterais.

Foi também implementado um sistema analítico para determinação fluorimétrica indirecta de isoniazida, capaz de produção de elevados valores de diluição através da utilização de uma estratégia de amostragem de zonas, o qual foi igualmente aplicado em ensaios de dissolução de comprimidos.

---

Combinando a amostragem binária com uma dupla paragem de fluxo, desenvolveu-se um sistema de fluxo multicomutado possibilitando a análise simultânea de duas amostra com uma superior sensibilidade, o qual foi aplicado na determinação espectrofotométrica de amiloride.

Avaliou-se o efeito interferentes de alguns compostos normalmente usados como excipientes na preparação das formulações farmacêuticas, com o objectivo de verificar se a extensão deste efeito era impeditiva de aplicação das metodologias desenvolvidas na análise de produtos farmacêuticas.

A validação dos sistemas analíticos desenvolvidos foi efectuada por avaliação comparativa dos resultados obtidos relativamente aos fornecidos pelos métodos de referência recomendados pelas Farmacopeias.

---

## **ABSTRACT**

Automatic analytical methodologies based on multicommutated flow systems were developed and applied in the analysis of pharmaceutical products. The implemented flow manifolds enabled different forms of intervention on the sample zone including its dilution, recirculation and stopping, which provided the means for the evaluation of multicommutation performance during distinct analytical situations.

An analytical procedure for the determination of folic acid by fluorimetry following photodegradation was implemented. A time-based control of the sample volume provided sample dispersion in compliance with the sample concentration and the detector's working range.

A new strategy for Schlieren effect compensation, based on the suppression of concentration gradients, through the utilisation of a carrier solution processed on-line with a concentration profile matching the sample zone, was developed and implemented for the spectrophotometric determination of pindolol by complexation with Fe(III).

As a result of the high operational versatility provided by multicommutation a sample recirculating flow system enabling a continuous sample dilution, renewal of the sample/reagent interface and multidetections was developed and applied in the spectrophotometric determination of chloride in parenteral solutions.

An analytical system for the indirect fluorimetric determination of isoniazid, which produced high level dilutions upon the utilisation of a sampling zone strategy, was implemented and applied in tablets dissolution studies.

By combining binary sampling with a dual stopped-flow strategy a multicommutated flow system enabling the simultaneous analysis of two samples, with an increased sensitivity, was developed for the spectrophotometric determination of amiloride.

The interferent effect of several compounds, commonly used as excipients in pharmaceutical formulations, was assessed in order to determine if its extension was

---

enough high to prevent the application of the developed methodology in the analysis of pharmaceuticals.

The validation of the developed analytical systems was carried out by comparing the obtained results with those furnished by the reference methodologies recommended by different Pharmacopoeia.

---

## **Résumé**

On a développé des méthodologies d'analyse automatiques en utilisant des systèmes de flux avec multicommutation. Ces systèmes ont été appliqués dans l'analyse des préparations pharmaceutiques. Les montages de flux accomplis ont permis différentes formes d'intervention sur l'échantillon comme la dilution, recirculation et arrêt, en permettant d'évaluer l'accomplissement de la multicommutation en distinctes situations analytiques.

On a aussi implémenté un procédé analytique pour la détermination de l'acide folique, qui était basé sur la détection fluorimétrique des produits de photodégradation de ce composé. Le contrôle temporisé du volume d'échantillonnage a permis l'adéquation du niveau de dispersion de l'échantillon en face de la concentration et du intervalle opérationnel du détecteur.

Une nouvelle stratégie pour l'élimination de l'effet Schlieren, qui était basé sur la suppression des différences de concentration, a été développée par la production on-line de la solution de transport. De cette façon, le profil de concentration de l'échantillon équivalait celui de la solution de transport. Cette stratégie a été appliquée dans la détermination du pindolol par complexation avec Fe(III).

On a tiré profit de la grande versatilité de la multicommutation pour développer un système de recirculation de l'échantillon et obtenir des grandes dilutions, rénovation de l'interface de réaction et multidétections, pour la détermination spectrophotométrique du chlorure en solutions injectables de grand volume.

Un système analytique avec détection fluorimétrique a été développé pour la détermination indirecte de l'isoniazide. Ce système était capable de produire des niveaux très hauts de dilution par échantillonnage de zone, et a été aussi appliqué en essais de dissolution de comprimés.

---

Un utilisant simultanément l'échantillonnage binaire et un arrêt du flux on a développé un système multicommuté en permettant l'analyse simultanée de deux échantillons avec une sensibilité augmentée. Ce système a été appliqué dans la détermination spectrophotométrique de l'amiloride.

On a évalué l'effet interférent de quelques composés qui sont utilisés comme excipients dans la préparation des formules pharmaceutiques, avec le propos de vérifier si l'extension de ce effet était suffisant pour éviter l'utilisation des méthodologies dans l'analyse des produits pharmaceutiques.

La validation des systèmes analytiques a été accomplis par évaluation des résultats obtenus en comparaison avec ceux fournis par les méthodes de référence.

---

---

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter aceite como membro do seu corpo docente, e em especial ao Serviço de Química-Física, pelos meios que me disponibilizou.

À Direcção-Geral do Ensino Superior, pela Bolsa de Doutoramento concedida no âmbito da acção PRODEP 5.2/N/264.003.

Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima pela supervisão e orientação durante todo este trabalho. E também pelo modo franco e amigo como sempre me tratou, e pela força e palavras de incentivo com que sempre me apoiou.

Ao Rui Lapa, co-supervisor, co-orientador, co-panheiro, co-lega, co-parsa, co-fidente, co-laborador, co-ligante, co-frade, co-mensal, co-mentarista, co-mezainista, co-morante, co-mandita, co-pulsório e do...co-ntra!

A todos os amigos cá do sítio (Conceição, Salette, Lúcia, Beatriz, Agostinho Alberto, Isabel Cardoso) d'aquém (Paula e Eulália) e além-mar (Boa, Zagatto, Carlos, Patrícia e muitos outros...) por todo o apoio, amizade, conversas, longas conversas e por inestimáveis ajudas. E também à Sra. Teresa e Belmira e todo o restante pessoal do departamento (colegas de aventura e companheiros de viagem) que têm aturado as minhas birras, palmadas nas costas, empurrões e demais actos de violência, numa salutar demonstração de amizade.

A todos os meus amigos doutras lutas, que comigo se "bateram" por causas também elas justas.

E finalmente aos meus pais, a quem tudo devo, pelo amor, carinho e todas aquelas coisas...de pais.

E à Teresa, ao João e ao Luís...isto é um bocadinho deles...o resto já eles sabem!

Muito obrigado!

---

**ÍNDICE**

---

<b>Organização da dissertação</b>	I
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Introdução Geral</b>	
1.1. Metodologias analíticas automáticas	1-2
1.1.1. Conceitos gerais	1-2
1.1.2. Automação e automatização	1-3
1.1.3. Métodos de fluxo	1-6
1.2. Métodos de fluxo contínuo	1-7
1.2.1. Análise por injeção em fluxo (FIA)	1-9
1.2.2. Análise por injeção sequencial (SIA)	1-11
1.2.3. Multicomutação	1-13
1.2.3.1. Evolução da multicomutação	1-18
1.3. Metodologias analíticas automáticas para análise de produtos farmacêuticos	1-30
1.4. Referências	1-32
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Parte Experimental</b>	
2.1. Reagentes e soluções	2-2
2.2. Equipamento e instrumentação	2-2
2.2.1. Montagens de fluxo multicomutado	2-3
2.2.1.1. Sistemas de propulsão e transporte	2-4
2.2.1.2. Sistemas de inserção	2-6

---

---

2.2.1.2.1. Válvulas solenóides	2-6
2.2.1.2.2. Válvulas pneumáticas	2-9
2.2.1.3. Sistemas de detecção	2-10
2.2.1.4. Sistema de controlo	2-11
2.2.1.4.1. Aparelhagem	2-11
2.2.1.4.2. Software	2-12
2.2.1.5. Optimização e avaliação das montagens de fluxo	2-15
2.3. Métodos de referência	2-17
2.4. Preparação das amostras	2-17
2.5. Referências	2-18

### **Capítulo 3**

#### **Determinação fluorimétrica de ácido fólico**

3.1. Introdução	3-2
3.1.1. Caracterização do ácido fólico	3-2
3.1.1.1. Actividade	3-4
3.1.1.1.1. Função Bioquímica	3-4
3.1.1.1.2. Sintomas de carência	3-5
3.1.1.2. Indicações terapêuticas	3-5
3.1.2. Métodos de análise	3-6
3.1.3. Reacções fotoquímicas	3-8
3.1.4. Objectivos	3-10
3.2. Parte experimental	3-10
3.2.1. Reagentes e soluções	3-10
3.2.2. Equipamento	3-11
3.2.3. Montagem de fluxo multicomutado	3-12
3.2.4. Método de referência	3-16

---

---

3.3.Resultados e sua discussão	3-16
3.3.1.Otimização da montagem de fluxo	3-19
3.3.2.Análise de preparações farmacêuticas	3-28
3.4.Conclusões	3-29
3.5.Referências	3-31

## **Capítulo 4**

### **Determinação espectrofotométrica de pindolol com compensação do efeito Schlieren**

4.1.Introdução	4-2
4.1.1.Caracterização do pindolol	4-2
4.1.1.1.Actividade	4-3
4.1.1.2.Indicações terapêuticas	4-3
4.1.2.Métodos de análise	4-4
4.1.3.Efeito Schlieren	4-5
4.1.4.Objectivo	4-9
4.2.Parte experimental	4-10
4.2.1.Reagentes e soluções	4-10
4.2.2.Equipamento	4-10
4.2.3.Montagem de fluxo multicomutado	4-11
4.2.4.Método de referência	4-14
4.3.Resultados e sua discussão	4-15
4.3.1.Eliminação do efeito Schlieren	4-15
4.3.2.Otimização da montagem de fluxo	4-21
4.3.3.Análise de preparações farmacêuticas	4-27
4.4.Conclusões	4-31
4.5.Referências	4-33

---

---

**Capítulo 5****Determinação espectrofotométrica de cloreto  
com recirculação da zona de amostra**

5.1. Introdução	5-2
5.1.1. Caracterização do anião cloreto	5-2
5.1.2. Métodos de análise	5-3
5.1.3. Multidetecção	5-4
5.1.4. Objectivo	5-8
5.2. Parte experimental	5-9
5.2.1. Reagentes e soluções	5-9
5.2.2. Equipamento	5-9
5.2.3. Montagem de fluxo multicomutado	5-10
5.2.4. Método de referência	5-14
5.3. Resultados e sua discussão	5-14
5.3.1. Desenvolvimento e optimização da montagem de fluxo	5-16
5.3.2. Análise de preparações farmacêuticas	5-30
5.4. Conclusões	5-32
5.5. Referências	5-34

**Capítulo 6****Determinação fluorimétrica de isoniazida  
com aplicação em ensaios de dissolução**

6.1. Introdução	6-2
6.1.1. Caracterização da isoniazida	6-2
6.1.1.1. Actividade	6-3
6.1.1.2. Indicações terapêuticas	6-4
6.1.2. Métodos de análise	6-4

---

---

6.1.3. Diluição em linha em sistemas de fluxo contínuo	6-6
6.1.4. Ensaio de dissolução	6-9
6.1.5. Objectivo	6-11
6.2. Parte experimental	6-12
6.2.1. Reagentes e soluções	6-12
6.2.2. Equipamento	6-13
6.2.3. Montagem de fluxo multicomutado	6-13
6.2.4. Método de análise	6-17
6.3. Resultados e sua discussão	6-17
6.3.1. Optimização da montagem de fluxo	6-18
6.3.2. Estudo de interferências	6-26
6.3.3. Análise de preparações farmacêuticas	6-27
6.3.4. Ensaio de dissolução de comprimidos contendo isoniazida	6-29
6.4. Conclusões	6-33
6.5. Referências	6-34

## **Capítulo 7**

### **Determinação espectrofotométrica de amiloride com dupla paragem de fluxo**

7.1. Introdução	7-2
7.1.1. Caracterização do amiloride	7-2
7.1.1.1. Actividade	7-3
7.1.1.2. Indicações terapêuticas	7-3
7.1.2. Métodos de análise	7-4
7.1.3. A paragem de fluxo como estratégia analítica	7-5
7.1.4. Objectivo	7-8
7.2. Parte experimental	7-9

---

7.2.1.Reagentes e soluções	7-9
7.2.2.Equipamento	7-9
7.2.3.Montagem de fluxo multicomutado	7-10
7.2.4.Método de referência	7-12
7.3.Resultados e sua discussão	7-13
7.3.1.Otimização da montagem de fluxo	7-14
7.3.2.Estudo de interferências	7-25
7.3.3.Análise de preparações farmacêuticas	7-28
7.4.Conclusões	7-29
7.5.Referências	7-31
<b>Capítulo 8</b>	
<b>Conclusões finais</b>	8-1

---

## **ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO**

Esta dissertação está organizada por capítulos, num total de oito.

No Capítulo 1 efectuou-se o enquadramento do trabalho desenvolvido, na perspectiva da crescente importância que as metodologias analíticas automáticas assumem em termos de laboratórios de análise, e do papel preponderante que as técnicas de fluxo desempenham na sua implementação. Em concordância é também efectuada uma análise comparativa das características relevantes das técnicas de fluxo mais divulgadas: a análise por injeção em fluxo (FIA), análise por injeção sequencial (SIA) e multicomutação. Sendo a multicomutação a técnica utilizada para implementação das metodologias desenvolvidas, é igualmente efectuada uma avaliação da sua evolução, no que diz respeito aos trabalhos publicados e às estratégias analíticas propostas.

No Capítulo 2 são referidos os aspectos comuns dos trabalhos desenvolvidos, como sejam os que dizem respeito à preparação das soluções e instrumentação utilizada, assim como ao equipamento envolvido na concepção e implementação das montagens de fluxo, com ênfase especial nas válvulas de inserção.

Entre os Capítulos 3 e 7 são abordados os trabalhos desenvolvidos os quais, em função dos objectivos inicialmente considerados, apresentam novas perspectivas analíticas que permitem demonstrar as potencialidades da multicomutação, aplicadas na análise de produtos farmacêuticos. Estes Capítulos estão organizados de forma a colocar em evidência o tipo de estratégia analítica a implementar, fazendo uma avaliação de propostas similares já disponíveis na literatura. Caracteriza-se igualmente o fármaco que será objecto da análise pela metodologia desenvolvida, incluindo a referência a outras metodologias analíticas anteriormente apresentadas. São também referidos os aspectos mais particulares da parte experimental de cada um dos trabalhos desenvolvidos, nomeadamente no que diz respeito à concepção e implementação das montagens de fluxo, preparação das soluções e métodos de referência. São depois descritas, de forma

detalhada, as diferentes fases de desenvolvimento dos trabalhos sendo apresentados os resultados obtidos, tanto pela metodologia proposta como pela metodologia de referência. Finalmente, são referidos os aspectos mais relevantes do trabalho desenvolvido e as respectivas conclusões.

Fazendo uma análise mais detalhada, no Capítulo 3 são abordadas as reacções fotoquímicas e as vantagens da sua utilização como estratégia analítica. Este tipo de reacção é implementada num sistema de fluxo multicomutado para determinação fluorimétrica de ácido fólico. Salienta-se também o potencial da amostragem temporizada em termos do controlo do nível de diluição da zona de amostra

No Capítulo 4 refere-se a utilização de cationes metálicos como agentes de desenvolvimento de cor e os problemas resultantes da existência de elevados gradientes de índice de refração, que se manifestam pelo efeito Schlieren, sendo referidas as estratégias normalmente empregues na sua compensação. Neste capítulo é descrito o desenvolvimento de um sistema de fluxo multicomutado para determinação espectrofotométrica de pindolol por complexação com o Fe(III) envolvendo amostragem binária e eliminação do efeito Schlieren.

A execução de multideteccções é abordada no Capítulo 5 sendo proposta uma montagem de fluxo para recirculação da zona de amostra a qual é avaliada na determinação de cloreto em soluções parenterais. São analisadas as potencialidades da multideteccção e a capacidade evidenciada pelo sistema de fluxo proposto para produzir elevados valores de diluição.

No Capítulo 6 são discutidas as estratégias que, em sistemas de fluxo, permitem a diluição on-line da zona de amostra, sendo proposta uma metodologia de elevada sensibilidade para determinação fluorimétrica de isoniazida, a qual, com base na amostragem de zonas permite também a obtenção de elevados valores de diluição como o comprova a sua aplicação em ensaios de dissolução de comprimidos de isoniazida.

No Capítulo 7 é referida a utilização da amostragem binária em combinação com uma paragem de fluxo, abordada em pormenor neste capítulo, na concepção e implementação de um sistema de fluxo multicomutado para determinação espectrofotométrica de amiloride.

Por fim, no Capítulo 8 é feita uma súmula e uma avaliação geral do trabalho desenvolvido, sendo salientados os seus aspectos mais relevantes, e apresentadas as conclusões gerais.

# **CAPÍTULO 1**

---

## ***INTRODUÇÃO GERAL***

As metodologias analíticas automáticas assumem um papel cada vez mais importante nos laboratórios de análise. As técnicas de fluxo, caracterizadas por uma grande flexibilidade, versatilidade e facilidade de automatização, proporcionam o desenvolvimento e implementação de uma ampla gama de sistemas analíticos, os quais são capazes de um conjunto alargado de formas de manipulação da amostra, em condições de elevada reprodutibilidade. Sendo a multicomutação uma das técnicas de fluxo mais recentes, apresenta no entanto características operacionais que a confirmam como uma ferramenta ideal para a automatização de procedimentos analíticos.

## 1.1. Metodologias analíticas automáticas

### 1.1.1. Conceitos gerais

Nos últimos anos tem vindo a acentuar-se o recurso a procedimentos analíticos, o que em conjunto com a procura de métodos de análise mais eficientes e a expansão da capacidade e desempenho da instrumentação disponível, devido à electrónica e à computação, veio impulsionar de forma decisiva a implementação de metodologias analíticas automáticas.

O progresso tecnológico registado nos últimos anos tem possibilitado a concepção e desenvolvimento de equipamento mais versátil, proporcionando um conjunto alargado de recursos e módulos diversos, os quais permitem simplificar a configuração e implementação de sistemas automáticos de análise.

Áreas tão diversas como a análise clínica e ambiental, e também a análise farmacêutica e alimentar, onde o controlo final de qualidade e o controlo *on-line* assumem uma importância fundamental na monitorização da eficiência e qualidade dos processos produtivos, testemunharam o emergir de novos procedimentos automáticos, os quais possibilitaram a atenuação ou eliminação de todo um conjunto de factores limitantes do desempenho dos processos analíticos. Este desenvolvimento foi conseguido através da implementação de novas metodologias e estratégias analíticas, permitindo a análise de elevado número de amostras, a redução da exposição do operador a amostras perigosas, a eliminação de erros associados ao factor humano, uma elevada eficiência analítica, em termos de qualidade e custo dos resultados, e a maximização do desempenho do equipamento disponível.

Sendo os aspectos económicos uma das principais motivações para a opção por metodologias automáticas, são também de realçar os benefícios adicionais daí resultantes, sobretudo no que concerne à qualidade dos resultados e ao aumento do potencial analítico

dos métodos usados. De facto, e no que diz respeito aos métodos convencionais, existe uma grande dependência da qualidade e eficiência da análise em relação à manipulação da amostra, à qual estão associados inúmeros aspectos negativos. De entre estes há a destacar uma diminuição da precisão, a necessidade de volumes elevados de amostra e um aumento significativo do tempo dedicado pelo operador à execução da análise.

A possibilidade de controlo automático, de forma precisa e efectiva, dos parâmetros analíticos que condicionam uma análise, proporciona a obtenção de resultados mais exactos e precisos, de forma mais rápida e segura. Permite deste modo implementar métodos baseados em reacções incompletas assim como métodos cinéticos, ou melhorar o desempenho em situações em que a espécie a determinar é instável, ou quando a recuperação da espécie é incompleta, como acontece no caso de extracções ou diálises.

#### *1.1.2. Automação e automatização*

A crescente implantação dos métodos automáticos de análise, acarretou uma cada vez mais generalizada utilização de expressões como automação, automatização, instrumentação, mecanização, entre outras, o que obrigou a um esforço de normalização por parte da Comissão para a Nomenclatura Analítica da IUPAC com vista à obtenção de uma uniformidade de critérios e definições, facilitando as relações nos domínios da técnica e da indústria [1].

De acordo com os critérios estabelecidos, o conceito de automação está associado com sistemas (instrumentos) aos quais é adicionado um componente de decisão, sem intervenção humana. Mais concretamente, a automação é definida como o uso de uma combinação de mecanismos e/ou instrumentos para substituir, refinar, estender ou complementar um esforço humano, na realização de uma determinada tarefa em que pelo menos uma das operações envolvidas é controlada, sem intervenção humana, através de um sistema de retroalimentação. Um sistema de retroalimentação é definido como um

mecanismo instrumental combinando elementos sensores e actuadores, os quais podem alterar o modelo de realização de determinada tarefa.

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

i) *Sistemas automáticos*: sistemas sem capacidade de decisão, portanto sem sistema de retroalimentação, em que determinadas acções, incluídas num conjunto mais ou menos alargado de operações, são realizadas sequencialmente e de forma repetitiva, sem intervenção humana.

ii) *Sistemas automatizados*: sistemas que são controlados ou regulados por sistemas de retroalimentação, sem intervenção de um operador. Estes sistemas são autocontrolados, possuindo uma independência de actuação superior à dos sistemas automáticos.

Os sistemas automatizados possuem uma capacidade analítica superior à dos sistemas automáticos devido à possibilidade de actuação autónoma por parte do sistema, actuação essa que poderá funcionar como uma resposta condicionada a objectivos inicialmente programados, a parâmetros analíticos pré-estabelecidos, ou como resultado da análise em tempo real que o sistema efectua ao seu próprio desempenho. Em consequência o sistema poderá tomar decisões que conduzem à imediata introdução de correcções e, eventualmente, à auto-optimização do modelo analítico. Um sistema automatizado ideal implicaria a utilização de dispositivos de controlo interactivos, em que o sistema de controlo interviria de forma associativa, conjugando em interdependência os vários parâmetros disponíveis, o que lhe permitiria apresentar uma versatilidade e uma flexibilidade fundamentais em qualquer procedimento analítico.

Os conceitos de sistema automático e automatizado expostos, apesar de associados a uma classificação genericamente aceite [1], podem por vezes dar origem a situações em que é difícil estabelecer os limites ou a fronteira entre cada um dos tipos de sistema. No decorrer deste trabalho, e apesar da aceitação implícita da referida

classificação, utilizar-se-á indiscriminadamente, e de forma a evitar situações eventualmente ambíguas, a expressão *sistemas automáticos* para caracterizar os sistemas (automáticos ou automatizados) cujo desenvolvimento contribui para minimizar a intervenção humana.

A automatização total ou parcial de um processo analítico, pode ser conseguida recorrendo a diversas estratégias e a distintas metodologias. Apesar de se ter vindo a verificar uma evolução na classificação dos métodos automáticos, surgindo diferentes tendências por vezes pouco consensuais, neste trabalho será adoptada a classificação referida por Valcárcel e Luque de Castro [2]. Assim, os métodos automáticos, vocacionados para a análise de amostras normalmente sob a forma de solução, podem ser divididos, em função do tipo de processamento da amostra, em três categorias: métodos discretos, robotizados e de fluxo. De uma forma resumida estes métodos caracterizam-se por:

i) *Métodos discretos*: são versões mecanizadas de métodos manuais. Nos métodos discretos as amostras são mantidas em recipientes individuais, onde, por acção de um processo mecânico, ocorrem as diferentes etapas que constituem o processo analítico, sendo mantida a integridade da referida amostra.

ii) *Métodos robotizados*: são métodos que envolvem a utilização de um dispositivo, normalmente um braço mecanizado controlado por computador, que mimetiza os procedimentos executados por um operador, sendo os sinais analíticos adquiridos e processados pelo computador. O dispositivo tem a capacidade de desenvolver outras tarefas, além das programadas, com base em rotinas de “aprendizagem” e auto-programação.

iii) *Métodos de fluxo*: são métodos que não implicam a obrigatoriedade do tratamento individualizado da amostra. Pelo contrário, as amostras sofrem processamentos semelhantes, sendo introduzidas sucessivamente no sistema analítico no mesmo ponto,

encontrando reagentes nas mesmas circunstâncias e percorrendo depois um percurso idêntico até à detecção.

Apesar da importância dos métodos discretos, e sobretudo dos métodos robotizados, na implementação e automatização de procedimentos laboratoriais, os métodos de fluxo, especialmente os de fluxo contínuo, serão porventura aqueles que nos anos mais recentes têm sido objecto de maior divulgação e investigação. Esta maior divulgação prende-se fundamentalmente com menores custos 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 analítica e também por uma maior facilidade de operação e controlo, além de um reduzido consumo de amostra, reagentes e tempo de análise. Por estas razões serão aqueles, que no âmbito deste trabalho, serão objecto de uma análise mais detalhada.

### *1.1.3. Métodos de fluxo*

Os métodos de fluxo são, de uma forma geral, baseados na introdução de uma alíquota de amostra num fluxo transportador (que poderá ou não ser um reagente), entrando depois em contacto com um ou mais reagentes e dando origem a uma zona de reacção. Esta é encaminhada até um sistema de detecção onde é produzido um sinal analítico que pode ser relacionado com uma propriedade a ser medida, geralmente a concentração. Os métodos de fluxo podem no entanto funcionar apenas como forma de transporte da alíquota de amostra até ao detector, sem que ocorra qualquer reacção.

Podendo ser esta a definição inicialmente aplicável a todos os métodos de fluxo, a evolução por eles registada posteriormente, nomeadamente o aparecimento de técnicas novas, conduziu a alterações na sua classificação, com a introdução de subgrupos, que tiveram como objectivo harmonizar e simplificar a sua identificação, o que não foi, aparentemente, completamente conseguido. Por isso, adopta-se aqui uma classificação

com base no tipo de fluxo ou escoamento das soluções utilizado, que pretende ser simples e baseada em características facilmente perceptíveis. Deste modo, e estabelecendo como critério de classificação a continuidade espacial e temporal do fluxo, os métodos de fluxo podem dividir-se em métodos de fluxo segmentado, em que o escoamento das soluções é descontinuado no espaço por introdução por exemplo, de bolhas de ar, métodos com paragem de fluxo (*stopped-flow*), em que o escoamento das soluções é descontinuado no tempo através da sua interrupção por intervalos de tempo variáveis, e métodos de fluxo contínuo, em que ocorre um escoamento contínuo, no espaço e no tempo, das soluções.

Os métodos de fluxo contínuo são sem dúvida os mais divulgados, e por isso os mais amplamente aplicados na implementação de metodologias analíticas automáticas, sendo portanto os privilegiados na abordagem, fundamentalmente com o propósito de uma avaliação comparativa, que se pretende efectuar. No entanto é de realçar o inegável valor das técnicas de fluxo segmentado, nomeadamente do fluxo monosegmentado em situações que requerem uma redução da dispersão da amostra, e das técnicas com paragem de fluxo, cada vez mais utilizadas em determinações baseadas em métodos cinéticos.

## **1.2.Métodos de fluxo contínuo**

Os métodos de fluxo contínuo são baseados na inserção da amostra no interior de uma tubagem de reduzidas dimensões, com uma etapa subsequente de transporte segundo um percurso estabelecido, em que a amostra pode estar ou não sujeita a uma ou mais reacções, e finalmente a passagem da zona de amostra por um detector originando um sinal analítico. Desta definição ressaltam os princípios que fundamentam as metodologias de fluxo e em que se destacam a reprodutibilidade do processo de amostragem, a dispersão controlada da zona de amostra, a reprodutibilidade da detecção e

a execução da medida sem que seja necessário atingir condições de equilíbrio, tanto físico como químico.

Sendo as montagens de fluxo sistemas fechados, possibilitam um controlo efectivo das variáveis processuais ao mesmo tempo que limitam a ocorrência de variações pontuais no sistema, como a evaporação de líquidos ou a contaminação de amostras, permitindo uma reprodução das condições da análise, e a criação de um ambiente adequado para a mistura de reagentes e a formação dos produtos de reacção desejados. A sua versatilidade manifesta-se ao nível das amplas possibilidades de actuação sobre o fluxo, como sejam a sua imobilização, divisão, combinação e selecção parcial, enquanto se mantém um perfeito controlo sobre todos os parâmetros, o que permite a utilização de um conjunto extremamente variado de detectores, em condições de elevada reprodutibilidade.

Os componentes fundamentais de uma sistema de fluxo contínuo são:

i) *Sistema de propulsão*: dispositivo responsável pelo movimento (por aspiração ou impulsão), tão constante quanto possível, da zona de amostra e reagentes, e que poderá consistir, por exemplo, numa bomba peristáltica ou numa bomba de pistão.

ii) *Sistema de inserção da amostra*: dispositivo que tem como função a injeção ou inserção do volume de amostra sem que haja necessidade de interrupção do fluxo, e que poderá ser, por exemplo, uma válvula rotativa, um injector-comutador ou um válvula solenóide.

iii) *Sistema de transporte*: sistema constituído por reactores com características diversas, os quais podem estar empacotados com reagentes (por exemplo agentes *redox* ou enzimas imobilizados) ou podem, por exemplo, incluir câmaras de mistura ou módulos separativos, e no qual ocorre a transferência de massa.

iv) *Sistema de detecção*: dispositivo responsável pela transdução de um sinal analítico aquando da passagem da zona de amostra, e que poderá ser um espectrofotómetro, espectrofluorímetro, eléctrodo selectivo, etc.

v) *Sistema de aquisição e registo de dados*: dispositivo constituído por um registador ou microcomputador que recebe os sinais analíticos fornecidos pelo detector.

Uma das vantagens evidenciadas pelas metodologias de fluxo, quando comparadas com os procedimentos convencionais nomeadamente com os analisadores automáticos discretos ou mesmo com os robotizados, é a grande versatilidade conseguida a um baixo custo, o que permite obter, com o mesmo equipamento, uma grande diversidade de configurações facilmente adaptáveis aos objectivos da determinação.

As potencialidades evidenciadas pelos métodos de fluxo contínuo, desde os primeiros tempos da análise por injeção em fluxo, nos anos 70, fizeram com que estes métodos registassem um acentuado crescimento, tanto em termos de divulgação, como em áreas de aplicação e até em receptividade por parte de uma comunidade científica no início bastante renitente quanto aos seus méritos, explicando desta forma o elevado número de trabalhos publicados, cerca de 9000, e a atenção que lhes é dedicada [3].

#### *1.2.1. Análise por injeção em fluxo (FIA)*

As potencialidades dos métodos de fluxo contínuo foram primeiro evidenciadas pela análise por injeção em fluxo (FIA) (Fig 1.1) [4]. De uma forma simplificada, e à semelhança do que acontece com as outras técnicas de fluxo, a FIA pode ser vista como uma interface, ou um elemento de ligação, entre as amostras (ou padrões) e o instrumento de medida: um volume de amostra definido em função das dimensões da alça (*loop*) de amostragem do dispositivo de injeção, 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, quer com a solução transportadora, quer pela adição, por confluência, de distintas soluções reagentes. Neste contexto as principais funções da FIA serão [5]:

i) Actuar como um processo de transporte de amostras e padrões até ao instrumento de medida (por exemplo um espectrofotómetro de absorção atómica ou um detector electroquímico) quando os analitos possuem características físico-químicas que possibilitem a sua detecção.

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

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

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

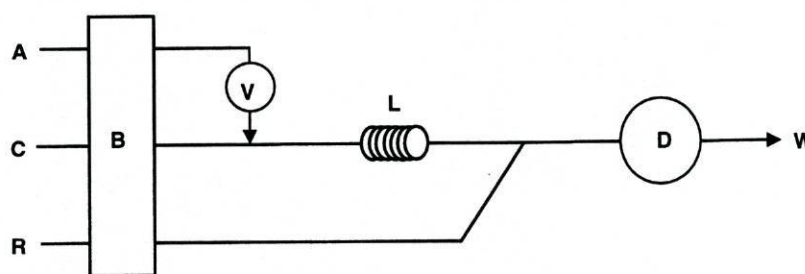


Fig 1.1 – Montagem FIA convencional: A - amostra; C - solução transportadora; R - reagente; V - válvula; L - reactor; D - detector; W - dreno; B - bomba peristáltica.

Estas funções, transpostas em termos de configuração e desempenho da montagem analítica, conferem à FIA um conjunto de características extremamente vantajosas, o que explica a sua ampla divulgação. Dentre estas características é de

destacar uma configuração simplificada das montagens de fluxo, 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 baixo consumo de reagentes e amostra, ao mesmo tempo que exibem uma boa reprodutibilidade e facilitam a implementação de técnicas de separação e concentração em fluxo, acoplamento a instrumentos espectroscópicos (AAS, ICP, etc) e o desenvolvimento de métodos quimiluminométricos e enzimáticos [6].

Estas características proporcionam o desenvolvimento e implementação de metodologias analíticas que permitem o recurso a reacções químicas convencionais e a exploração da natureza cinética intrínseca das determinações por FIA, a aplicação de técnicas FIA alternativas, como a convergência de zonas, e a utilização de sistemas em ciclo fechado ou a execução de métodos cinéticos. Possibilitam também a minimização ou eliminação de interferências através do acoplamento em linha de técnicas separativas, o recurso a diferentes tipos de detectores, com sensibilidades e selectividades diversas e a consecução de diferentes níveis de automação, em função da situação analítica [7].

### *1.2.2. Análise por injeção sequencial (SIA)*

A SIA [8] surgiu após a FIA como forma de implementação de sistemas químicos mais complexos, envolvendo um número relativamente elevado de reagentes, e mais flexíveis, capazes de serem aplicados em distintas situações analíticas sem ser necessário a introdução de reconfigurações na montagem de fluxo [9]. De facto, a versatilidade da SIA permite que a mesma montagem de fluxo possa ser utilizada na implementação de diferentes reacções e na execução de distintas determinações, sem que seja necessário alterar a sua topologia.

O volume de amostra a utilizar na análise é aspirado para um reactor (com um comprimento adequado de forma a evitar o contacto das soluções com o sistema de

propulsão), o mesmo acontecendo com a solução reagente, sob controlo temporizado. Durante a fase de transporte, onde normalmente ocorre a inversão do sentido do fluxo, verifica-se a mistura entre amostra e reagente, sendo os produtos de reacção encaminhados para detecção. A inclusão do sistema de propulsão, em geral uma bomba peristáltica com controlo remoto, no canal comum da válvula selectora, permite o acesso à amostra, dreno, solução de lavagem, reagentes e detector, apoiados em cada um dos vários canais da válvula rotativa multiposição.

Os componentes de um sistema SIA são os que constituem normalmente qualquer técnica de fluxo contínuo (Fig 1.2), sendo por isso equiparáveis aos de um sistema FIA, divergindo no entanto ao nível do sistema de injeção, no caso da SIA uma válvula selectora multiposição, e do seu controlo automático. Outra característica de realce que distingue as duas técnicas, é o facto de na SIA o escoamento das soluções não se processar sempre na mesma direcção.

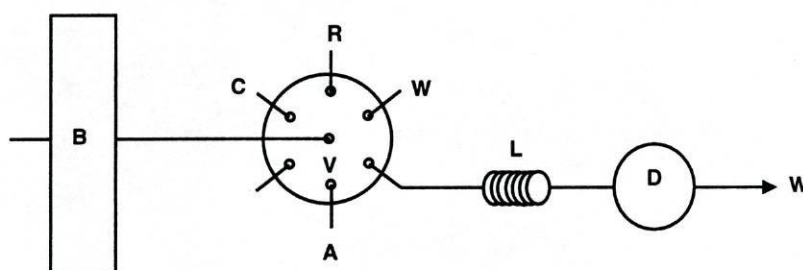


Fig 1.2 – Montagem SIA convencional: A - amostra; C - solução transportadora; R - reagente; V - válvula multiposição; L - reator; D - detector; W - dreno; B - bomba peristáltica.

A SIA possibilita intervenções ao nível da amostra semelhantes às conferidas pela FIA, sendo-lhe por isso atribuível funções idênticas às referidas anteriormente para esta

técnica, embora as suas características funcionais, nomeadamente a configuração das montagens analíticas e a inserção temporizada de amostra e reagentes lhe confirmam algumas vantagens, relativamente à FIA, em que se destacam: a possibilidade de utilização de um número acrescido de reagentes, em montagens analíticas mais simples, o que permite implementar reacções mais complexas; um inferior consumo de reagentes e de amostra, o que é acompanhado da produção de um menor volume de efluentes indesejáveis; uma maior flexibilidade e versatilidade operacional e um mais efectivo controlo do volume de amostragem numa base temporizada. Como desvantagem destaca-se o custo bastante superior dos sistemas SIA, até porque a válvula multiposição é bastante mais dispendiosa que a válvula convencional utilizada em FIA. Por outro lado, os sistemas SIA não podendo operar em modo manual necessitam por isso de um dispositivo controlador, normalmente um computador.

### *1.2.3. Multicomutação*

A multicomutação [18] representa um dos desenvolvimentos mais recentes em termos de técnicas de fluxo. A sua grande diferença em relação à FIA e à SIA reside na utilização, como dispositivos injectores, de válvulas electromecânicas activadas por um solenóide, sendo cada válvula accionada individualmente o que lhe permite funcionar como um monocomutador (Fig 1.3). Esta característica permite a utilização combinada de várias válvulas solenóides, dispostas em distintas topologias, de modo a criar uma rede de fluxo consistindo em diferentes percursos analíticos, possibilitando assim uma grande versatilidade na manipulação da zona de amostra, sem necessidade de introduzir alterações na configuração da montagem analítica.

As válvulas solenóides apresentam uma grande rapidez de comutação, o que lhes confere alguma vantagem relativamente aos outros dispositivos de injeção em termos de

procedimento de inserção de amostra e reagentes, o qual pode ser facilmente alterado e ajustado com base num controlo temporizado.

Permitiram também a introdução de um novo conceito de inserção de amostra, denominado de multicomutação com amostragem binária, em que pequenas alíquotas de amostra (*a*) (Fig 1.4) (da ordem dos  $\mu\text{L}$ ) são intercaladas com pequenas alíquotas de reagente (*r*), definidas em função de um controlo temporizado, o que proporciona uma mais rápida homogeneização da zona de amostra e por isso um mais rápido desenvolvimento da reacção.

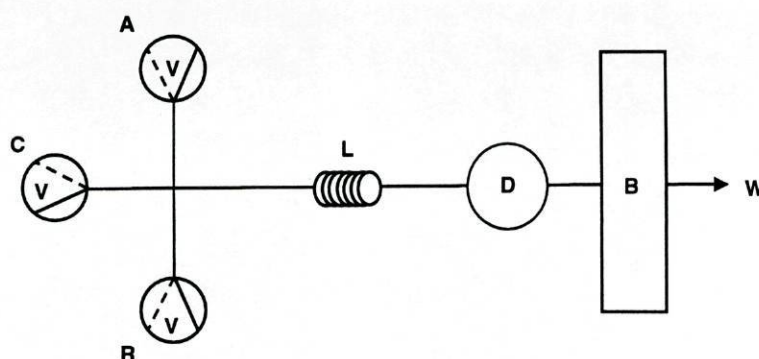
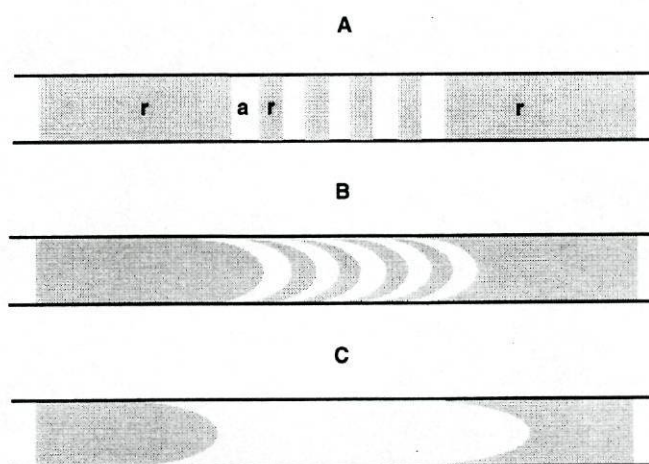


Fig 1.3 – Montagem multicomutada convencional: A - amostra; C - solução transportadora; R - reagente; V - válvula solenóide; L - reactor; D - detector; W - dreno; B - sistema de propulsão.

Esta é outra vantagem da multicomutação: a reacção química tem início durante a fase de amostragem, enquanto que em outros sistemas de fluxo, nomeadamente nos sistemas FIA multicanal, o reagente é adicionado à amostra após a inserção desta no percurso analítico, não sendo por isso o intervalo de amostragem aproveitado para desenvolvimento da reacção [18].

Na multicomutação a colocação do dispositivo de propulsão após o detector simplifica a montagem, visto que as soluções são aspiradas por um único canal, havendo uma redução do consumo de reagentes, embora aumente a probabilidade da ocorrência de bolhas de ar no interior do sistema analítico devido à menor pressão. A colocação do sistema de propulsão antecedendo as válvulas solenóides, portanto numa estratégia de impulsão das soluções, obriga a utilizar um canal de impulsão por cada solução, o que é conseguido pelo recurso a bombas peristálticas, complicando a montagem e obrigando a uma recirculação das soluções de modo a reduzir o seu consumo. Tem no entanto a vantagem de limitar acentuadamente o aparecimento de bolhas de ar.



*Fig 1.4 – Amostragem binária: (A) a intercalação de pequenos segmentos de amostra (a) e reagente (r) facilita a mistura destas duas soluções durante a fase de transporte (B) e permite uma mais rápida homogeneização da zona de amostra (C).*

A multicomutação é capaz de um desempenho analítico semelhante ao da SIA com algumas vantagens, onde se incluem os custos inferiores da montagem analítica (nomeadamente das válvulas de injeção) e uma optimização dos recursos utilizados, visto

que é possível introduzir ou acrescentar uma válvula solenóide por reagente, enquanto que no caso da SIA, na maior parte das vezes há canais da válvula selectora que não são utilizados. Por outro lado, com a multicomutação é possível uma mais rápida homogeneização amostra/reagente, com uma menor dispersão, através do recurso à amostragem binária, e uma superior velocidade de comutação, em virtude das características operacionais das válvulas de inserção normalmente utilizadas.

Apresenta no entanto também algumas desvantagens, que estão fundamentalmente associadas com as características operacionais dos dispositivos de injeção utilizados. No caso das válvulas solenóides, verifica-se, nomeadamente, uma inferior robustez, pressões de trabalho inferiores e uma inferior reprodutibilidade operacional. Estes problemas poderão ser ultrapassados, como será demonstrado mais adiante, utilizando válvulas pneumáticas, as quais são, por outro lado, bastante mais dispendiosas.

Conceptualmente, a topologia de uma montagem de fluxo multicomutado pode assumir configurações distintas, às quais podem ser atribuídas semelhanças com as topologias das redes informáticas. Assim, as válvulas solenóides podem ser colocadas em série, numa configuração linear (Fig 1.5), a qual pode por sua vez ser fechada, resultando numa configuração circular. Por outro lado, as válvulas podem ser dispostas numa configuração em estrela (Fig 1.3), ou pode mesmo adoptar-se uma topologia hierarquizada. Podem também utilizar-se combinações de configurações, o que será sempre condicionado pelo objectivo da análise.

O posicionamento em linha permite reduzir o número de válvulas a utilizar, para a mesma aplicação, embora a temporização seja mais dificultada, aumentando por outro lado a probabilidade de ocorrência de bolhas no interior do sistema. A utilização de uma configuração em estrela obriga à inclusão de mais válvulas e de um ponto de confluência, embora o funcionamento da montagem seja mais óbvio e a sua temporização mais acessível. Nesta configuração um sistema de fluxo multicomutado pode funcionar como um

sistema SIA típico, com a vantagem de apresentar uma velocidade de comutação muito superior.

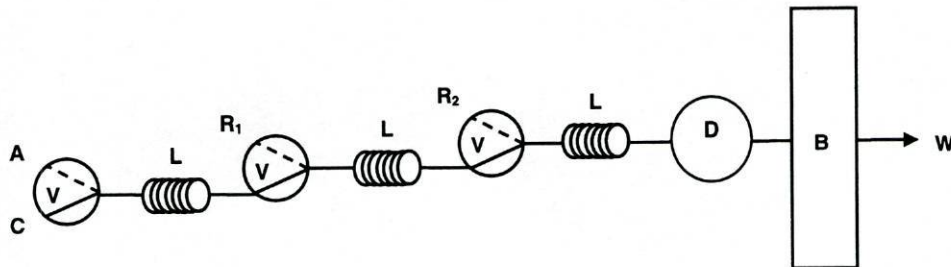


Fig 1.5 – Sistema de fluxo multicomutado com configuração linear: A - amostra; C - solução transportadora; R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> - reagentes; V - válvula solenóide; L - reactores; D - detector; W - dreno; B - sistema de propulsão.

Sendo uma técnica relativamente recente, a multicomutação, principalmente quando em combinação com a amostragem binária, ainda não atingiu a divulgação e a notoriedade que as suas qualidades e potencialidades certamente já justificavam. À semelhança das reservas inicialmente colocadas à análise por injeção em fluxo e mais recentemente à análise por injeção sequencial, a multicomutação não tem encontrado por parte da comunidade científica a aceitação desejada. As razões para esta falta de receptividade prendem-se porventura com o seu carácter de novidade, ou então, hipótese mais provável, por alguma falta de robustez das válvulas solenóides disponíveis comercialmente, pela dificuldade em encontrar circuitos electrónicos comerciais para accionamento das válvulas, o que obrigava à sua construção, e uma natural resistência, cada vez menos acentuada, à automatização e à automação.

De qualquer forma, e apesar de alguma hesitação inicial, a multicomutação tem vindo a ganhar o seu espaço próprio entre as metodologias em fluxo contínuo, tendo já em 1999 sido publicados um número muito razoável de trabalhos envolvendo a utilização desta técnica, o que, combinado com uma cada vez maior disponibilidade de equipamento de qualidade, permite antever um futuro com perspectivas positivas.

Uma vez que o trabalho desenvolvido teve por objectivo a implementação de metodologias analíticas em que se pretendeu explorar o potencial analítico da multicomutação, considerou-se de interesse efectuar uma avaliação da evolução, obrigatoriamente recente, desta técnica, considerando as estratégias e desenvolvimentos analíticos e tecnológicos a ela associados. Um obstáculo a ter em conta quando se pretende seriar o historial da multicomutação prende-se com a designação dada às metodologias propostas e publicadas e à sua possível classificação como exemplos de multicomutação. Enquanto que no caso da FIA, e depois da SIA, a sua denominação era genericamente aceite, e por isso utilizada nos artigos científicos publicados, com a multicomutação muitos autores, apesar de utilizarem estratégias e conceitos inerentes à multicomutação, não reconhecem os seus trabalhos como tal, classificando-os geralmente como metodologias alternativas de análise em fluxo. Este facto implica que alguns dos trabalhos classificados como de multicomutação, e que serão referidos mais adiante, poderão não ser reconhecidos pelos seus autores como tal.

#### 1.2.3.1. A evolução da multicomutação

Em 1985, Rothwell e Woolf [10] propõem a utilização de uma válvula solenóide miniaturizada, disponível comercialmente, para a injeção reprodutível de volumes variáveis de amostra com base num controlo de tempo. Na montagem desenvolvida, a válvula solenóide era utilizada, conceptualmente, como o seria uma válvula rotativa convencional, sem que tivessem existido grandes preocupações em termos de

desenvolvimento de novos conceitos e novas estratégias de inserção e manipulação da amostra. A válvula solenóide, de três vias, era controlada por um circuito temporizador, o qual possibilitava a utilização de tempos de amostragem até 0,4 s. O volume de amostra, definido em função do tempo de abertura da válvula e do caudal, era propulsionado por uma bomba peristáltica em direcção a um ponto de confluência, onde convergia com um fluxo transportador. Enquanto a válvula permanecia na posição de fechada, a amostra era encaminhada para dreno. Avaliada na determinação do fosfato pelo método do azul de molibdénio, apresentava um desempenho semelhante ao de uma válvula rotativa convencional, proporcionando um ritmo de amostragem superior embora com inferior reprodutibilidade.

Em 1987, Malcolme-Lawes *et al.* [11] propõem sistemas de fluxo em que recorrem a várias válvulas solenóides, também de três vias embora com uma construção diferente, para inserção temporizada de amostra e reagentes. A propulsão das soluções era efectuada por intermédio de um gás sobre pressão. Malcolme-Lawes e Pasquini aperfeiçoam este sistema no ano seguinte [12], de forma a permitir a análise sequencial de diversos analitos, com um ritmo de amostragem e uma sensibilidade reforçados. O sistema analítico, controlado por um microcomputador, possibilitava o accionamento alternado das diversas válvulas a uma frequência de 20 Hz, o que proporcionava uma eficiente mistura de reagentes antes do contacto com a amostra, permitindo a salvaguarda de reagentes com tempos de vida curtos. A preparação dos reagentes ocorria alternadamente com a inserção de um volume único de amostra, por aspiração através de uma bomba de pistão, em zonas diferentes da montagem analítica, as quais eram depois colocadas em contacto para desenvolvimento da reacção e detecção. O volume de amostra era definido pelo comprimento da tubagem de amostragem e não em função de um controlo temporizado. O sistema analítico desenvolvido apresentou um desempenho comparável ao de um sistema FIA convencional, embora com a vantagem adicional de exibir um consumo de reagentes e de amostra bastante inferior. Estas características são também evidenciadas pela

metodologia multianálise proposta por Rocks em 1989 [13], denominada Análise em Fluxo com Dispersão Controlada, a qual, recorrendo a várias válvulas solenóides de três vias controladas por microprocessador, permitia a inserção por aspiração de diferentes reagentes de forma a possibilitar a execução de distintos ensaios.

Em 1992 Reis *et al.* [14] recorrem à utilização combinada de um injector-comutador e várias válvulas solenóides para demonstrarem a simplicidade, versatilidade e facilidade de implementação exibida por estes mecanismos, em diversas configurações de fluxo, que, possibilitando a execução de diluições em linha ou com base no método das adições, foram aplicadas na análise de Ca, Mn e Zn em amostras vegetais. No mesmo ano, Faria e Pasquini [15] concebem um dispositivo automático constituído por 3 válvulas solenóides de 3 vias, projectado para ser usado como módulo de introdução de amostras em sistemas FIA. Este dispositivo, controlado por um circuito temporizador, permitia a amostragem de volumes entre 20 e 300  $\mu\text{L}$ , sendo no entanto o volume máximo limitado pelo comprimento do tubo colocado entre duas válvulas e que funcionava como canal de amostragem. Um outro módulo de injeção, constituído também por 3 válvulas solenóides e controlado por um circuito temporizador, seria proposto cinco anos mais tarde [16], por um grupo de investigadores da mesma universidade, para implementação de sistemas de fluxo contínuo monosegmentado.

Simplicidade e rapidez de análise eram as vantagens fundamentais exibidas pelo sistema proposto por Hara *et al.* em 1993 [17], o qual utilizava válvulas solenóides de duas vias (aberta/fechada) para inserir igual número amostras, e depois uma válvula de três vias para seleccionar entre a amostra e uma solução de referência. Esta montagem seria utilizada na determinação potenciométrica de cloreto, tendo como detector um eléctrodo selectivo ao ião  $\text{Cl}^-$ , com um tempo de análise por amostra, independentemente da concentração, entre 1,2 e 1,3 s.

Finalmente em 1994, Reis *et al.* [18] propõe uma nova estratégia em termos de manuseamento da amostra e introdução de reagentes, a qual designam de

multicomutação, dando início à publicação de uma série de artigos científicos dedicados especificamente a esta técnica, que seria depois prosseguida com a publicação de outros cinco trabalhos. A multicomutação é apresentada como uma técnica de fluxo facilmente implementável, baseada na utilização de válvulas solenóides de três vias em que cada válvula funcionava como um comutador independente, possibilitando a criação de uma rede de fluxo. Com um funcionamento simplificado permitia a utilização de um único canal propulsor, enquanto que um controlo temporizado da fase de amostragem possibilitava a inserção, de forma reprodutível, de volumes variáveis de amostra incluindo volumes de 2  $\mu\text{L}$ . Revelava-se igualmente uma técnica rápida e com um muito baixo consumo de reagentes. Simultaneamente é desenvolvido o conceito de amostragem binária, em que a inserção da amostra é efectuada por comutação alternada de duas válvulas solenóides apoiadas num ponto de confluência, responsáveis pela inserção da amostra e do reagente, com tempos de comutação extremamente curtos, o que permitia a intercalação de pequenas alíquotas de ambas as soluções, resultando na obtenção rápida de uma mistura homogénea com um padrão de baixa dispersão. Alternativamente poderia utilizar-se uma única válvula, sendo a comutação efectuada entre as posições de amostra e reagente, com resultados idênticos em termos de intercalação das respectivas soluções. O controlo do sistema analítico, nomeadamente das válvulas solenóides e da bomba peristáltica responsável pela propulsão das soluções, por aspiração, era efectuada por microcomputador. Neste trabalho são também descritos os circuitos electrónicos elaborados especificamente para accionamento das válvulas solenóides, e que seriam amplamente utilizados posteriormente. Avaliada na determinação de ferro(III) pelo método do tiocianato, possibilitou um ritmo de amostragem de 220 amostras por hora, com um consumo de 0,7 mg de tiocianato de potássio por determinação.

Em 1995, Martelli *et al.* [19] publicam os resultados do segundo trabalho envolvendo a utilização de redes de fluxo multicomutado e amostragem binária, para determinação espectrofotométrica de níquel, ferro e crómio em ligas de aço. As duas

montagens de fluxo propostas divergiam na topologia do posicionamento das válvulas solenóides. Uma delas apresentava uma disposição linear das referidas válvulas, o que permitia a utilização de três reagentes para determinação de níquel. A segunda, com uma disposição em estrela possibilitava a determinação sequencial de ferro(III) e crómio(VI). Ambas as montagens confirmaram as potencialidades da multicomutação evidenciadas ao nível do primeiro trabalho: uma rápida homogeneização amostra/reagente, o que permitia o desenvolvimento mais rápido da reacção e por conseguinte a utilização de reactores mais curtos - reactores intercalares de 15, 20 e 40 cm para a primeira montagem e reactor único de 50 cm para o segundo caso – um baixo consumo de reagentes, boa precisão e exactidão, e bons ritmos de amostragem, de 60 e 130 amostras por hora, respectivamente. Estes ritmos de amostragem são compreensivelmente inferiores aos anteriores em virtude das reacções desenvolvidas implicarem a utilização de um maior número de soluções, quer de reagentes quer de amostra. No mesmo ano foi apresentado o terceiro trabalho com multicomutação [20], envolvendo desta vez a determinação espectrofotométrica de creatinina em amostras de urina, com base num método cinético e com implementação de uma nova estratégia de amostragem de zonas. Esta estratégia possibilitava a execução de elevadas diluições em linha, recorrendo a apenas um único fluxo transportador. A montagem de fluxo proposta, envolvendo a utilização de três válvulas solenóides, em disposição linear, e dois reagentes, utilizava dois canais propulsores: um para execução da diluição da amostra de urina, por amostragem temporizada da porção mais terminal e mais dispersa da zona de amostra, sendo rejeitada a porção remanescente; o segundo, para controlar a paragem da zona de amostra, num banho aquecido, com o objectivo de incrementar o tempo de reacção e por conseguinte a sensibilidade da determinação. A versatilidade e a elevada direccionalidade de fluxo proporcionada pela multicomutação, possibilitava que estas duas fases fossem levadas a cabo de forma independente. Mais ainda, era possível seleccionar uma zona de amostra para detecção e depois seccionar transversalmente essa zona de amostra em duas porções, a anterior, encaminhada

directamente para detecção, e a posterior, sujeita a uma paragem de fluxo para incremento do tempo de reacção. Estas duas fases ocorriam simultaneamente, e na sequência de uma única inserção de amostra, sem afectar negativamente o ritmo de amostragem.

Em 1996 é proposto um sistema de fluxo multicomutado, com divisão de fluxo, para determinação espectrofotométrica simultânea de cobre e zinco em plantas [21]. A montagem de fluxo envolvia a utilização de duas soluções transportadoras, sendo a amostragem temporizada e a adição de reagentes efectuada por confluência. Uma divisão de fluxo, antecedendo a detecção, possibilitava a divisão da zona de amostra em duas secções, as quais eram sujeitas a dois tempos de residência distintos, sendo depois as concentrações de cobre e zinco determinadas em função das suas diferentes cinéticas de reacção. Contrariamente ao que acontecia nos trabalhos anteriores, as soluções reagentes e de amostra eram impulsionadas, e não aspiradas, com auxílio de um bomba peristáltica, o que implicava a colocação invertida das válvulas solenóides e obrigava a um maior consumo de amostra, sendo a solução transportadora recirculada. Os resultados obtidos confirmam, além da qualidade esperada, a simplicidade e a precisão do controlo temporizado das válvulas solenóides. No mesmo ano é proposto um sistema de fluxo multicomutado visando a determinação espectrofotométrica sequencial de amónio e fosfato em plantas [22]. A montagem de fluxo, que recuperava a filosofia de funcionamento inicial, foi concebida com seis válvulas solenóides, dispostas em estrela, e com dois pontos de confluência. Cada uma das válvulas, de três vias, apresentava uma das vias obstruída de forma a funcionar como um monocomutador aberto/fechado. A introdução temporizada de amostra e reagentes, ao nível de uma solução por válvula, era efectuada por aspiração com bomba peristáltica através de canal único. A introdução da amostra foi efectuada por amostragem binária, a tempos de intercalação amostra/reagente de 0,2 s, o que favorecia a homogeneização. O sistema efectuava primeiro a determinação de amónio com salicilato, em meio alcalino, e depois a determinação de fosfato com molibdato, em meio ácido, e apesar de implicar a utilização de quatro reagentes e uma solução transportadora, exibia

uma grande simplicidade de funcionamento, muito superior à que seria obtida com um sistema FIA convencional, e com um muito menor consumo de reagentes.

Korn *et al.* [23] exploraram todo o potencial da multicomutação e da amostragem binária, em especial a sua capacidade para gerar gradientes de concentração, na implementação de um sistema de titulação em fluxo, com detecção do ponto de equivalência por espectrofotometria e recurso a uma estratégia de procura binária. Na metodologia proposta, que não recorria a uma calibração prévia, as condições de estequiometria da reacção eram obtidas por variação gradual do volume de amostra e de titulante, mantendo no entanto constante o volume global da mistura. O conceito de procura binária estava associado à procura da variação mínima da fracção volumétrica, e por isso da proporção relativa de amostra e titulante, que produzia uma mudança na cor do indicador. A montagem de fluxo desenvolvida, apresentando as características básicas da disposição em estrela e recorrendo a três válvulas solenóides, permitia a titulação de amostras num intervalo alargado de concentrações, num curto espaço de tempo, com elevada precisão e reduzido consumo de solução. Uma outra metodologia de titulação baseada numa rede de fluxo multicomutado e numa estratégia de procura binária, seria proposta por Martelli *et al.* em 1999 [24], a qual introduzia algumas alterações em relação à proposta anterior, nomeadamente ao nível da detecção potenciométrica do ponto de equivalência e da utilização de um fluxo monosegmentado. Outra diferença fundamental residia no modo de processamento da procura binária para localização do ponto de equivalência, o qual era efectuado pelo método de Fibonacci [23] no primeiro caso e por aproximações sucessivas no segundo. Por outro lado, a fracção volumétrica correspondente à amostra era mantida constante, variando a adição de titulante, o que obrigava à utilização de uma solução diluente, sempre que a fracção volumétrica do titulante diminuía, de forma a evitar variações na matriz da amostra. A montagem de fluxo era semelhante à proposta por Korn *et al.* incluindo duas válvulas extra para inserção de ar e de solução diluente.

A exploração de gradientes de concentração em sistemas de fluxo multicomutado seria retomada por Wang *et al.* em 1998 [25] para a titulação potenciométrica de cálcio e para a determinação espectrofotométrica de ortofosfato pelo método do azul de molibdénio. Neste trabalho, que os autores não associaram ao conceito de multicomutação, uma montagem constituída por quatro válvulas solenóides de duas vias (aberta/fechada) permitia a inserção de volumes variáveis de amostra e reagentes, com base numa rotina temporizada, à semelhança do trabalho desenvolvido por Reis *et al.* em 1994. A base do método volumétrico era a definição de um intervalo de tempo, normalmente de 1 s, e a variação da fracção desse intervalo que correspondia a manter na posição de aberta a válvula de amostra ou a válvula de reagente. A determinação espectrofotométrica de ortofosfato era baseada na inserção temporizada e intercalada de pequenas alíquotas de amostra e reagente, num processo idêntico à amostragem binária anteriormente referida. Aliás, depois do trabalho para determinação de fosfato em plantas, publicado por Kronka *et al.* em 1996 [22], na quinta parte da série dedicada à multicomutação, os mesmos autores publicaram em 1997 [26] um outro trabalho para determinação de fosfato em águas. A montagem analítica apresentava algumas vantagens relativamente à proposta anterior, como seja a possibilidade de determinar fosfato numa ampla gama de concentrações. Esta melhoria foi conseguida à custa da utilização de dois reactores paralelos e da implementação de uma estratégia de paragem de fluxo: enquanto que uma zona de amostra era retida no interior de um dos reactor durante algum tempo, de modo a aumentar o tempo de reacção e, assim, a sensibilidade da determinação, uma segunda zona de amostra, idêntica à primeira, era inserida e detectada. Deste modo, obtinham-se duas leituras para a mesma amostra, com dois tempos de reacção e por isso com magnitudes de sinal distintas, que poderiam ser interpoladas em intervalos de concentração diferentes.

Uma estratégia de paragem de fluxo semelhante, para incremento do tempo de residência e por isso da sensibilidade da análise, foi utilizada por Tumang *et al.* [27] para determinação espectrofotométrica de boro em plantas. A montagem analítica desenvolvida

apresentava cinco válvulas solenóides de três vias e uma de quatro vias, dispostas de forma a criar três percursos analíticos alternativos, com comprimentos idênticos, nos quais eram inseridas e retidas três zonas de amostra durante o tempo necessário para que a reacção fosse completa, procedendo-se depois à detecção. As soluções reagentes e a amostra eram impulsionadas, em vez de aspiradas, através de uma bomba peristáltica, e o volume de amostra inserido era definido pelo comprimento do canal de amostragem e não por temporização. O sistema proposto possibilitava assim o desenvolvimento de reacções lentas, por aumento do tempo de reacção, sem que esse facto se repercutisse negativamente no ritmo de amostragem. De facto, foram obtidos ritmos de amostragem de 35 amostras por hora, apesar do tempo de análise por amostra ser de 3 min.

De igual modo Lapa *et al.* [28] propuseram um sistema de dupla paragem de fluxo, envolvendo a utilização de cinco válvulas solenóides, o qual foi utilizado na determinação espectrofotométrica de amiloride em preparações farmacêuticas. A amostragem binária de amostra e reagentes permitia homogeneizar mais rapidamente a zona de amostra, a qual era depois parada durante dois minutos, para incremento do tempo de reacção, e por isso da sensibilidade, sem afectar negativamente o ritmo de amostragem.

A realização de diluições em linha, com o objectivo de aumentar a amplitude do intervalo de concentrações determináveis, foi o objectivo de quatro trabalhos envolvendo sistemas de fluxo multicomutado. Em 1996, Giné *et al.* [29] propuseram uma montagem analítica baseada na amostragem binária, capaz da inserção de fracções volumétricas variáveis de amostra, ajustáveis sempre que a sua concentração fosse superior ao limite estabelecido pela etapa de calibração. Este ajuste era efectuado através da intercalação temporizada de uma solução diluente de modo a que, mantendo constante o volume amostrado, a fracção volumétrica da amostra fosse reduzida. A razão entre a fracção volumétrica inicial e a ajustada, comparada numa base de tempo, definia o nível de diluição produzido. Uma estratégia semelhante foi desenvolvida por Gouveia *et al.* [30] e aplicada em ensaios de dissolução de comprimidos. A montagem analítica permitia a diluição

automática da amostra, sempre que o sinal analítico fosse mais elevado que o limite superior da zona de linearidade, através da redução do volume de amostragem, o que era conseguido tanto por diminuição do tempo de amostragem (no caso da inserção de uma única alíquota) para valores entre 0,05 e 2 s, como por redução da fracção volumétrica correspondente à amostra (no caso da amostragem binária). O factor de diluição era avaliado com base na relação linear estabelecida entre tempo de amostragem e sinal analítico, que era considerada válida sempre que o volume amostrado fosse inferior a metade do volume necessário para atingir o estado estacionário. Por sua vez, Rocha *et al.*, também em 1998 [31], desenvolveram um sistema de diluição automática capaz de fornecer valores de reduzida, média e elevada dispersão, sem necessidade de reconfigurar a rede de fluxo. Este desempenho foi conseguido por redução do volume de amostragem e por amostragem de zonas, quer isoladamente quer em combinação com uma estratégia de divisão de fluxo. A montagem de fluxo com seis válvulas, e envolvendo a impulsão das soluções, permitia a selecção de dois percursos analíticos, com dimensões diferentes, para realizar a amostragem temporizada de zonas ou a divisão de fluxo, possibilitando a diluição da amostra antes da adição dos reagentes e, deste modo, a obtenção de coeficientes de dispersão com valores entre 2,15 e 754. Mais recentemente Lapa *et al.* [32] desenvolveram um sistema de fluxo multicomutado com uma configuração simples para detecção fluorimétrica de isoniazida em preparações farmacêuticas, o qual, implementando uma estratégia de diluição por remoção da zona de amostra mais concentrada, foi aplicado em ensaios de dissolução de comprimidos.

A versatilidade demonstrada pela multicomutação, que, como foi referido anteriormente, tão bem foi aproveitada por vários investigadores para a produção de gradientes de concentração, foi, pelo contrário, utilizada por Lapa *et al.* em 1997 [33] para o desenvolvimento de um sistema de fluxo que permitisse a eliminação desses mesmos gradientes de concentração e dessa forma compensar o efeito Schlieren frequentemente associado a determinações espectrofotométricas. A montagem analítica desenvolvida,

recorrendo à amostragem binária, implicava a preparação em linha da solução transportadora, o que permitia conferir-lhe um perfil de concentração idêntico ao da zona de amostra, produzindo-se assim um fluxo com um índice de refração homogêneo o que evitava a ocorrência de perturbações na detecção. Este sistema foi aplicado na determinação espectrofotométrica de pindolol por complexação com o Fe(III).

Sendo os detectores espectrofotométricos os mais frequentemente incorporados em sistemas de fluxo multicomutado, a facilidade de controlo e a versatilidade demonstrada pela multicomutação possibilita que outros tipos de detectores possam ser usados com sucesso. Assim, em 1998, Silva *et al.* [34], propuseram uma metodologia de fluxo para determinação de cádmio, chumbo e níquel por espectrometria atómica de absorção com atomização em fio de tungsténio após separação e pré-concentração em linha. Mesmo considerando que o ênfase deste trabalho foi colocado nas etapas de pré-concentração e atomização da amostra, o sistema multicomutado utilizado proporcionou um eficiente e simplificado manuseamento da amostra e dos reagentes. A facilidade de acoplamento da multicomutação ficou bem demonstrada no trabalho publicado no mesmo ano por Pozebon *et al.* [35], em que um sistema de fluxo multicomutado envolvendo um processo de separação e pré-concentração em linha, foi acoplado a um sistema com atomização em plasma induzido e detecção por espectrometria de massa (ICP-MS) para determinação de Cu, Cd, Pb, Bi e Se(IV) em água do mar.

Outra técnica de detecção acoplada a sistemas de fluxo multicomutado foi a espectrofluorimetria. Além do trabalho referido anteriormente [32] Lapa *et al.* propuseram também em 1997 [36], uma metodologia para determinação fluorimétrica de ácido fólico após fotodegradação. A montagem de fluxo implementada incluía uma lâmpada de ultravioleta de baixa pressão, em redor da qual se encontrava enrolado o reactor onde ocorria a irradiação directa das soluções de ácido fólico, sendo depois os produtos resultantes da degradação fotoquímica detectados por fluorimetria. A inserção de diferentes volumes de amostra - em função de distintos tempos de amostragem - permitiu

que a análise fosse efectuada num intervalo alargado de concentrações. O sistema analítico tinha autonomia para escolher o tempo de amostragem mais adequado à concentração da amostra. Uma estratégia de fotodegradação semelhante foi proposta por Calatayud *et al.* em 1998 [37] para a determinação espectrofotométrica sequencial de nitrito e nitrato.

No mesmo ano Vieira *et al.* [38] propõem um sistema de fluxo multicomutado para determinação turbidimétrica de sulfato em plantas. A rede de fluxo apresentava 5 válvulas solenóides dispostas em estrela, rodeando um ponto de confluência. À semelhança do sucedido em trabalhos anteriores a amostra era intercalada com pequenos troços de reagente, por amostragem binária, sendo as soluções aspiradas por canal único. A utilização de dois volumes de amostragem possibilitou a determinação de sulfato em dois intervalos de concentração distintos, com um baixo consumo de reagentes. Assim, um volume de zona de amostra de 160  $\mu\text{L}$  (94  $\mu\text{L}$  de amostra), correspondente a cinco ciclos de intercalação de amostra/cloreto de bário/sulfato, com volumes de 18,8/9,9/3,3  $\mu\text{L}$ , respectivamente, foi usada para uma gama de concentrações entre 0-150  $\text{mg L}^{-1}$ , enquanto que uma zona de amostra de 132  $\mu\text{L}$  (54  $\mu\text{L}$  de amostra) obtida com quatro ciclos a 13,2/9,9/3,3  $\mu\text{L}$ , das mesmas soluções, foi usada para análise no intervalo 100-500  $\text{mg L}^{-1}$ . Estes resultados confirmam a versatilidade da multicomutação, em que qualquer sequência ou volume de amostragem pode ser facilmente seleccionado sem necessidade de alterar a configuração do sistema.

A elevada direccionalidade de fluxo e a ampla capacidade de intervenção sobre a zona de amostra proporcionadas pela multicomutação, ficou bem patente no trabalho publicado por Lapa *et al.* em 1998 [39]. A rede de fluxo implementada com uma configuração circular aberta, permitia que, através de uma adequada temporização das válvulas solenóides, a zona de amostra fosse permanentemente recirculada, possibilitando a sua multideteccção. A recirculação possibilitava, por outro lado, que a zona de amostra fosse continuamente diluída, até que a sua concentração se adequasse à zona de resposta

linear do detector. A diluição era reforçada por remoções consecutivas, das porções mais terminais da zona de amostra. Paralelamente, conseguia-se uma renovação do reagente cromogénico e das interfaces de reacção, o que resultava num aumento da velocidade de reacção.

Sendo as bombas peristálticas e as bombas de pistão os dispositivos mais utilizados para propulsão de soluções em sistemas de fluxo multicomutado, a simplicidade e facilidade de operação e controlo, que caracterizam a multicomutação, são tão evidentes, que mesmo um módulo de análise em que a propulsão das soluções era efectuada pela força gravitacional, como o apresentado por Reis *et al.* em 1996 [40], apresentava uma elevada eficiência analítica, a um custo ainda mais baixo.

### **1.3. Metodologias analíticas automáticas para análise de produtos farmacêuticos**

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 amostra biológicas (soro, plasma, saliva, urina, e outra secreções), constitui grande parte da actividade desenvolvida pelos laboratórios farmacêuticos e clínicos. O crescimento contínuo registado na requisição e utilização de procedimentos analíticos, nestas áreas, motivou a procura de metodologias mais eficientes e, sobretudo, com uma importante componente de automatização.

Em termos de análise farmacêutica, a FIA é sem dúvida a técnica mais divulgada e mais utilizada nos trabalhos científicos publicados, o que é em parte explicado pela sua antiguidade, que lhe confere um conhecimento, aceitação e fiabilidade superiores aos das outras técnicas, embora as aplicações com SIA tenham vindo a alcançar uma notoriedade de realce. A multicomutação, como técnica mais recente, tem um campo de aplicação por enquanto bastante limitado, embora as perspectivas futuras, suportadas por um grande

potencial analítico, sejam muito positivas, como por exemplo na aplicação em ensaios de dissolução com vários vasos em simultâneo ou quando as amostra apresentem uma grande variabilidade de concentração.

Com este trabalho pretendeu avaliar-se todo este potencial na análise de produtos farmacêuticos, através do desenvolvimento e implementação de metodologias analíticas baseadas na multicomutação as quais pudessem constituir alternativas vantajosas aos procedimentos já utilizados. Procurou-se também que as metodologias desenvolvidas possibilitassem diferentes tipos de intervenção sobre a amostra, como a sua diluição, recirculação e degradação fotoquímica, que funcionassem como estratégias analíticas inovadoras, e pudessem ser aplicadas a distintas situações analíticas, envolvendo diferentes tipos de detectores .

#### 1.4.Referências

- [1] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, "Automatic Methods of Analysis", Elsevier Science Publishers Inc., New York, 1988.
- [2] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, "Flow-Injection Analysis", John Wiley and Sons, New York, 1987.
- [3] <<http://www.flowinjection.com>>
- [4] J. Ruzicka, E.H. Hansen, "Flow Injection Analysis", 2 ed., John Wiley and Sons, New York, 1988.
- [5] Hurst, W.J., "Automation in the Laboratory", VCH Publishers Inc, New York, 1995.
- [6] F. Lazaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 6 (1988) 585.
- [7] M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7 (1989) 1291.
- [8] J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, 237 (1990) 329.
- [9] P.J. Baxter, G.D. Christian, *Acc. Chem. Res.*, 29 (1996) 515.
- [10] S.D. Rothwell, A.A. Woolf, *Talanta*, 32 (1985) 431.
- [11] D.J. Malcolm-Lawes, G.A. Miligan, R.J. Newton, *J. Autom. Chem.*, 9 (1987) 179.
- [12] D.J. Malcolm-Lawes, C. Pasquini, *J. Autom. Chem.*, 10 (1988) 25.
- [13] B.F. Rocks, *Anal. Proc.*, 26 (1989) 321.
- [14] B.F. Reis, M.F. Giné, F.J. Krug, H. Bergamin-Filho, *J. Anal. At. Spectrom.*, 7 (1992) 865.
- [15] C. Pasquini, L.C. Faria, *J. Autom. Chem.*, 13 (1991) 143.
- [16] J.C. Andrade, R.J. Poppi, A.R. Coscione, *J. Autom. Chem.*, 13 (1996) 199.
- [17] H. Hara, N. Ishio, K. Takahashi, *Anal. Chim. Acta*, 281 (1993) 45.
- [18] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, *Anal. Chim. Acta*, 293 (1994) 129.
- [19] P.B. Martelli, B.F. Reis, E.A.M. Kronka, H. Bergamin-Filho, M. Korn, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, A.N. Araújo, *Anal. Chim. Acta*, 308 (1995) 397.

- 
- [20] A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 310 (1995) 447.
- [21] C.C. Oliveira, R.P. Sartini, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 332 (1996) 173.
- [22] E.A.M. Kronka, B.F. Reis, M. Korn, H. Bergamin-Filho, *Anal. Chim. Acta*, 334 (1996) 287.
- [23] M. Korn, L.F.B.P. Gouveia, E. Oliveira, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 313 (1995) 177.
- [24] P.B. Martelli, B.F. Reis, M. Korn, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, 387 (1999) 165.
- [25] X.D. Wang, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, R.P. Dyson, G.E. Jenkins, *Anal. Chim. Acta*, 368 (1998) 105.
- [26] E.A.M. Kronka, B.F. Reis, J.A. Vieira, T. Blanco. A.P.G. Gervasio, *Química Nova*, 20 (1997) 372.
- [27] C.A. Tumang, G.C. de Luca, R.N. Fernandes, B.F. Reis, F.J. Krug, *Anal. Chim. Acta*, 374 (1998) 53.
- [28] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, J.L.M. Santos, *Anal. Chim. Acta*, 407 (2000) 225.
- [29] M.F. Giné, A.P. Packer, T. Blanco, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 323 (1996) 47.
- [30] L.F. Gouveia, J.L.F.C. Lima, J.A.G. Morais, *Anal. Chim. Acta*, 366 (1998) 271.
- [31] F.R.P. Rocha, P.B. Martelli, R.M. Frizzarin, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 366 (1998) 45-53.
- [32] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, J.L.M. Santos, *Anal. Chim. Acta*, (*submetido*), (2000).
- [33] 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.
- [34] M.M. Silva, M.A.Z. Arruda, F.J. krug, P.V. Oliveira, Z.F. Queiroz, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 368 (1998) 255.
- [35] D. Pozebon, V.L. Dresseler, A.J. Curtius, *J. Anal. At. Spectrom.*, 13 (1998) 363.
- [36] 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.
- [37] J. M. Calatayud, J.V. Garcia Mateo, V. David, *Analyst*, 123 (1998) 429.
-

[38] J.A. Vieira, B.F. Reis, E.A.M. Kronka, A.P.S. Paim, M.F. Giné, *Anal. Chim. Acta*, 366 (1998) 251.

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

[40] B.F. Reis, M.F. Giné, C.A. Tumang, *Química Nova*, 19 (1996) 116.

# CAPÍTULO 2

---

## ***PARTE EXPERIMENTAL***

Neste capítulo serão abordados os procedimentos gerais utilizados na preparação das soluções, tanto em termos de amostras como de padrões, bem como no que diz respeito aos materiais, técnicas e produtos utilizados. Serão também referidos os instrumentos usados, sendo dado um especial ênfase às suas características e modo de funcionamento, e serão igualmente discutidos os aspectos fundamentais que condicionam a sua utilização. Destacar-se-á, neste contexto, o equipamento utilizado na concepção das montagens de fluxo desenvolvidas.

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

## 2.1.Reagentes e soluções

A água utilizada na preparação das soluções era água bidesionizada, obtida por passagem através de duas resinas de leito misto, o que garantia uma condutividade específica inferior a  $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ .

Os reagentes usados para preparação das soluções eram de qualidade *pro analysis* ou similar e foram utilizados sem qualquer tratamento ou purificação adicional. Os fármacos utilizados para preparação das soluções padrão tinham, sempre que possível, características em conformidade com as normas estabelecidas pela Farmacopeia Portuguesa VI.

## 2.2.Equipamento e instrumentação

No trabalho desenvolvido foi utilizado material de vidro de classe A.

Como instrumento de medida de volumes foram usadas pipetas automáticas de volume regulável da marca Gilson, modelos P100, P1000 e P5000, previamente calibradas.

As determinações espectrofotométricas utilizadas como métodos de referência, com o objectivo de avaliar comparativamente os resultados fornecidos pelas metodologias desenvolvidas, foram realizadas com o auxílio de um espectrofotómetro de UV/VIS, de feixe duplo, da marca Hitachi, modelo U2000.

As determinação cromatográficas, utilizadas como método de referência, foram realizadas com um sistema cromatográfico Waters, modelo ACTION Analyser, acoplado a uma bomba de alta pressão da marca Gilson, modelo 302, e a um detector UV da marca Gilson. Foram também usadas colunas de fase revertida Waters Nova-Pak C<sub>18</sub> (300-mm x 3,9-mm d.i., com partículas de 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro). Este sistema cromatográfico era controlado por intermédio de um microcomputador, com *software* Gilson 712 HPLC, ao qual estava ligado por intermédio de uma interface Gilson 506C.

As titulações potenciométricas em meio não-aquoso, usadas como método de referência, foram efectuadas com um titulador automático implementado no Laboratório de Química-Física, o qual era constituído por uma microbureta Crison, modelo Micro BU 2031, um voltímetro digital (com uma sensibilidade de  $\pm 0,1$  mV) da marca Crison, modelo 2002, um agitador Crison, modelo Micro ST 2039, um eléctrodo de pH Ingold, referência 10/402 e um eléctrodo de dupla junção Orion, referência 900200. No caso da determinação de cloretos em soluções parenterais o eléctrodo de pH foi substituído por um eléctrodo sensível a catião prata(I) de membrana cristalina homogénea, construído no Serviço de Química-Física [1], Como unidade de controlo de todo este equipamento foi utilizado um computador Hyundai Super 16, equipado com uma interface Advantech, modelo PCL 720, o qual estava ligado a uma impressora Epson LX800.

As titulações efectuadas com detecção visual do ponto de equivalência foram executadas com recurso a uma bureta Crison Micro BU 2031 e a um agitador Crison Micro ST 2039.

### **2.2.1. Montagens de fluxo multicomutado**

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 no funcionamento, exibiam recursos e componentes comuns, nomeadamente no que diz respeito aos sistemas de propulsão e transporte, sistemas de inserção de amostra, sistemas de detecção e sistema de controlo, que constituíam os componentes básicos dos sistemas analíticos genericamente utilizados.

### *2.2.1.1. Sistemas de propulsão e transporte*

A escolha e colocação do sistema de propulsão na montagem de fluxo, foi condicionada por vários aspectos: a necessidade de obter um caudal constante, fundamental para assegurar uma adequada reprodutibilidade tanto no transporte da zona de amostra como quando a amostragem é efectuada numa base de tempo, a simplicidade da montagem, e a facilidade de operação e de controlo. Nestas circunstâncias, a utilização de uma bomba de pistão, baseada no funcionamento contínuo de um pistão ou êmbolo, permitia atingir estes objectivos com alguma vantagem em relação às bombas peristálticas, uma vez que se limitava a ocorrência de fluxos pulsados além de proporcionar um mais fácil e flexível controlo. No que se refere à colocação do sistema propulsor na montagem, estabelecendo a forma de transporte da zona de amostra por impulsão ou aspiração, a bomba peristáltica poderia possibilitar uma maior versatilidade no caso da impulsão, uma vez que permitiria impulsionar simultaneamente várias soluções, enquanto que seria necessária uma bomba de pistão para cada solução. No entanto, em modo de aspiração o seu desempenho é semelhante, visto que é suficiente um único canal de transporte. Pelos motivos apresentados a escolha do sistema de propulsão recaiu sobre a bomba de pistão, utilizada em modo de aspiração.

Nos trabalhos desenvolvidos foram utilizados dois tipos de bomba de pistão: um da marca Razel modelo A-99, equipado com uma seringa de 50 mL, que foi utilizado nas determinações de ácido fólico, pindolol e cloretos, e um segundo sistema, da marca Crison modelo Micro BU 2031, equipada com uma seringa de 5 mL, que foi por sua vez utilizado nas determinações de isoniazida e amiloride. As bombas de pistão eram ambas operadas por um motor passo-a-passo, o qual era controlado externamente por um microcomputador através de protocolo série RS232, divergindo no entanto na forma como se efectuava este controlo: enquanto que o sistema Crison possuía um controlador interno, com comandos próprios invocados a partir do computador, o sistema Razel não o possuía, recebendo

todas as instruções de operação directamente do computador. Outra diferença entre os dois sistemas residia no volume da seringa que poderia ser acoplada, o qual condicionava o seu desempenho a vários níveis. Assim, no caso da bomba Razel, que permitia o acoplamento de seringas de maiores dimensões, foi acoplada uma seringa de 50 mL. Esta seringa possibilitava que o tempo de operação sem necessidade de esvaziamento fosse bastante superior, o que se afirmava como vantajoso em termos de ritmo de amostragem. No entanto, pelas suas dimensões, o seu esvaziamento automático era bastante moroso. Apresentava, por outro lado, um curso de êmbolo mais longo, devido ao tamanho da seringa, em que a força exercida era muito superior e por isso mais sujeito a deformações, o que era agravado pelo facto da seringa ser de material plástico e por isso apresentar menor rigidez. No caso da bomba Crison, foi acoplada uma de seringa de 5 mL, o que motivou que fosse necessário proceder a esvaziamentos mais frequentes, embora também muito mais rápidos. Mais ainda, o sistema Crison incorporava já uma válvula automática para esvaziamento, o que não acontecia com o sistema Razel, tendo por isso esta que ser incorporada.

Em virtude destas características, e com o objectivo de simplificar a operacionalidade das montagens, sem que com isso houvesse uma perda de eficiência, decidiu-se, no caso da utilização do sistema Razel, evitar o controlo por computador. Isto equivale a dizer que se estabelecia o caudal requerido, de forma manual, e que sempre que a seringa se encontrava cheia, se procedia ao seu escoamento manual, o que de qualquer forma permitia utilizar a seringa durante quase 100 minutos (para um caudal de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ) ininterruptamente.

No caso da bomba Crison o seu controlo por computador era inevitável, sendo efectuado com base no facto de que o curso completo do êmbolo da seringa correspondia a 2500 passos, dependendo o volume por passo do volume da seringa acoplada. O controlo era efectuado por um microcomputador, sendo a transmissão da informação efectuada através de protocolo série, padrão RS-232. A ligação à porta série do

microcomputador foi efectuada por intermédio de uma ficha DB25 e a ligação à bomba com uma ficha DIN3. Para transmissão da informação o protocolo utilizado foi: i) velocidade de transmissão: 2400 *bit* por segundo (*baud*); ii) controlo de paridade na recepção: par; iii) sincronização: 1 *bit* inicial (*start bit*) e 2 *bit* no final (*stop bit*); iv) Caracter: 7 *bit*.

As instruções de controlo da bomba eram enviadas sob a forma de sequências lineares de caracteres (*strings*) com o seguinte formato: i) primeiro caracter: identificação do dispositivo (número do dispositivo de 0 a 9) no conjunto de dispositivos; ii) segundo caracter: posicionamento da válvula integrada, responsável pela entrada/saída das soluções. O formato utilizado era "I" (*input*) para entrada e "O" (*output*) para saída; iii) terceiro caracter: sentido de movimentação do motor passo-a-passo. A informação é transmitida sob a forma de "D" (*dispense*) para despejar e de "P" (*pick-up*) para encher. iv) quarto caracter: número de passos a percorrer pelo motor (num máximo de 2500) no sentido definido.

As instruções em linguagem BASIC destinadas a enviar, pela porta de comunicação série, os sinais responsáveis pela movimentação da bomba de pistão Crison, eram do tipo:

```
...  
OPEN "COMX:BAUD,PARIDADE,CARACTER,STOPBIT" FOR OUTPUT AS #Z  
PRINT #Z, "NVMXXX"  
...
```

(sendo *N* o número da bomba de pistão, *V* a posição da válvula (input/output), *M* o sentido do movimento (dispense/pick-up) e *XXX* o número de passos a executar).

Estas instruções eram depois integradas na programação das rotinas de temporização do sistema analítico, o que permita a operação contínua da bomba de pistão.

O sistema de transporte das soluções (reactores) utilizado nas montagens desenvolvidas era constituído por tubagens em *teflon* (PTFE) da marca OMINIFIT, com um diâmetro interno de 0,8 mm, ligados entre si por ligadores e terminais de fabrico

próprio. A geometria dos reactores foi estabelecida por entrelaçamento das tubagens sobre uma rede plástica ou então por enrolamento helicoidal. As confluências utilizadas eram de construção laboratorial e fabricadas em *perspex*, com diferentes configurações. As ligações às tubagens foram efectuadas por intermédio de pequenos tubos de silicone com cerca de 10 mm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro.

#### 2.2.1.2. Sistemas de inserção

Os dispositivos de inserção são os elementos fundamentais num sistema de fluxo multicomutado, condicionando de forma decisiva o seu desempenho e a qualidade dos resultados obtidos. Nos trabalhos desenvolvidos, para inserção das diferentes soluções foram utilizadas válvulas solenóides e pneumáticas. 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.

##### 2.2.1.2.1. Válvulas solenóides

As válvulas solenóides (válvulas com activação electromecânica por solenóide) eram da marca NResearch Inc., e possuíam uma configuração cilíndrica e reduzidas dimensões (1,9 cm de diâmetro e 2,92 cm de altura). Apresentavam igualmente um conjunto de características que as tornavam atraentes, na perspectiva da sua aplicação em montagens analíticas, como sejam: i) reduzidos volumes mortos; ii) reduzido volume interno; iii) pressão máxima de funcionamento de 30 psi; iv) curto tempo de resposta, permitindo frequências de comutação de 10 Hz; v) elevada resistência química (revestimento em PTFE); vi) baixo custo; vii) alimentação a 12 V/0,8 A.

Foram utilizados dois tipos fundamentais de válvulas solenóides: válvulas de 3 vias (uma entrada/duas saídas) modelo 161 T031 (Fig 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 percurso; 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. Para as válvulas de 2 vias normalmente abertas, o modo de funcionamento era o oposto: o accionamento da válvula obrigava o núcleo do solenóide a pressionar a membrana de *teflon* obstruindo o percurso, contrariando a acção da mola helicoidal que o mantinha aberto.

Um dos aspectos críticos relacionados com a utilização das válvulas solenóides dizia respeito à sua ligação às tubagens e reactores, no interior dos quais decorria o transporte das soluções. Uma vez que os ligadores disponíveis comercialmente permitiam a entrada de bolhas de ar na montagem, em virtude do abaixamento da pressão promovido pela aspiração exercida, tornou-se necessário construir ligadores mais convenientes, de forma a limitar este fenómeno. Estes novos ligadores, construídos por técnico especializado, seriam depois alterados, através da perfuração de um orifício onde era colocado e colado um tubo de cerca de 1 cm, em silicone, no interior do qual passava depois a tubagem.

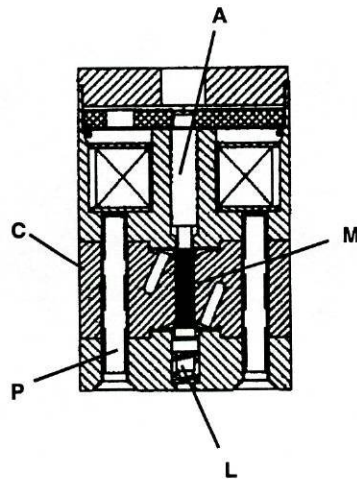


Fig 2.1 – Esquema da válvula solenóide de três vias: A-núcleo do solenóide; M-membrana de teflon; L-mola helicoidal; C-corpo em teflon para ligação das tubagens; P-parafuso de aperto.

#### 2.2.1.2.2.Válvulas pneumáticas

As válvulas pneumáticas utilizadas era válvulas pneumáticas de quatro vias (duas entradas/duas saídas) VICI Cheminert, modelo NAV0054, produzidas pela Valco Instrumental Co. Inc (Fig 2.2). Estas válvulas eram comutadas, por rotação entre as suas duas posições (através de um parafuso-sem-fim), por acção de ar comprimido (a uma pressão entre 60 e 80 psi). O fluxo de ar destinado a accionar as válvulas era controlado por intermédio de duas válvulas solenóides de 3 vias que já faziam parte do equipamento original, o mesmo acontecendo com o circuito controlador, o que permitia que o seu controlo fosse efectuado directamente por sinais TTL, enviados a partir da interface de controlo. As ligações às tubagens era efectuadas por ligadores específicos, que se revelaram eficientes.

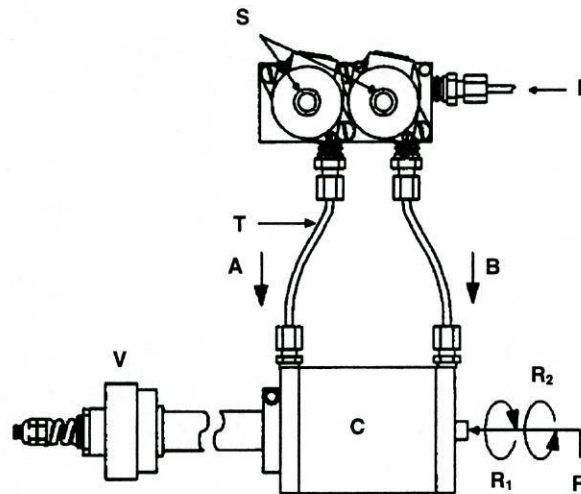


Fig 2.2 – Esquema global da válvula pneumática: V-válvula rotativa de duas posições; S-válvulas solenóides de três vias para controlo da admissão de ar; I-entrada de ar para as válvulas solenóides; A-admissão de ar obriga à rotação da válvula (V) no sentido contrário ao dos ponteiros do relógio (R<sub>2</sub>); B-admissão de ar obriga à rotação da válvula (V) no sentido dos ponteiros do relógio (R<sub>1</sub>); R-parafuso-sem-fim que define o eixo de rotação; C-corpo do actuador pneumático; T-tubagem de ar.

### 2.2.1.3. Sistemas de detecção

Os sistemas de detecção incorporados nas montagens de fluxo multicomutado eram detectores espectrofotométricos, no caso das determinações de pindolol, cloreto e amiloride e detectores fluorimétricos no caso das determinações de ácido fólico e isoniazida: no caso da determinação de pindolol (capítulo 4) foi usado um espectrofotómetro LaboMed modelo Spectro 22RS equipado com uma célula de fluxo Hellma, com um volume óptico de 18  $\mu$ L e um percurso óptico de 1 cm. Este equipamento seria também usado na determinação de cloreto em soluções parenterais (capítulo 5). As

determinações de amiloride (capítulos 7) foram executadas com incorporação na montagem de fluxo de um espectrofotómetro Jenway modelo 6100 equipado com a célula de fluxo anteriormente referida.

Para as determinações de ácido fólico e isoniazida (capítulos 3 e 6) o detector fluorimétrico usado foi um espectrofluorímetro Perkin-Elmer, modelo LS-30 equipado com uma célula de fluxo com o volume óptico de 7  $\mu\text{L}$ .

#### 2.2.1.4. Sistema de controlo

##### 2.2.1.4.1. Aparelhagem

Como unidade central de aquisição e processamento de dados e de controlo do equipamento componente dos sistemas de fluxo multicomutado desenvolvidos, foram utilizados microcomputadores baseados em processadores Intel. Este microcomputadores estavam equipados com 8 Mbytes de memória RAM, placa gráfica VGA ou SVGA, duas portas de comunicação série, uma porta de comunicação paralela, uma unidade de leitura de discos flexíveis de 3,5 polegadas e uma disco rígido. Como periféricos foram associados monitores de vídeo e impressoras de matriz de pontos (Epson LX 800).

A comunicação entre o microcomputador e os diversos componentes das montagens de fluxo, nomeadamente o sistema de inserção (válvulas solenóides e pneumática) e sistema de detecção (espectrofotómetro ou espectrofluorímetro) foi efectuada através de interfaces da marca Advantech, modelos PC-LabCard PCL-812PG e PCL-818L. Estas interfaces possuíam um conversor analógico-digital com uma resolução de 12 bits (aproximações sucessivas), 16 entradas e 16 saídas digitais, 16 entradas analógicas diferenciais e 2 saídas analógicas, sinais de relógio e *triggers* programáveis. As conexões entre a placa de controlo e aquisição de dados e os vários componentes do

sistema analítico foram efectuadas através de uma placa de ligação da marca Advantech PCLD-780.

Para actuação das válvulas solenóides foi desenvolvido um circuito de potência, com base num circuito integrado ULN2003. Este circuito era expandido, quando necessário, de modo a permitir a activação de outros tipos de dispositivos, como foi o caso da lâmpada de UV utilizada na fotodegradação do ácido fólico (Capítulo 3), em que foi necessário recorrer ao seu accionamento temporizado.

#### 2.2.1.4.2. Software

O software de controlo, aquisição e tratamento de dados, foi elaborado especificamente para aplicação nos trabalhos realizados. Tendo em atenção diversos factores, nomeadamente os objectivos do trabalho, a funcionalidade e versatilidade previstas e as características do microcomputador utilizado, as aplicações foram desenvolvidas com recurso a uma linguagem de alto nível, BASIC, implementada tanto em ambiente DOS (QuickBasic 4.5) como em Windows (Visual Basic 3.0). A opção por esta linguagem prendeu-se com o facto desta poder ser utilizada em modo interpretado, o que facilitava a alteração das aplicações. A velocidade de execução permitida por esta linguagem, não apresentou qualquer limitação no que concerne às necessidades de controlo e de aquisição e tratamento de dados.

Em ambiente DOS a implementação das rotinas associadas ao controlo, aquisição e processamento de sinal foi efectuado usando instruções de acesso à memória. Deste modo, o esquema utilizado na programação da comutação das válvulas solenóides teve como base o envio para o endereço atribuído de um valor binário correspondente à saída digital (e por isso à válvula a ela associada) a activar, e foi do tipo:

*OUT PORT%, Y*

...

(sendo *PORT%* a posição de endereço da interface, e *Y* os dados).

Em ambiente *Windows*, o recurso a uma programação por objectos, como acontece com a programação em Visual Basic, possibilitou o desenvolvimento de *software* bastante mais versátil e flexível, em virtude da utilização de *menus* e distintas *janelas*. Para controlo directo do sistema analítico foram desenvolvidas diferentes tipos de aplicações, quer utilizando as rotinas da placa de aquisição (para *Windows*) a partir do *driver* da placa *Advantech Driver API 2.0* e da livraria *Adapi.DLL*, fornecidos pelo fabricante do equipamento, quer através de controlos personalizados (VBX). A utilização das rotinas da placa era baseada num conjunto de funções e estruturas associadas pré-definidas, as quais eram utilizadas, pelas aplicações desenvolvidas em Visual Basic, para controlar a placa de interface. Estas funções eram invocadas sequencialmente, em conformidade com o esquema da Figura 2.3.

Destas funções destacam-se: i) *AdDriverOpen* – função que carrega o *driver* da placa para a memória; ii) *AdGetDevConfigure* – função que configura a placa; iii) *AdDeviceReset* – que reinicializa a placa; iv) *AdChannellnit* – que inicializa cada canal individual para as conversões analógico/digital e para as entradas/saídas digitais; v) *AdIOBySoftTrig* – função que executa as conversões analógico/digital e as entradas/saídas digitais.

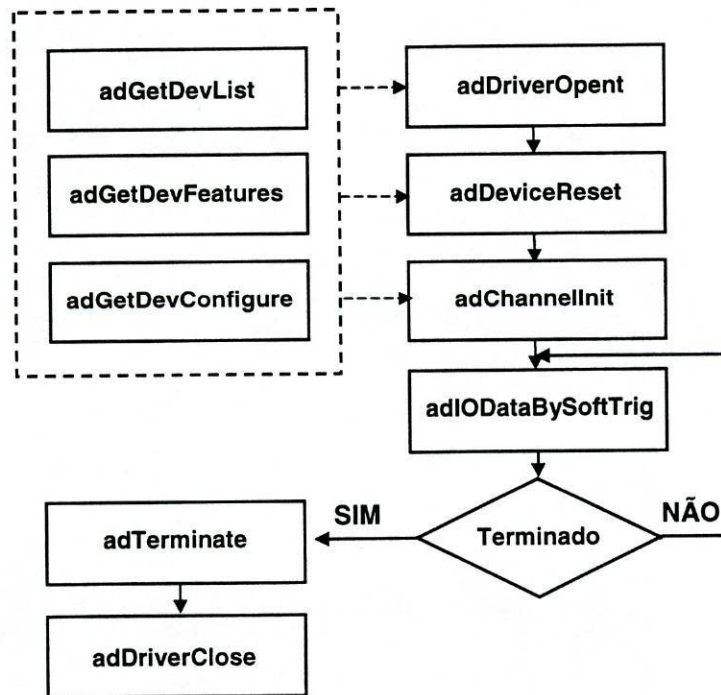


Fig 2.3 – Esquema global da seqüência de acesso às funções da placa de interface.

Cada uma destas funções apresenta os seus parâmetros específicos, incluindo apontadores para as estruturas associadas, as quais contêm informação sobre as características operacionais da placa. Entre estas estruturas associadas destacam-se: i) *Devfeatures* – estabelece todas as características da placa, como por exemplo o tipo de placa, número de entradas e saídas analógicas, número de entradas e saídas digitais, número de bits do conversor analógico-digital, etc; ii) *Devconfigure* – contém toda a informação registada aquando da instalação da placa de interface, como o endereço de memória base, velocidade de comunicação (*baud rate*), frequência do relógio interno, etc; iii) *AOPT* e *AIPT* – estabelece os parâmetros para execução de entradas e saídas analógicas; iv) *DOPT* e *DIPT* - estabelece os parâmetros para execução de entradas e saídas digitais.

Estas funções eram depois integrados na programação dos diferentes comandos-objects proporcionados pelo Visual Basic o que tornava o seu acesso bastante simples, facilitando desta forma a temporização das válvulas injectoras e o controlo de todo o sistema analítico. A programação destas tarefas era ainda mais simplificada quando se recorria a comandos personalizados, os quais permitiam quase que combinar, na mesma fórmula, a simplicidade de programação do QuickBasic com a versatilidade e flexibilidade do ambiente Windows. À semelhança dos comandos padrão do Visual Basic, disponibilizados por rotinas como a THREEED.VBX e a CMDIALOG.VBX, os controlos utilizados eram facilmente programáveis a partir das suas propriedades. Entre estes controlos personalizados destacam-se:

IOPORT1.VBX – Possibilitava, de forma simples e acessível, o envio de comandos de controlo e a aquisição de sinais através da placa PC-LabCard.

HITIME1.VBX – Funcionava como controlo temporizador (*timer*), à semelhança do TIMER.VBX original do Windows, embora fosse bastante mais rápido.

A organização do *software* de controlo foi efectuada de acordo com os objectivos do trabalho, mas tendo como base uma estrutura comum, dominada pela utilização de *menus* do Windows, e da capacidade multitarefa dos Windows 95 e 98. Desta forma era possível, em qualquer altura, a alteração dos parâmetros analíticos, da temporização das válvulas, a visualização da variação do sinal analítico, a análise de registos gráficos anteriores, etc.

#### *2.2.1.5. Optimização e avaliação das montagens de fluxo*

A selecção do valor mais adequado para cada um dos parâmetros que afectam o desempenho da montagem analítica, foi efectuada tendo como fundamento, na maioria das situações, uma 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, designadamente a sensibilidade, reprodutibilidade, ritmo de amostragem e nível de automação, de forma a maximizar a eficiência analítica sem subverter os objectivos do trabalho.

As montagens de fluxo multicomutado desenvolvidas foram avaliadas através da inserção de conjuntos de soluções padrão, com concentrações definidas, o que permitia estabelecer, em função dos sinais analíticos fornecidos pelos sistemas de detecção utilizados, curvas de calibração para a espécie a determinar. Em diversas situações recorreu-se a folhas de cálculo (Microsoft Excel 97) no sentido de simplificar o relacionamento do sinal analítico com a concentração da solução, e efectuar o tratamento estatístico dos pares de valores obtidos, por regressão linear, possibilitando a obtenção de equações que traduziam as relações verificadas, ao mesmo tempo que apresentavam o respectivo coeficiente de correlação [2].

As concentrações das espécies farmacêuticas analisadas foram obtidas, em termos de registo gráfico, em função da intensidade dos sinais analíticos obtidos na detecção de cada amostra. A intensidade de sinal, representativa da concentração da espécie, foi calculada matematicamente em função da média de um conjunto de leituras obtidas por inserções consecutivas da mesma amostra. A concentração final de cada uma das espécies analisadas foi calculada por interpolação gráfica da intensidade de sinal obtida, na recta de calibração estabelecida para cada metodologia. O software desenvolvido, incluía também rotinas de cálculo, as quais já desenvolvidas anteriormente [3], permitiam a elaboração das curvas de calibração e o cálculo da concentração final da espécie em análise.

### **2.3.Métodos de referência**

A avaliação do desempenho das metodologias analíticas desenvolvidas foi efectuada por comparação dos resultados obtidos com os fornecidos pelos métodos de referência, os quais respeitavam as monografias referentes aos fármacos e às fórmulas farmacêuticas que os veiculavam, descritas pelas Farmacopeia Portuguesa [4], Europeia [5], Britânica [6] e dos Estados Unidos [7]. Estas metodologias de referência são referidas especificamente em cada um dos capítulos respectivos.

### **2.4.Preparação das amostras**

As metodologias desenvolvidas foram avaliadas na análise de preparações farmacêuticas disponíveis no mercado português e algumas disponíveis no mercado brasileiro.

As amostras de fármaco puro eram obtidas por solubilização, de quantidades rigorosamente pesadas de fármaco, num solvente apropriado.

Para preparação das amostras das preparações farmacêuticas a submeter a análise, recorria-se ao procedimento descrito nas várias farmacopeias: numa primeira fase era pesado um número significativo de comprimidos (forma farmacêutica normalmente analisada) que eram seguidamente pulverizados. Em seguida tomava-se uma quantidade de pó, exactamente pesada, e procedia-se à extracção do fármaco com um solvente extractor adequado.

## 2.5.Referências

- [1] ] I.M.P.L.V.O. Ferreira, J.L.F.C. Lima, L.S.M. Rocha, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 347 (1993) 314.
- [2] Analytical Methods Committee, *Analyst*, 113 (1988) 1469.
- [3] J.L.M. Santos, Trabalho de síntese para realização de *Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica*, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, 1995.
- [4] Farmacopeia Portuguesa VI - Edição Oficial, INFARMED, Lisboa, 1997.
- [5] European Pharmacopoeia, 3<sup>a</sup> ed., Council of Europe, Strasbourg, 1996.
- [6] British Pharmacopoeia 1988, HMSO, London, 1988.
- [7] U.S. Pharmacopeia, 23<sup>a</sup> ed., U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville MD, 1995.

# **CAPÍTULO 3**

---

## ***DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE ÁCIDO FÓLICO***

O ácido fólico é um elemento do complexo vitamínico B e desempenha um papel fundamental em inúmeros processos metabólicos. Neste capítulo refere-se o desenvolvimento de um procedimento analítico, baseado num sistema de fluxo multicomutado, para determinação de ácido fólico em produtos farmacêuticos. A amostra era inserida no sistema e irradiada no interior da tubagem, por intermédio de luz ultravioleta, ocorrendo a degradação fotoquímica do ácido fólico e a sua conversão num derivado fortemente fluorescente, o que permitia a sua detecção fluorimétrica. Um sistema automático de controlo seleccionava para cada amostra, em função da sua concentração, o tempo de amostragem a utilizar e, portanto, o volume de amostra a analisar. O controlo do volume de amostra inserido no sistema, baseado na utilização de uma amostragem temporizada, permitia controlar efectivamente o nível de dispersão da amostra e adaptá-la à análise de uma gama alargada de concentrações, sem necessidade de introdução de modificações na configuração do sistema analítico.

### 3.1.Introdução

#### 3.1.1.Caracterização do ácido fólico

O ácido fólico, ácido 4-(2-amino-4-hidroxipteridina-6-il)metilamino-benzoil-L-glutâmico (Fig. 3.1) é uma substância cristalina de cor amarela, praticamente insolúvel em água à temperatura ambiente ( $1,6 \text{ g L}^{-1}$ ), embora mais solúvel em água a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), insolúvel em clorofórmio, éter e acetona e razoavelmente solúvel em ácido acético e em soluções alcalinas de hidróxidos e carbonatos [1].

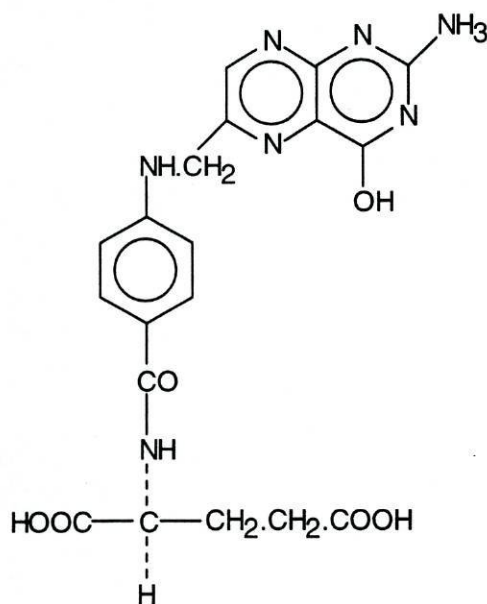


Fig 3.1 Estrutura do ácido fólico.

O ácido fólico é um composto relativamente estável a pH superior a 5, não sendo degradado por aquecimento a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 hora, mas é rapidamente decomposto na correspondente pteridina e em glutamato de p-aminobenzoil a pH inferior a 4. Em

soluções puras é rapidamente inactivado pela luz com formação de glutamato de p-aminobenzoil e de 2-amino-4-hidroxi-6-formilpteridina, a qual é depois convertida em 2-amino-4-hidroxipteridina [1].

O ácido fólico foi pela primeira vez isolado a partir de um extracto de fígado, por Stokstad [2] em 1943, tendo sido depois estabelecida a sua estrutura química e a sua síntese por Angier em 1946 [2].

O ácido fólico encontra-se largamente distribuído na natureza, sendo muito abundante no fígado e razoavelmente abundante nos vegetais verdes, couve-flor e rim [3]. Existe em quantidade reduzida nas raízes dos vegetais, carnes em geral, frutos, legumes secos, cereais e leite. Nas plantas, o ácido fólico encontra-se na forma de poliglutamato conjugado, constituindo uma cadeia gama-polipeptídica com 7 radicais de ácido glutâmico (pteroil-heptaglutamato), enquanto que nos animais (fígado), está, maioritariamente, na forma de conjugado com 5 radicais de ácido glutâmico.

O pteroil-heptaglutamato não é desdobrado pelas enzimas proteolíticas, ao nível do intestino, mas é convertido em pteroil-monoglutamato por acção de hidrolases específicas (pteroil-poliglutamato-hidrolases). É na forma de monoglutamil que se processa a sua absorção intestinal, sendo depois, em grande parte, reduzido para tetrahydrofolato e metilado para N-metil-tetrahydrofolato no interior das células da parede intestinal. No plasma sanguíneo, cerca de 2/3 dos folatos encontram-se ligados a proteínas.

Como substâncias antagonistas, capazes de destruírem o ácido fólico ou impedirem a sua utilização, destacam-se os ácidos 7-metilpteroilglutâmico e 4-amino-pteroil-d(-)-glutâmico.

### 3.1.1.1. Actividade

O ácido fólico actua como agente regulador da maturação dos glóbulos vermelhos e a sua acção foi verificada em todas as anemias macrocíticas, nomeadamente na anemia nutricional do *sprue*, da gravidez e do carcinoma gástrico e igualmente na leucopénia de origem alimentar. A anemia macrocítica com cirrose, associada a situações de alcoolismo, a anemia perniciosa de Addison e a pelagra respondem também favoravelmente a uma terapêutica com ácido fólico. Por outro lado, a anemia aplástica, a leucemia e a anemia por deficiência de ferro são independentes da sua acção. A administração de ácido fólico em situações clínicas de anemia macrocítica faz diminuir progressivamente o número de megaloblastos e de eritroblastos jovens com um concomitante aumento do número de eritroblastos adultos e de normoblastos. O número de reticulócitos, glóbulos vermelhos circulantes e o teor de hemoglobina aumentam igualmente. No entanto, o ácido fólico não evita o aparecimento de lesões nas mucosas, que acompanham a anemia perniciosa, nem as perturbações nervosas relacionadas com a degenerescência aguda da medula.

#### 3.1.1.1.1. Função bioquímica

O ácido fólico é reduzido a tetrahidrofolato pela enzima dihidro-folato-reductase, que utiliza o NADPH como dador de hidrogénio, e após conversão no seu coenzima activo está envolvido na transferência de diferentes unidades monocarbonadas (formil, metileno, metil, etc). Nestas reacções de transferência incluem-se as conversões de três aminoácidos: i) a interconversão da serina e da glicina; ii) o catabolismo da histidina a ácido glutâmico; iii) a conversão da homocisteína a metionina. Participa também no metabolismo da vitamina B<sub>12</sub> e desempenha um papel fundamental na biossíntese das purinas e pirimidinas que intervêm directamente na formação dos ácidos nucleicos.

### 3.1.1.1.2.Sintomas de carência

Uma deficiência nutricional significa uma utilização inadequada de um nutriente, num ou mais sistemas intracelulares, o que impede a manutenção de uma dada função bioquímica a um nível normal. Esta utilização inadequada pode manifestar-se a vários níveis e resultar de um ou da combinação de vários factores: ingestão ou absorção inadequada, ou uma necessidade ou excreção aumentada. Consideram-se nestes exemplos uma alimentação pobre em folatos, destruição dos folatos na preparação culinária dos alimentos, absorção defeituosa por lesão da mucosa do intestino, utilização inadequada pela ausência de co-factores, como a vitamina B<sub>12</sub>, e o aumento da excreção provocado por medicamentos (fenobarbitona, fenitoína, etosuccimida, etc) e álcool [2, 3].

No homem, a deficiência de ácido fólico resulta numa anemia megaloblástica não acompanhada de degenerescência nervosa e é directamente responsável pela insuficiente síntese de ácido nucleicos. Estão também documentados casos de infertilidade, esterilidade e deficiência congénita com atraso mental, além de irritabilidade, sonolência e falta de memória. Os grupos de risco incluem as crianças prematuras, grávidas, idosos doentes com alimentação deficitária e doentes afectados pelo *sprue* tropical.

### 3.1.1.2.Indicações terapêuticas

O ácido fólico é utilizado para prevenir ou tratar as deficiências desta vitamina, que podem ocorrer em diversas patologias ou em alguns estados fisiológicos: anemias macrocíticas de natureza nutricional, *sprue*, gravidez, pelagra, gastrectomia e leucopénia alimentar. A administração clínica de ácido fólico é também utilizada para tratamento das lesões periféricas de aterosclerose, no alívio das dores da angina de peito e na prevenção da recorrência de enfartes do miocárdio. É também utilizado na profilaxia de

malformações da tubo neural (espinha bífida) nomeadamente em mulheres com antecedentes de feto, ou filho, com estas deficiências, e no tratamento da anemia megaloblástica, anemia hemolítica congénita, em certas dermatoses (psoríase, queilose angular), situações inflamatórias crónicas (artrite reumatóide, doença de Crohn), carências folicas iatrogénicas (resultantes da administração de determinados fármacos como barbitúricos, anti-convulsivantes, anovulatórios, etc) e alcoolismo [2, 3].

A via de administração normal é a via oral, em doses de 3 a 20 mg diários, podendo ser também utilizada a via parentérica, preferencialmente intramuscular, utilizando o sal sódico na dose de 15 mg, ou mesmo mais, por dia.

### **3.1.2.Métodos de análise**

Dado o papel essencial desempenhado pelo ácido fólico num conjunto alargado de processos metabólicos, já referidos anteriormente, são em número elevado as metodologias analíticas desenvolvidas para a sua identificação e quantificação, quer em preparações farmacêuticas quer em amostras biológicas.

No que concerne às técnicas espectrofotométricas, foram propostas metodologias que envolvem a decomposição do ácido fólico, por reacção com o zinco em meio ácido, numa pteridina e no ácido p-aminobenzoilglutâmico. Os grupos amina aromática são depois sujeitos a uma reacção de diazotização com o  $\text{NaNO}_2$ , seguido de reacção com a N-(1-naftil)etilenodiamina e determinação da absorvância do composto formado a 550 nm [4]. Esta metodologia seria depois adoptada como metodologia recomendada para determinação de ácido fólico pelas Farmacopeias Portuguesa [5], Britânica [6] e Europeia [7]. O zinco, em meio ácido, foi também usado como redutor para conversão do ácido fólico na 2,4,5-triamino-6-hidroxipirimidina, a qual reage depois com a ninidrina com quantificação do composto formado a 550 nm [8]. Outro trabalho [9] propõe três métodos para determinação de ácido fólico após redução com o zinco, em que são utilizados como

reagentes de desenvolvimento de cor uma solução etanólica de dimetilamino cinamaldeído, com determinação da absorvância do produto formado a 520 nm, NaNO<sub>2</sub> e floroglucinol com determinação da absorvância a 450 nm e finalmente, NaOH, fenol e NaClO, com determinação da absorvância a 610 nm.

A utilização da espectrofluorimetria para determinação de ácido fólico foi proposta pela primeira vez por Wittle *et al.* em 1947, referindo que, a oxidação do ácido fólico pelo permanganato de potássio ou ácido clórico produzia um sólido amarelo fortemente fluorescente [10] caracterizado pelas propriedades físicas e químicas duma pteridina. Em 1949, Allfrey *et al.* [11], confirmam estes resultados referindo que por oxidação com KMnO<sub>4</sub> o ácido fólico é convertido na 2-amino-4-hidroxi-6-carboxipteridina, um composto que apresenta uma elevada fluorescência a 470 nm quando irradiado por luz a 365 nm. Mais tarde, em 1970, este método foi revisto e otimizado por Hazlett e Kildsing [12] em função das diferentes variáveis envolvidas na reacção de oxidação, como sejam a concentração de permanganato, tempo, pH e temperatura da reacção. Mais recentemente, foram propostos dois métodos fluorimétricos baseados na utilização da fluorescamina como reagente fluorogénico em solução aquosa [13] e micelar [14].

A utilização de métodos cromatográficos para determinação de ácido fólico, com recurso a diferentes tipos de detectores, está amplamente divulgada, sobretudo no que diz respeito à análise de amostras biológicas e por força da importância que a monitorização dos níveis de ácido fólico tem em termos de bioquímica clínica. Em 1977, Reif *et al.* propuseram uma metodologia para determinação de pureza do ácido fólico [15] por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), a qual seria depois adoptada pela Farmacopeia dos Estados Unidos [16]. Em 1981, Holcomb *et al.* [17] e Tafolla *et al.* [18] propuseram metodologias semelhantes para determinação de ácido fólico em preparações farmacêuticas contendo fórmulas multivitamínicas e minerais, o mesmo acontecendo com Paveenbampen *et al.* em 1986 [19]. A análise do ácido fólico por HPLC foi também proposta por Ichinose *et al.* [20] num processo que envolvia a conversão deste

composto na respectiva pteridina fluorescente, por oxidação com  $\text{KMnO}_4$ , e detecção fluorimétrica. Mais recentemente, Akhtar *et al.* propuseram a utilização do HPLC para determinação de ácido fólico e dos seus produtos de fotodegradação, na presença de riboflavina [21].

Um conjunto de técnicas analíticas que rivalizam com a cromatografia em número de publicações científicas envolvendo a determinação de ácido fólico, é o que engloba as técnicas electroquímicas. Assim, voltametria aplicada à análise de preparações farmacêuticas [22], [23] e [24], de soro [25] e urina [22] e uma metodologia em fluxo [26], e polarografia para análise de produtos farmacêuticos [27] e [28] são exemplos de trabalhos publicados nesta área.

Outras técnicas alternativas incluem as determinações radioquímicas, fundamentalmente para análise de amostras biológicas, como soro [29], plasma [30] e urina [31], e também os ensaios microbiológicos [32]. Um conjunto de técnicas que são objecto de um crescente interesse são as técnicas quimiluminométricas, também elas propostas para determinação de ácido fólico em formulações farmacêuticas, como seja o caso da reacção do ácido fólico com o cério(IV), em meio ácido, implementada com recurso a um sistema de análise por injeção em fluxo [33].

### **3.1.3. Reacções fotoquímicas**

São inúmeros os compostos farmacêuticos que apresentam fotossensibilidade, quer no estado sólido, quer em solução, o que permite explorar a utilização de uma fonte de luz como processo de induzir ou acelerar a sua decomposição fotoquímica, e implementá-la como processo analítico [34].

A luz tem características que a tornam o “reagente” ideal para a implementação de uma processo analítico, pois dependendo da estrutura química da espécie em análise, é possível promover a sua oxidação, redução, hidrólise ou submetê-la a várias outras

reações, de modo a que o produto final apresente propriedade cromóforas, fluoróforas ou outras de modo a tornar a sua detecção mais favorável [34]. Estas características, combinadas com as aptidões das técnicas de fluxo, permitem desenvolver metodologias de elevado potencial analítico com atributos que incluem: desenvoltura, simplicidade, sensibilidade, selectividade, reprodutibilidade, facilidade de automatização e baixo custo.

No entanto, para que estes objectivos sejam atingidos é necessário ter em consideração determinados pressupostos, como sejam: i) Os produtos formados devem apresentar características, como por exemplo uma adequada estabilidade, de modo a permitir a sua detecção; ii) a fonte de luz deve apresentar elevada estabilidade operacional de forma a assegurar a reprodutibilidade das medidas; III) o sistema deve possuir elevada eficiência de fotoconversão; iv) os produtos formados não devem apresentar uma elevada absorção nos comprimentos de onda de activação da reacção fotoquímica.

A utilização da luz como elemento promotor de uma reacção química, em que normalmente se pretende transformar o analito num produto mais facilmente detectável, tem sido objecto de um vasto campo de aplicações, tanto em termos de espécies analisadas como de metodologias envolvidas, sejam elas métodos cinéticos, cromatográficos, espectrofotométricos, fluorimétricos, etc.

No que diz respeito a metodologias em fluxo, dedicadas especificamente à análise de produtos farmacêuticos, em 1991 Chen *et al.* propuseram um sistema de degradação fotoquímica com detecção fluorimétrica para determinação individual [35] e simultânea de fenotiazinas [36]. No mesmo ano, Calatayud *et al.* propuseram um sistema semelhante para determinação de reserpina [37], e no ano seguinte um outro para determinação de clorpromazina [38]. Posteriormente surgiram outros trabalhos, baseados em derivatização fotoquímica em fluxo, aplicados a um conjunto de fármacos em que se incluem a prometazina [39], sulfamidas [40], ácido ascórbico [41, 42], tiamina [43],

epinefrina e L-Dopa [44], ergometrina [45], riboflavina [46] e mais recentemente, tioridazina [47], nicotinamida [48], menadiona [49] e tiamina [50].

#### **3.1.4. Objectivo**

A implementação de reacções fotoquímicas em fluxo revela-se extremamente útil e vantajosa para análise de produtos farmacêuticos. A sua utilização em conjunto com um detector convencional de fluorescência apresenta grande potencial analítico, em virtude da sensibilidade, simplicidade e selectividade alcançadas. Estes aspectos positivos são reforçados quando a montagem de fluxo apresenta as vantagens acrescidas da multicomutação, como sejam a versatilidade, baixo consumo de reagentes, simplicidade e possibilidade de inserção de uma grande variedade de volumes de amostra. Estes atributos, em combinação com um sistema automático de controlo, permitem a obtenção e utilização simultânea de múltiplas curvas de calibração e a determinação automática de ácido fólico numa intervalo alargado de concentrações.

### **3.2. Parte Experimental**

#### **3.2.1. Reagentes e soluções**

As soluções padrão de ácido fólico foram obtidas a partir do sólido (Sigma-Aldrich, ref. F7876), o qual foi utilizado sem qualquer tratamento prévio. Uma solução padrão 500,0 mg L<sup>-1</sup> foi preparada semanalmente por dissolução de 50,0 mg de ácido fólico em NaOH 0,1 M, seguido de diluição até 100 mL com água bidesionizada. Esta solução era guardada no frigorífico e protegida da luz, devido à fotossensibilidade do ácido fólico [1]. As soluções padrão de trabalho, utilizadas para elaboração das curvas de calibração,

foram obtidas por diluição da solução anterior com tampão ácido acético/acetato com a concentração de 0,01 M e pH=5.

### **3.2.2. Equipamento**

Na montagem de fluxo, como instrumento de medida para determinação da intensidade de fluorescência ( $\lambda_{ex}=356$  nm,  $\lambda_{em}=445$  nm), foi utilizado um espectrofluorímetro da marca Perkin-Elmer, modelo LS-30, equipado com uma célula de fluxo com um volume óptico de 7  $\mu$ L.

A montagem de fluxo multicomutado era constituída por 3 válvulas solenóides de 3 vias, NResearch, modelo 161 T031, as quais foram já caracterizadas no Capítulo 2.

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

A irradiação das soluções foi executada com o auxílio de uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão Philips, modelo TUV 15W/G15T8, com uma potência de 15 W, a qual emitia radiação a um comprimento de onda de 254 nm. De forma a evitar a exposição do operador à radiação emitida pela lâmpada, foi concebido um invólucro de protecção, constituído por uma tubagem em alumínio, extensível, com um diâmetro interno de, aproximadamente, 15 cm, no interior da qual foi colocada a lâmpada de ultravioleta. Esta foi montada em suportes semelhantes aos utilizados para lâmpadas de descarga. As extremidades do tubo metálico foram fechadas usando papel de alumínio. O reactor penetrava no interior do tubo de alumínio através de dois pequenos orifícios laterais, tendo sido enrolado na lâmpada ultravioleta de forma a aumentar a eficiência da irradiação. No entanto, esta colocação tinha como desvantagem um aumento da temperatura do reactor, o que obrigou à colocação de um ventilador numa das extremidades do tubo de alumínio, de forma a promover o seu arrefecimento.

A propulsão das soluções foi realizada por aspiração, em canal único, por intermédio de uma bomba de pistão da marca Razel, modelo A-99, o qual estava equipado com uma seringa de plástico com uma capacidade de 50 mL.

### 3.2.3. Montagem de fluxo multicomutado

A montagem de fluxo foi idealizada de forma a obter-se um sistema analítico simples, versátil e com elevada eficiência analítica e que fosse ao mesmo tempo de fácil controlo e automatização. A análise dos objectivos propostos resultou na implementação de uma montagem de fluxo multicomutado com 3 válvulas solenóides de 3 vias (Fig 3.2).

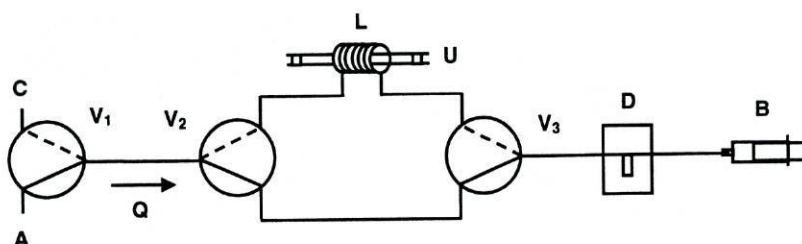


Fig 3.2 – Montagem de fluxo multicomutado com lâmpada de UV para degradação fotoquímica: A - amostra; C - solução transportadora, tampão acetato, pH = 5; V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub> e V<sub>3</sub> - válvulas solenóides, as linhas contínuas correspondem à posição 2 e o tracejado à posição 1; L - reactor enrolado, 2 m de comprimento; U - lâmpada de ultravioleta; D - detector; B - bomba de pistão; Q - caudal, 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

Dada a inexistência de solução reagente, uma vez que a reacção era desencadeada por acção da radiação ultravioleta, as duas únicas soluções a introduzir no sistema analítico eram a solução de amostra e a solução transportadora. Assim sendo, a primeira válvula, V<sub>1</sub>, era a responsável pela inserção alternada destas soluções. A segunda

válvula,  $V_2$ , dividia o percurso analítico em dois percursos alternativos: um mais extenso, através da lâmpada de ultravioleta, e um segundo, muito curto, que estabelecia uma ligação à terceira válvula solenóide,  $V_3$ , para lavagem e substituição da amostra. Esta terceira válvula fazia a convergência dos dois percursos anteriores, num percurso único que incluía o detector e que terminava na bomba de pistão responsável pela propulsão das duas soluções.

O processo analítico era iniciado pela inserção de amostra, em  $V_1$ , durante um tempo de amostragem ( $t_a$ ) pré-definido de acordo com o procedimento de calibração. O tempo de amostragem definia o intervalo de tempo em que a válvula responsável pela inserção da amostra ( $V_1$ ) permanecia na posição da amostra. A calibração era baseada na utilização consecutiva de 3 tempos de amostragem crescentes, que permitiam, em função do caudal, a inserção de 3 volumes crescentes de amostra. Uma vez que o grau de diluição a que a zona de amostra estava sujeita no interior do sistema de fluxo era dependente do volume inserido, cada um dos tempos de amostragem foi estudado de forma a possibilitar a determinação de ácido fólico numa gama particular e delimitada de concentrações. Assim, o menor  $t_a$  foi utilizado para estabelecer o intervalo de concentrações mais elevadas, visto que ao menor volume de amostra inserido correspondiam os mais elevados valores de diluição obtidos, por força da superior dispersão, o que possibilitava a análise das amostras mais concentradas. Um  $t_a$  mais elevado que o anterior foi empregue na definição do intervalo correspondente a valores intermédios de concentração, através da inserção de padrões de concentração intermédia. E finalmente o terceiro  $t_a$ , com o valor mais elevado de todos, correspondendo ao maior volume de amostragem, foi utilizado na análise do grupo de soluções padrão com menor concentração para estabelecer o intervalo inferior de concentrações.

Após a calibração, e na fase de análise de amostras propriamente dita, o sistema utilizava como tempo de amostragem padrão o  $t_a$  correspondente ao intervalo intermédio de concentrações. Caso o sinal obtido apresentasse um valor não coincidente com o

intervalo de sinais analíticos estabelecido para esta gama de concentrações a análise era automaticamente repetida a um novo tempo de amostragem. O valor deste novo  $t_a$  era seleccionado autonomamente pelo sistema e seria o de menor valor, se o sinal analítico excedesse o intervalo referido, ou o de valor mais elevado, no caso do sinal analítico apresentar valores inferiores aos do referido intervalo. Desta forma, o sistema avaliava a concentração da amostra comparativamente com o intervalo de concentrações intermédias, e decidia a sua maior ou menor diluição, agindo em conformidade em termos de selecção de um novo  $t_a$ . O sistema analítico tinha por isso autonomia para decidir, em função do sinal analítico e por conseguinte da concentração da amostra, qual o  $t_a$  mais adequado á análise.

A temporização do accionamento das válvulas durante a execução do processo analítico era efectuada do seguinte modo:  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  estavam inicialmente na posição 1 (Fig 3.2), e a solução transportadora fluía através do reactor (L) e do detector (D).  $V_1$  era depois colocada na posição 2, processando-se a inserção da amostra durante o  $t_a$  definido, ao fim do qual  $V_1$  era novamente colocada na posição da solução transportadora, sendo a zona de amostra encaminhada para irradiação em  $L_1$  e depois para detecção. Após a detecção,  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  eram accionadas simultaneamente para a posição 2, durante 10 s, ocorrendo a substituição da amostra em análise através do reactor mais curto  $L_2$ . Depois  $V_1$  era colocada novamente na posição 1 para lavagem, o mesmo acontecendo em seguida com  $V_2$  e  $V_3$ , para continuação do processo analítico.

Como já foi referido anteriormente, o reactor onde se processava a fotodegradação ( $L_1$ ) foi enrolado na lâmpada de ultravioleta de forma a aproximá-lo o mais possível da fonte de radiação e assim aumentar a eficiência da irradiação, aumentando por conseguinte a extensão da reacção. No entanto esta estratégia teve como efeito adicional o aquecimento do reactor, por força do calor produzido pela lâmpada, aquecimento este que, conjugado com a propulsão das soluções por aspiração, originava o aparecimento de bolhas no interior das tubagens, as quais impossibilitavam ou

limitavam a detecção. Por este motivo foi colocado um ventilador numa das entradas do tubo que continha a lâmpada de ultravioleta, o qual forçava a passagem do ar exterior pelo tubo, promovendo o arrefecimento do reactor. Por outro lado, e tendo em consideração que só ocorria fotodegradação aquando da passagem da zona de amostra pelo reactor enrolado, temporizou-se o funcionamento da lâmpada. Esta temporização era efectuada de forma automática e controlada pelo computador, tendo sido concebido um circuito eléctrico que permitia ligar a lâmpada aquando da injeção da amostra, e desligá-la quando se iniciava a detecção. Desta forma a lâmpada era ligada apenas durante a passagem da zona de amostra pelo reactor L<sub>1</sub>, permanecendo desligada durante as outras fases da análise, como a detecção, a substituição da amostra e a fase de lavagem, o que permitia o seu arrefecimento, e o concomitante arrefecimento do reactor. Esta operação não afectava o desempenho da lâmpada, não sendo registada nenhuma diferença na intensidade de fluorescência, quer a lâmpada permanecesse ligada continuamente, quer fosse apenas ligada aquando da injeção da amostra. O efeito negativo do aumento da temperatura devido ao calor emitido pela lâmpada, ao nível do aparecimento de bolhas na montagem, foi a razão fundamental de não terem sido utilizadas lâmpadas com um potência superior a 15 W, visto que este aumento de potência se iria traduzir num incremento da temperatura e no agravar das condições limitantes da detecção.

No que se refere à propulsão da amostra e da solução transportadora, a qual era constituída por uma solução de ácido acético/acetato de sódio 0,01 M, com o pH ajustado a 5,0, foi utilizado um caudal de 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

### 3.2.4. Método de referência

As preparações farmacêuticas de ácido fólico analisadas, foram Folicil, com uma dosagem de 10 mg de ácido fólico por comprimido, e Endofolin, com uma dosagem de 5 mg de ácido fólico por comprimido. A preparação das soluções de amostra foi efectuada por pesagem e pulverização de 20 comprimidos de cada uma das formulações analisadas, tendo sido depois tomadas quantidades apropriadas de pó que foram dissolvidas em NaOH 0,1 M, seguido de diluição até 500 cm<sup>3</sup> com tampão ácido acético/acetato 0,01M, pH=5. As soluções de amostra eram filtradas antes de se proceder à sua análise.

A determinação de ácido fólico, no fármaco sólido e na forma de comprimidos, foi efectuada de acordo com a Farmacopeia Portuguesa [5]. Este método é baseado no procedimento proposto por Hutchings *et al.* [4] o qual consiste na decomposição do ácido fólico numa pteridina e no ácido p-aminobenzoilgluâmico, por redução com zinco em meio ácido, seguido da determinação dos grupos amina aromática por diazotização com NaNO<sub>2</sub> e combinação com a N-(1-naftil)etilenodiamina, com formação de um composto corado cuja absorvância é medida a 550 nm.

As determinações espectrofotométricas de ácido fólico foram executadas com recurso a um espectrofotómetro da marca Hitachi modelo U-2000.

### 3.3. Resultados e sua discussão

O trabalho desenvolvido por Wittle *et al.* [10] demonstrando que a degradação oxidativa do ácido fólico produzia um composto fortemente fluorescente, o que seria depois confirmado por Allfrey *et al.* [11] e por Hazlett e Kildsing [12], conjuntamente com o potencial analítico apresentado pelas reacções fotoquímicas na análise de um conjunto

alargado de produtos farmacêuticos, motivaram a implementação de uma metodologia de fluxo multicomutado para a determinação fotoquímica-fluorimétrica de ácido fólico.

Ensaio preliminares para avaliar o efeito da radiação ultravioleta sobre uma solução de ácido fólico, demonstraram que esta solução, após irradiação, apresentava uma intensidade de fluorescência fortemente aumentada. Estes ensaios foram executados por colocação de um pequeno goblet contendo a solução a ensaiar, directamente por baixo de uma lâmpada de UV, com uma potência de 8 W, normalmente utilizada para análise de placas de cromatografia em camada fina, e envolviam tempos de exposição de cerca de 1 hora.

Estes primeiros resultados estavam de acordo com os obtidos por Wittle *et al.* e por Allfrey *et al.*, que referiam que a oxidação do ácido fólico pelo permanganato produzia uma pteridina fortemente fluorescente, o que poderia explicar o forte aumento de fluorescência apresentado pela solução de ácido fólico irradiada.

A transposição da reacção para um sistema de fluxo, mais propriamente para o interior de uma tubagem enrolada à volta da lâmpada de ultravioleta, permitiu aumentar a eficiência da irradiação, comparativamente com os ensaios efectuados em goblet, aumentando deste modo a extensão da fotodecomposição e, concomitantemente, a intensidade de fluorescência da solução. Os resultados obtidos com uma solução padrão de ácido fólico  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , aspirada continuamente em direcção ao detector e depois sujeita a crescentes intervalos de irradiação por paragem do fluxo, demonstraram que a intensidade de fluorescência aumentava à medida que aumentava o intervalo de irradiação (Fig 3.3), e que, com tempos de exposição de 10 min o acréscimo de fluorescência obtido, mesmo com uma lâmpada de 8 W, era significativo.

Estes resultados permitiam antever que a utilização de lâmpadas com superior potência resultaria num aumento da intensidade da irradiação, aumentando a extensão da reacção, ao mesmo tempo que possibilitavam a redução do tempo de exposição necessário para obter os produtos de fotodegradação desejados. A utilização de uma

lâmpada de 15 W confirmou este pressuposto, demonstrando que a reacção fotoquímica era dependente da intensidade da radiação. Esta lâmpada, era, à semelhança da de 8 W, uma lâmpada de baixa pressão, de fácil aquisição, instalação e operação.

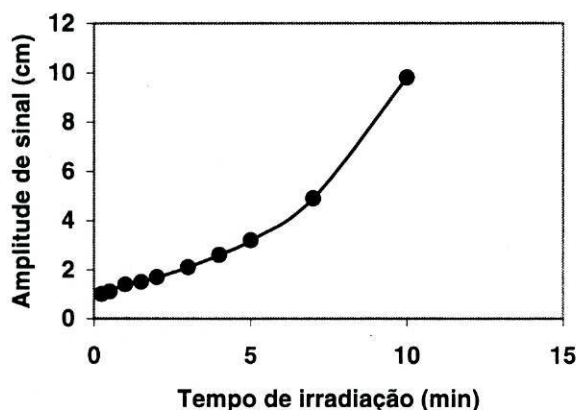


Fig 3.3 – Influência do tempo de irradiação na intensidade de fluorescência de uma solução padrão de ácido fólico  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , com uma lâmpada de UV de 8 W.

Uma análise mais aprofundada dos produtos de fotodegradação revelou que possuíam dois máximos de excitação, a 274 e a 356 nm, e um único máximo de emissão a 445 nm. Comparativamente com outros trabalhos anteriormente publicados, verificou-se que estes máximos de absorção e de emissão, eram semelhantes aos obtidos por Allfrey *et al.* [11] durante a degradação oxidativa do ácido fólico, os quais eram, respectivamente, de 365 e 470 nm, embora neste trabalho a selecção dos comprimentos de onda fosse efectuada com recurso a filtros, portanto com inferior precisão. Eram no entanto quase coincidentes com os obtidos por Hazlett e Kildsig [12] num trabalho visando o desenvolvimento de um método fluorimétrico para determinação de ácido fólico, também por tratamento com permanganato, e que eram, respectivamente, de 275 e 375 nm para a excitação, e de 445 nm para a emissão. Ichinose *et al.* [20], utilizaram por outro lado, com

HPLC e derivatização por oxidação com permanganato com detecção fluorimétrica, comprimentos de onda de excitação e de emissão de 295,5 e 439,6 nm, respectivamente. Em função deste resultados concluiu-se que a irradiação de uma solução de ácido fólico com radiação UV conduzia à decomposição do ácido fólico, num processo semelhante à degradação oxidativa com permanganato, levando à formação, como acontece com este, de uma pteridina fortemente fluorescente. Desta forma, com a formação da pteridina registava-se um acentuado incremento da intensidade de fluorescência, em comparação com a fluorescência nativa do ácido fólico. Estes resultados [51] seriam mais tarde confirmados por um trabalho de Akhtar *et al.*, publicado em 1999 [52], onde refere que a radiação ultravioleta converte o ácido fólico na 2-amino-4-hidroxi-6-formilpteridina e no ácido p-aminobenzoil-L-glutâmico.

### **3.3.1. Optimização da montagem de fluxo**

Durante a execução dos ensaios preliminares com a lâmpada de 8 W, para avaliação do efeito da radiação ultravioleta na solução de ácido fólico, observou-se, como já foi referido, que a intensidade de fluorescência aumentava com o tempo de exposição, e que a eficiência da irradiação era superior quando a reacção ocorria no interior de uma tubagem enrolada na referida lâmpada.

Para avaliar a influência do tempo de irradiação na fluorescência da amostra, quando era utilizada uma lâmpada de 15 W, foram feitas experiências em que se inseria continuamente uma solução padrão de ácido fólico  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo depois o fluxo sujeito a paragem e a amostra irradiada durante intervalos de tempo crescentes, após os quais o fluxo era retomado e processada a detecção. A utilização de uma solução padrão com uma concentração de ácido fólico marcadamente inferior à ensaiada com a lâmpada de 8 W ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), justificava-se pela maior sensibilidade analítica proporcionada pela superior potência da segunda lâmpada. Verificou-se que a intensidade de fluorescência aumentava

com o tempo de irradiação sendo obtido um valor máximo com um tempo de irradiação de 4 min, e que com tempos superiores a fluorescência decrescia ligeiramente, tendendo para a estabilização (Fig 3.4).

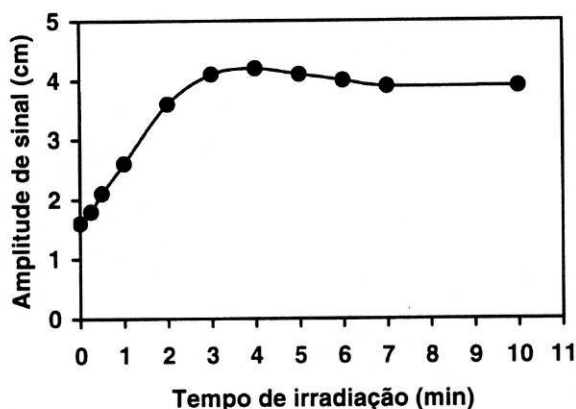


Fig 3.4 – Influência do tempo de irradiação na intensidade de fluorescência de uma solução padrão de ácido fólico  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , com uma lâmpada de UV de 15W.

A escolha do tempo de irradiação ideal para a execução da análise, o que condicionaria, por exemplo, a opção entre uma estratégia de paragem de fluxo ou uma estratégia em modo contínuo, portanto sem paragem, foi efectuada em função de três pressupostos: a maximização do sinal analítico, a qual não deveria comprometer, desejavelmente, nem a reprodutibilidade nem o ritmo de amostragem. De facto, elevados sinais analíticos, que estariam dependentes da utilização de tempos relativamente longos de exposição, poderiam ser obtidos quer com paragem de fluxo, quer com a utilização de baixos caudais ou, alternativamente, reactores de grande comprimento.

A paragem do fluxo teria como efeito colateral a diminuição do ritmo de amostragem, enquanto que a redução do caudal ou o aumento do tamanho do reactor, resultaria num incremento indesejável do valor da dispersão, que teria efeitos contraproducentes em termos de sinal analítico, além de afectar também o ritmo de amostragem. Concomitantemente, foi seleccionado um caudal de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , o qual, combinado com um reactor de 2 m, possibilitou um tempo de residência, em modo contínuo, de 2 min. Este tempo de residência, não fornecendo um sinal analítico máximo, permitiu no entanto uma adequada exposição das soluções de ácido fólico à radiação UV, resultando assim na obtenção de um compromisso entre sinal analítico e ritmo de amostragem. A utilização de reactores mais curtos, ao mesmo tempo que reduziria a intensidade de fluorescência, por diminuição do tempo de exposição, poderia afectar de igual modo a reprodutibilidade dada a limitada dispersão da amostra no interior do reactor.

Uma das variáveis importantes, em termos de intensidade do sinal analítico, é o volume de amostra inserido no sistema de fluxo. Uma das características da multicomutação, que representa uma mais-valia em comparação com os sistemas FIA convencionais, é a inserção da amostra com base numa contagem de tempo. Assim, em vez do volume de amostra a inserir ser definido com base no tamanho do alça (*loop*) de injeção, como acontece com o FIA, estabelece-se o tempo de amostragem ( $t_a$ ), ou seja, o tempo durante o qual a válvula solenóide responsável pela inserção da amostra permanece, ou aberta, caso seja exclusiva da amostra, ou na posição da amostra, caso esteja também ligada à solução transportadora ou a qualquer outra solução reagente. Desta forma, compatibilizando o tempo de amostragem com o caudal, é possível estabelecer qualquer valor de volume de amostragem, sem que seja necessário introduzir qualquer alteração física na montagem de fluxo.

A influência do tempo de amostragem foi avaliada por inserção de vários padrões de ácido fólico, com concentrações diversas, a diferentes  $t_a$ . Observou-se que controlando o tempo de amostragem obtinha-se um controlo efectivo dos valores da dispersão, e por

isso dos níveis de diluição conseguidos, o que possibilitava a determinação de ácido fólico numa ampla gama de concentrações. Assim, as amostras mais concentradas, e que requeriam por isso uma superior diluição, eram analisadas com base na inserção no sistema de volumes reduzidos, o que era conseguido utilizando reduzidos tempos de amostragem. Pelo contrário, a diluição das amostras menos concentradas era atenuada pela inserção de volumes maiores, e em conformidade, pela utilização de tempos de amostragem mais elevados. Estas constatações ilustram, como já foi referido anteriormente, uma das grandes vantagens da amostragem temporizada (característica da multicomutação e também da SIA), que consiste na possibilidade de variação quase ilimitada do volume de amostragem, permitindo um amplo controlo sobre a diluição da amostra. Como pode ser verificado na Figura 3.5, a inserção de um padrão de ácido fólico com a concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , a tempos de amostragem crescentes, produz sinais analíticos cada vez mais elevados até  $t_a=25 \text{ s}$ . Com  $t_a$  entre 25 e 40 s o aumento mantém-se, embora de forma muito menos pronunciada e após 40 s o sinal aproxima-se da estabilização.

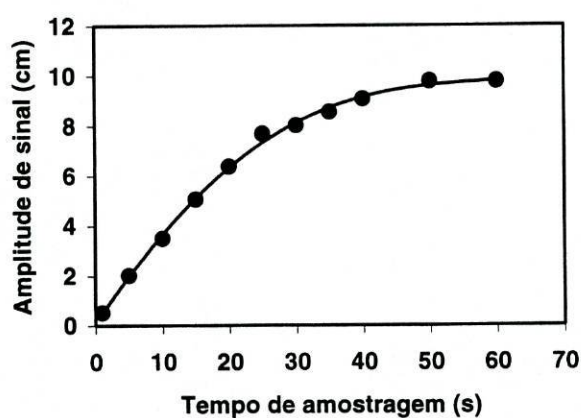


Fig 3.5 – Influência do tempo amostragem ( $t_s$ ) na intensidade de fluorescência de uma solução padrão de ácido fólico  $1 \text{ mg L}^{-1}$ .

Mais ainda, a utilização de um  $t_a=1$  s (o qual corresponde a um volume de amostragem de aproximadamente  $8,3 \mu\text{L}$  para um caudal de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ) permitiu obter uma relação linear entre concentração e intensidade de fluorescência para uma gama de concentrações compreendidas entre  $10$  e  $40 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabela 3.1). Para valores de concentração inferiores a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  o sinal analítico não era mensurável e acima de  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , a detecção era impossível visto ocorrer saturação do detector. A utilização de  $t_a=5$  s (o qual corresponde a um volume de amostragem de aproximadamente  $42 \mu\text{L}$  para igual caudal) possibilitou a determinação de um intervalo de concentrações compreendidas entre  $2$  e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (concentrações fora destes intervalo estavam sujeitas às limitações de detecção anteriormente referidas), enquanto que um  $t_a=25$  s (o que equivale a um volume de amostragem de aproximadamente  $208 \mu\text{L}$ ) foi utilizado para analisar soluções com concentrações entre  $0,1$  e  $2 \text{ mg L}^{-1}$ .

Tabela 3.1 – Parâmetros das curvas analíticas obtidas com a metodologia desenvolvida na determinação de ácido fólico, para distintos tempos de amostragem.

Tempo de amostragem (s)	Intervalo de concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Declive	Abcissa na origem	Coefficiente de Regressão	R.S.D.* (%)	Ritmo de amostragem (amostra $\text{h}^{-1}$ )
1	10 - 40	0,1140	0	0,9995	3,0	28
5	2 - 10	0,3529	0,0191	0,9993	3,0	25
25	0,1 - 2	1,6992	-0,0277	0,9978	3,0	22

R.S.D. – Desvio padrão relativo.

Observou-se também que a inserção de padrões de 1, 2 e 3 mg L<sup>-1</sup>, a tempos de amostragem compreendidos entre 5 e 25 s, permitia obter relações lineares entre tempo de amostragem e intensidade de fluorescência (Fig 3.6). Este resultado está de acordo com o referido por Ruzicka e Hansen [53] de que para sistemas com coeficientes de dispersão médios e elevados, a altura de sinal é proporcional ao volume de amostragem, para volumes de amostra inferiores ao volume necessário para obter um sinal equivalente a metade do sinal correspondente ao estado estacionário ( $S_{1/2}$ ), o que transposto em termos de tempo de amostragem equivale a dizer, um tempo de amostragem metade do necessário para obter um estado estacionário.

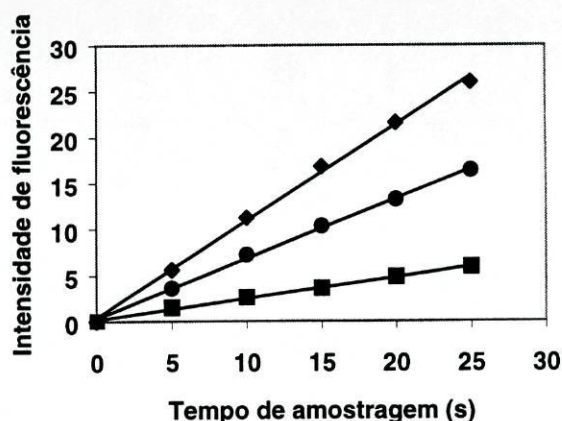


Fig 3.6 – Variação da intensidade de fluorescência, para tempos de amostragem entre 5 e 25 s, com três soluções padrão de ácido fólico: ◆ - 3 mg L<sup>-1</sup>; ● - 2 mg L<sup>-1</sup>; ■ - 1 mg L<sup>-1</sup>.

A utilização do modo contínuo demonstrou não existir nenhuma interdependência entre tempo de amostragem e comprimento do reactor, como aconteceria caso se optasse por uma estratégia de paragem de fluxo, visto que, independentemente do comprimento do reactor utilizado, todas as zonas de amostra estão sujeitas ao mesmo tempo de

irradiação, que coincide com a sua passagem pela lâmpada. Caso se utilizasse a paragem de fluxo, o tempo de amostragem máximo utilizável, seria aquele que permitisse um volume de amostra coincidente com o volume interno do reactor enrolado, pois só assim seria possível assegurar que todas as zonas de amostra eram irradiadas de igual modo. Por outro lado seria necessário assegurar que a paragem do fluxo eram realizada de forma reprodutível, o que não sendo muito complicado de implementar, constituiria uma dificuldade suplementar.

Um parâmetro importante com influência directa no processo de fotodegradação, e por isso na intensidade de fluorescência, é o pH. A influência do pH em termos de desenvolvimento da reacção foi avaliada por inserção de várias soluções padrão de ácido fólico, com uma concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , as quais foram preparadas em diferentes meios, de forma a obterem-se, no final, diferentes valores de pH. Foram assim ensaiadas, soluções de ácido fólico preparadas em água desionizada,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M, ácido acético/acetato de sódio, tampão ftalato,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  e carbonato de sódio 0,1 M, com utilização de tempos de amostragem entre 15 e 30 s. Como soluções transportadoras foram empregues as mesmas soluções originalmente utilizadas para preparar os padrões de ácido fólico. Os resultados obtidos demonstraram que um máximo de intensidade de fluorescência é conseguido em meio ácido acético/acetato de sódio a um  $\text{pH}=5$  (Fig 3.7).

Após dimensionamento e optimização da metodologia desenvolvida, foram obtidas curvas de calibração correspondentes a 3 diferentes tempos de amostragem, os quais permitiram estabelecer 3 intervalos de concentrações (Tabela 3.1), de modo a definir um intervalo global de resposta linear concentração/intensidade de fluorescência com valores compreendidos entre  $0,1$  e  $40 \text{ mg L}^{-1}$ . Estes resultados foram obtidos por inserção das soluções padrão para cada intervalo, no mínimo em triplicado, a cada um dos tempos de amostragem de 1, 5 e 25 s, correspondendo aos intervalos de  $10\text{-}40 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $2\text{-}10 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,1\text{-}2 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

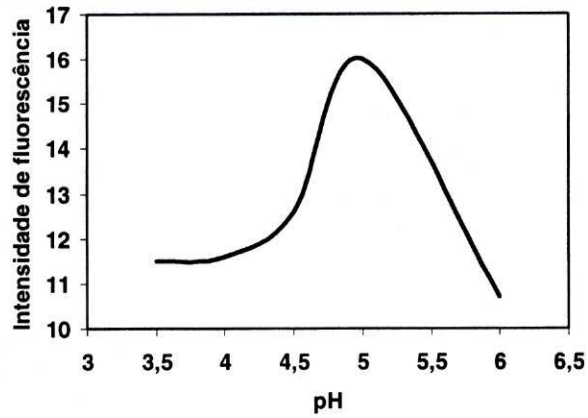


Fig 3.7 – Influência do pH na intensidade de fluorescência de uma solução padrão de ácido fólico  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Os diferentes pH foram obtidos a partir de soluções tampão de acetato  $0,01 \text{ M}$ .

As equações definidas por regressão linear das curvas de calibração obtidas (Fig 3.8) foram do tipo:  $A_p = a \times C_p + b$ , sendo  $A_p$  a amplitude de sinal (em cm),  $a$  o declive,  $C_p$  a concentração dos padrões (em  $\text{mg L}^{-1}$ ) e  $b$  a abcissa na origem, e são apresentadas na Tabela 3.1 (página 23), conjuntamente com os respectivos coeficientes de regressão.

A Figura 3.9 apresenta, a título de exemplo, o registo gráfico da calibração obtida a um tempo de amostragem de 1 s.

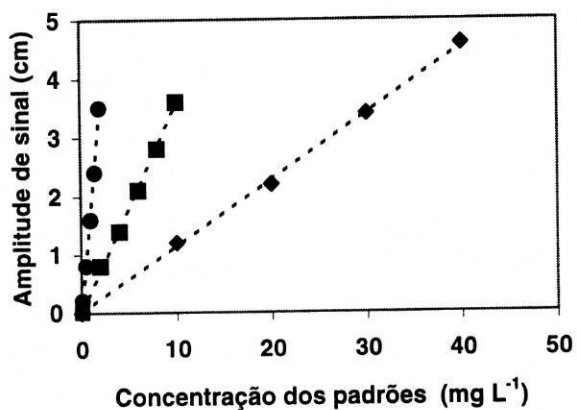


Fig 3.8 – Curvas de calibração de ácido fólico para diferentes tempos de amostragem e diferentes intervalos de concentrações: ●- (25 s) 0-2 mg L<sup>-1</sup>; ■- (5 s) 2-10 mg L<sup>-1</sup>; ◆- (1 s) 10-40 mg L<sup>-1</sup>.

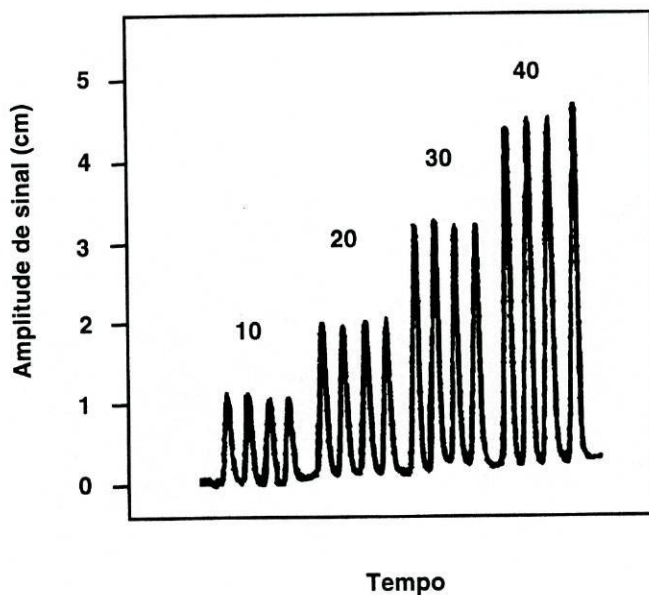


Fig 3.9 – Registo gráfico da curva de calibração de ácido fólico obtida com um tempo de amostragem de 1 s, e padrões de 10, 20, 30 e 40 mg L<sup>-1</sup>.

### **3.3.2. Análise de preparações farmacêuticas**

Com vista à avaliação do desempenho da metodologia desenvolvida, e desta forma atestar as potencialidades da sua utilização em procedimentos laboratoriais de rotina e de controlo de qualidade, o sistema de fluxo multicomutado descrito foi, após optimização, aplicado na análise de fórmulas farmacêuticas contendo ácido fólico disponíveis no mercado.

A qualidade dos resultados obtidos foi avaliada por comparação com os fornecidos pelo método de referência [5].

Para cada uma das preparações farmacêuticas analisadas foram preparadas soluções de amostra de diferentes concentrações, as quais foram analisadas por inserção no sistema de fluxo, tendo sido os tempos de amostragem seleccionados pelo sistema em função do respectivo intervalo de concentrações.

Os resultados obtidos pela metodologia desenvolvida, assim como pelo método de referência, na análise de comprimidos de ácido fólico comercializados com a denominação de Folicil e Endofolin, são apresentados na Tabela 3.2.

Para comprimidos com teores de ácido fólico de 5 e 10 mg foram obtidos desvios relativos da metodologia desenvolvida em relação à metodologia de referência, expressos em percentagem, entre -0,5 e 4,3%.

Não foi observado efeito interferente por parte dos excipientes utilizados na produção das preparações farmacêuticas.

A inserção repetida (n=10) de um padrão de 2 mg L<sup>-1</sup> a um tempo de amostragem de 5 s permitiu determinar o desvio padrão relativo (RSD) da metodologia desenvolvida, o qual foi de 3.0%.

Os ritmos de amostragem obtidos foram de 28, 25 e 22 amostras por hora para tempos de amostragem de 1, 5 e 25 s, respectivamente.

Tabela 3.2 – Resultados obtidos na determinação de ácido fólico em produtos farmacêuticos.

Amostra	Concentração		Concentração determinada (mg/comprimido)		RD (%)*
	declarada (mg/comp.)	Lote analisado	Metodologia Desenvolvida	Metodologia de Referência	
Folicil	10	A	9,83±0,29	9,88	-0,5
		B	10,2±0,31	10,1	1,0
		C	9,77±0,29	9,70	0,7
Endofolin	5	D	5,06±0,15	4,86	4,1
		E	5,12±0,15	4,91	4,3

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

### 3.4. Conclusões

A metodologia desenvolvida revelou ser uma alternativa credível e vantajosa para a determinação de ácido fólico em preparações farmacêuticas, especialmente se tivermos em consideração que as metodologias normalmente propostas e recomendadas pelas diferentes Farmacopeias são caracterizadas por serem lentas, chegando a requer um tempo de análise por amostra de cerca de 40 min, e laboriosas, visto que requerem a utilização de inúmeros reagentes e várias manipulações. Pelo contrário, a metodologia proposta demonstrou ser rápida, selectiva, sensível e de simples operação.

O desenvolvimento de sistemas multicomutados, através da utilização de válvulas solenóides, possibilita a implementação de redes de fluxo multidireccionais, as quais

conferem ao sistema uma elevada versatilidade em termos de processamento da amostra. Proporciona ainda um controlo efectivo sobre o processo de inserção da amostra, visto que, com base num controlo temporizado, permite a inserção de volumes perfeitamente definidos e precisos, os quais garantem uma adequada manipulação da dispersão, com a produção de diferentes valores de diluição adaptados à concentração amostra, permitindo alargar a gama de concentrações determinável.

A execução de reacções fotoquímicas no interior de um sistema de fluxo apresenta um elevado potencial de aplicação, visto que a luz pode ser considerada como que um reagente ideal, pela sua facilidade de utilização, conveniência, flexibilidade e baixo custo. Estas características, aliadas ao bom desempenho e elevada sensibilidade da detecção fluorimétrica, permitem que esta estratégia combinada possa ser utilizada com vantagem em sistemas químicas similares, com especial ênfase na análise de produtos farmacêuticos.

### 3.5.Referências

- [1] F.J. Al-Shammary, K.A. Al-Rashood, N.A. Mian, M.S. Mian, *Anal. Profiles of Drug Sub.*, 19 (1990) 221.
- [2] R.S. Goodhart, M.E. Shils, *Modern Nutrition in Health and Disease*, Lea and Febiger, Philadelphia, 1973.
- [3] F.A.G. Ferreira, *Nutrição Humana*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983.
- [4] B.L. Hutchings, E.L.R. Stokstad, J.H. Boothe, J.H. Mowat, C.W. Waller, R.B. Angier, J. Semb, Y. Subbarow, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 705.
- [5] Farmacopeia Portuguesa VI - Edição Oficial, INFARMED, Lisboa, 1997, pg. 339.
- [6] British Pharmacopoeia 1988, Vol. I, HMSO, London, 1988, pg. 257.
- [7] European Pharmacopoeia, 3ª ed., Council of Europe, Strasbourg, 1996, pg. 875.
- [8] G.R. Rao, S.N. Mahajan, K. Geeta, K.R. Mohan, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 60 (1977) 531.
- [9] M.N. Viswanadham, N. Sastry, *Indian Drugs*, 21 (1984) 460.
- [10] E.L. Wittle, B.L. O'Dell, J.M. Vandenbelt, J.J. Pfiffner, *J. Americ. Chem. Soc.*, 69 (1947) 1786.
- [11] V. Allfrey, L.J. Teply, C. Geffen, C.G. King, *J. Biol. Chem.*, 178 (1949) 465.
- [12] J.R. Hazlett, D.O. Kildsing, *J. Pharm. Sci.*, 59 (1970) 570.
- [13] C.C. Blanco, A.S. Carretero, A.F. Gutiérrez, M.R. Ceba, *Anal. Lett.*, 27 (1994) 1339.
- [14] C.C. Blanco, A.S. Carretero, A.F. Gutiérrez, M.R. Ceba, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13 (1995) 1019.
- [15] V.D. Reif, J.I. Reamer, L.T. Grady, *J. Pharm. Sci.*, 66 (1977) 1112.
- [16] U.S. Pharmacopeia, 23ª ed., U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville MD, 1995, pg. 78.
- [17] I.J. Holcomb, S.A. Fusari, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 607.
- [18] W.H. Tafolla, A.C. Sarapau, G.R. Dukes, *J. Pharm. Sci.*, 70 (1981) 1273.

- [19] C. Paveenbampen, D. Lamontanaro, J. Moody, J. Zarembo, C. Rehm, *J. Pharm. Sci.*, 75 (1986) 1192.
- [20] N. Ichinose, T. Tsuneyoshi, M. Kato, T. Suzuki, S. Ikeda, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 346 (1993) 841.
- [21] M.J. Akhtar, M.A. Khan, I. Ahmad, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 16 (1997) 95.
- [22] D. Luo, *Anal. Chim. Acta*, 189 (1986) 277.
- [23] W. Szczepaniak, M. Ren, *Electroanalysis (NY)*, 6 (1994) 505.
- [24] J.L.F.C. Lima, M.B.Q. Garcia, A.M.S.R. Silva, *Port. Electrochim. Acta*, 15 (1997) 321.
- [25] J.M. Fernandez-Alvarez, A. Costa-Garcia, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tunon-Blanco, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 6 (1988) 743.
- [26] J. Han, H. Chen, H. Gao, *Anal. Chim. Acta*, 252 (1991) 47.
- [27] E. Jacobsen, M.W. Bjrnson, *Anal. Cuim. Acta*, 96 (1978) 345.
- [28] W.J. Mader, M.W. Bjoernsen, *Anal. Chem.*, 12 (1948) 1199.
- [29] R.T. Dunn, L.B. Foster, *Clin. Chem.*, 19 (1973) 1101.
- [30] M.F. Chen, J.W. Hill, P.A. McIntyre, *J. Nutri.*, 113 (1983) 2192.
- [31] J. Friel, R. Levy, G. Herzberg, W. Andrews, *Clin. Chem.*, 36 (1990) 1252.
- [32] J.D. Sarma, C. Duttgupta, E. Ali, T.K. Dhar, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 78 (1995) 1173.
- [33] A.A. Al-Warthan, *Anal. Sci.*, 10 (1994) 919.
- [34] J.M. Calatayud, *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals: automation in the laboratory*, Taylor and Francis Ltd., London, 1996.
- [35] D. Chen, A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel, *Analyst*, 116 (1991) 171.
- [36] D. Chen, A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel, *Talanta*, 38 (1991) 1227.
- [37] J.Martinez-Calatayud, C. Gomez-Benito, *Anal. Chim. Acta*, 245 (1991) 101.
- [38] J.Martinez-Calatayud, C. Gomez-Benito. *Anal. Chim. Acta*, 256 (1992) 105.
- [39] A. Mellado-Romero, C. Gomez-Benito, J. Martinez-Calatayud, *Anal. Lett.*, 25 (1992) 1289.

- [40] M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *Anal. Chim. Acta*, 269 (1992) 193.
- [41] A. Sanz-Martinez, A. Rios, M. Valcarcel, *Analyst*, 117 (1992) 1761.
- [42] L.E. Leon, J. Catapano, *Anal. Lett.*, 26 (1993) 1741.
- [43] X.Q. Guo, J.G. Xu, Y.Z. Wu, Y.B. Zhao, X.Z. Huang, G.Z. Chen, *Anal. Chim. Acta*, 276 (1993) 151.
- [44] T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, O. Val, *Talanta*, 40 (1993) 1625.
- [45] A. Romero-Mellado, C. Gomez-Benito, J. Martinez-Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, 282 (1993) 95.
- [46] T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, O. Val, *Analyst*, 119 (1994) 1199.
- [47] G.A. Rivas, A. Romero-Mellado, J. Martinez-Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, 326 (1996) 23.
- [48] X.Q. Guo, D.Y. Wang, J.G. Xu, Y.B. Zhao, *Anal. Lett.*, 29 (1996) 203.
- [49] X.Q. Guo, Y.B. Zao, J.G. Xu, *Anal. Chim. Acta*, 343 (1997) 109.
- [50] H.W. Chen, J.P. Zhu, X.X. Cao, Q.J. Fang, *Analyst*, 123 (1998) 1017.
- [51] 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.
- [52] M.J. Akhtar, M.A. Khan, I. Ahmad, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25 (1999) 269.
- [53] J. Ruzicka, E.H. Hansen, "Flow Injection Analysis", 2<sup>a</sup> ed., John Wiley and Sons, New York, 1988.

# CAPÍTULO 4

---

## **DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PINDOLOL COM COMPENSAÇÃO DO EFEITO SCHLIEREN**

O pindolol é um bloqueador  $\beta$ -adrenérgico usado no tratamento da hipertensão e da angina de peito. Neste capítulo é descrito o desenvolvimento e implementação de uma metodologia analítica baseada na utilização de um sistema de fluxo multicomutado para determinação espectrofotométrica de pindolol em produtos farmacêuticos. A metodologia é baseada na reacção de complexação entre o pindolol e o catião Fe(III), e implementada recorrendo à amostragem binária. A ocorrência de perturbações nos sinais analíticos como resultado do efeito *Schlieren*, situação frequente e limitadora das medidas em sistemas de fluxo e que está associada à presença de acentuados gradientes de concentração, é evitada através da utilização de uma estratégia que implica o processamento em linha da solução transportadora. Desta forma evitam-se os gradientes de concentração e portanto as diferenças entre os índices de refacção da solução transportadora e da zona de amostra.

## 4.1.Introdução

### 4.1.1.Caracterização do pindolol

O pindolol, 1-(indol-4-iloxi)-3-isopropilaminopropano-2-ol (Fig 4.1), pela primeira vez sintetizado em 1969, é uma substância cristalina branca, praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em etanol e em clorofórmio e razoavelmente solúvel em metanol [1]:



Fig 4.1 Estrutura do pindolol.

A administração oral de pindolol é seguida de uma rápida e quase completa absorção (95%). Devido à insignificante acção do fígado, aquando da primeira passagem, a sua biodisponibilidade é elevada rondando os 90% da dose oral, atingindo uma concentração plasmática máxima entre 1 a 2 horas após a administração. Cerca de 40% encontra-se ligado às proteínas plasmáticas, sendo parcialmente metabolizado no fígado e excretado na urina, quer inalterado (40%) quer na forma de metabolitos (sob a forma de glucuronídeos ou derivados fenólicos conjugados com sulfato ou glucuronato).

#### 4.1.1.1. Actividade

O pindolol é um  $\beta$ -bloqueador moderadamente liofílico, não cardioselectivo, com actividade simpaticomimética intrínseca mas baixa actividade ao nível da estabilização das membranas [1]. Como  $\beta$ -bloqueador é um inibidor competitivo do efeito das catecolaminas nos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sendo este efeito não selectivo, pois tanto actua ao nível dos receptores  $\beta$ -1 (coração) como  $\beta$ -2 (músculo liso). Ao nível do coração tem efeitos inotrópico e cronotrópico negativos, reduzindo a actividade cardíaca e provocando um efeito hipotensor: numa primeira fase a resposta cardíaca é diminuída provocando uma diminuição da pressão sanguínea, a qual permanece baixa mesmo após o retorno à normalidade da actividade cardíaca. Por outro lado, reduz os impulsos simpaticomiméticos do coração em repouso. No entanto, a sua actividade simpaticomimética intrínseca mantém o coração com um estímulo basal semelhante ao produzido pela actividade simpaticomimética normal em repouso. Desta forma a frequência cardíaca, a contractilidade em repouso e a condução intracardíaca não são desnecessariamente deprimidas. Como consequência o risco de bradicardia é pequeno e o débito cardíaco normal não é reduzido. A actividade simpaticomimética verifica-se mesmo na ausência de catecolaminas, funcionando portanto como agonista parcial, o que lhe confere propriedades vasodilatadoras de relevância clínica [2].

#### 4.1.1.2. Indicações terapêuticas

O pindolol é usado no tratamento da hipertensão, angina de peito (prevenção de crises), arritmias cardíacas e síndrome cardíaco hiperkinético, em doses entre 5-30 mg diários. Mais recentemente, o pindolol tem sido usado como agente potencializador de outros fármacos, como por exemplo da buspirona [3], no tratamento de estados depressivos e de ansiedade.

#### **4.1.2. Métodos de análise**

É relativamente amplo o conjunto de metodologias analíticas propostas para determinação de pindolol em preparações farmacêuticas e em amostras biológicas.

A Farmacopeia Portuguesa recomenda a titulação potenciométrica do pindolol em metanol, com HCl [4].

Entre as metodologias analíticas envolvendo técnicas espectrofotométricas para análise de preparações farmacêuticas, destacam-se: determinação directa da absorvância a 264 nm em meio clorídrico [5], a reacção com o ácido p-cloroanílico em acetonitrilo e determinação da absorvância do composto formado a 522 nm [6], com a 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona em acetonitrilo [7], com o 4-dimetilaminobenzaldeído em meio ácido [8], com a 4-nitroanilina diazotada em tampão citrato a pH=6 [9] e com o reagente de Folin-Ciocalteu em meio alcalino [10] com determinação da absorvância dos produtos formados a, respectivamente, 460, 570, 435 e 765 nm. Foram também propostos como reagentes cromogénicos para determinação espectrofotométrica de pindolol o Fe(III) [11], a vanilina [12] e os oxidantes persulfato de sódio e peróxido de hidrogénio [13]. No que concerne à espectrofotometria derivativa há a assinalar trabalhos que envolvem determinações biparamétricas de pindolol e captopril [14], e pindolol e clopamida [15].

As técnicas fluorimétricas têm uma aplicação limitada para análise de pindolol, havendo a referir uma metodologia directa em etanol para ensaio de comprimidos [16] e, mais recentemente, fluorimetria síncrona [17] para determinação simultânea de pindolol e propanolol em comprimidos e em amostras de urina.

As técnicas cromatográficas são sem dúvidas as mais divulgadas na determinação deste composto, sobretudo no que concerne à cromatografia líquida, com um vasto campo de aplicações em que sobressai a análise de amostras biológicas. A cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica [18, 19], com detecção ultravioleta [20-23] e

com detecção fluorimétrica [24-26] foi aplicada na determinação de amostras com origens tão diversas como urina, plasma, soro e preparações farmacêuticas.

Foram também propostas metodologias de cromatografia gás-líquido com detector de captura electrónica para determinação de pindolol em plasma e urina [27, 28].

#### **4.1.3.Efeito Schlieren**

Num sistema de fluxo contínuo, seja ele um sistema FIA, SIA ou multicomutado, a amostra é injectada ou inserida numa solução transportadora, sofrendo uma dispersão de extensão variável enquanto é encaminhada até ao detector. Quando a amostra e a solução de transporte apresentam diferentes concentrações salinas, a dispersão mútua vai originar o aparecimento de gradientes de concentração. Em espectrofotometria de absorção molecular, e dada a influência da concentração no índice de refacção, o aparecimento de gradientes de concentração está associado à formação dos correspondentes gradientes de índice de refacção [30] os quais serão tanto mais intensos quanto maior for a diferença de concentração entre a zona de amostra e a solução transportadora. Estas diferenças no índice de refacção podem afectar a direcção de propagação do feixe de radiação incidente, provocando o aparecimento de perturbações no sinal analítico, fenómeno denominado efeito *Schlieren*, o qual, e no que diz respeito a metodologias de fluxo, foi pela primeira vez observado por Krug *et al.* numa determinação turbidimétrica de sulfato por FIA [31]. Este fenómeno apresenta aspectos extremamente negativos, podendo comprometer seriamente a precisão, exactidão e limite de detecção da metodologia [32].

O efeito *Schlieren*, que se manifesta pela quantidade de radiação incidente que atinge o detector, pode assumir duas formas (Fig 4.2-A e 4.2-B) as quais poderão ser explicadas do seguinte modo: se uma solução com uma elevada concentração salina, e portanto com um elevado índice de refacção, é inserida numa solução transportadora

constituída, por exemplo, por água destilada, a zona de amostra adquirirá por dispersão no transportador uma configuração parabólica com conformações distintas, tanto na interface frontal como na cauda do segmento de amostra intercalado.

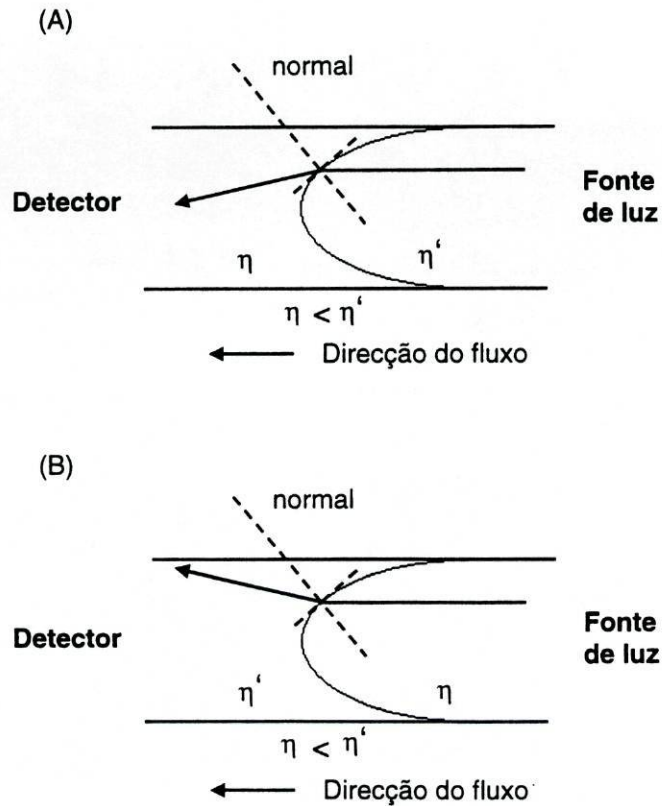


Fig 4.2 – Desvio na direcção de propagação de um feixe de luz ou atravessar zonas com distintos índices de refração. A – Porção frontal da zona de amostra: o feixe de luz, ao passar de uma zona de alto índice de refração (correspondente à amostra) para outra com um valor inferior (solução transportadora), é refractado em direcção ao detector. B – porção terminal da zona de amostra: o feixe de luz atravessa de uma zona de menor índice de refração para outra com um valor superior, sendo desviado do detector.

Esta configuração parabólica é justificada, de acordo com a teoria de transporte em condições de fluxo laminar [33], pela maior velocidade do líquido na zona central do tubo, e estabelece zonas ou linhas de idêntica concentração salina, e portanto com idêntico índice de refração, também elas com uma configuração parabólica [30]. Durante a detecção, a interface frontal da zona de amostra, que percorre a célula de fluxo na direcção indicada na Fig 4.2-A, é atravessada por um feixe de luz incidente o qual se propaga de uma zona de alto índice de refração para uma outra de baixo índice de refração. O feixe de luz é por isso refractado, afastando-se do plano normal ao plano de separação de zonas, sendo focado em direcção ao detector. Deste fenómeno resulta um aumento da quantidade de luz que atinge o detector, tendo como consequência uma diminuição da absorvância aparente e sendo por isso obtido e registado um “pico negativo” (pico invertido). Quando a interface terminal da zona de amostra percorre por sua vez a célula de fluxo, ocorre o fenómeno inverso (Fig 4.2-B): o feixe de luz incidente passa de uma zona de baixo índice de refração para uma zona de alto índice de refração, sendo refractado na direcção do plano normal ao plano de separação de zonas. Desta forma o feixe de luz é afastado do detector, sendo portanto inferior a quantidade de radiação que o atinge, o que, funcionando como um aumento da absorvância aparente, resulta num registo ou pico positivo. Em situações em que o índice de refração da amostra é inferior ao índice de refração da solução transportadora, ocorre um fenómeno semelhante embora numa sequência inversa: a zona frontal da amostra produz um pico positivo e a zona terminal um pico invertido.

São vários os factores que afectam a amplitude do efeito *Schlieren* [34], e que estão directa ou indirectamente relacionados com a formação de gradientes de concentração entre amostra e solução de transporte. Neste grupo de factores destacam-se todos aqueles que num sistema de fluxo afectam a dispersão da amostra [35], como sejam o volume de amostra, caudal, comprimento do reactor e forma de adição dos reagentes, além da densidade e viscosidade da solução de amostra e da solução transportadora.

Assim sendo, quanto menor for a dispersão mais acentuados serão os gradientes de concentração, fazendo com que o efeito *Schlieren* seja particularmente manifesto em sistema de fluxo de baixa dispersão, nomeadamente sistemas de canal único [35, 36].

Foram propostas diversas estratégias para correcção ou eliminação do efeito *Schlieren*, muitas das quais foram objecto de análise num trabalho de revisão recentemente publicado [34]. Uma estratégia simples será a compatibilização das características físico-químicas, fundamentalmente do índice de refração, da amostra e do transportador. Esta compatibilização pode ser conseguida por adição de um soluto quimicamente inerte, quer na fase de preparação das soluções [36, 37] quer em linha, na própria montagem de fluxo [38, 39]. Há no entanto situações em que esta estratégia é impraticável, como por exemplo quando o número de amostras para análise é elevado e apresenta concentrações salinas elevadas e díspares ou quando se intercala uma resina de permuta iónica.

Alternativamente poderá minimizar-se o efeito da interacção entre a zona de amostra e a solução transportadora através da execução das leituras de absorvância em zonas não afectadas ou inferiormente afectadas por gradientes de concentração, ou então limitando objectivamente o grau de interacção recorrendo a um sistema de fluxo monosegmentado [40] ou utilizando elevados volumes de amostra [32].

Dada a dependência dos gradientes de concentração em relação à dispersão, uma forma expedita de reduzir a formação dos primeiros será através da optimização das condições de mistura amostra/transportador, o que pode ser conseguido utilizando reactores que promovam uma contínua alteração da direcção do fluxo [41], com a adição dos reagentes por confluência [42] ou através do recurso a câmaras de mistura [43].

O efeito *Schlieren* pode ser também corrigido ou compensado com estratégias baseadas em procedimentos instrumentais. Zagatto *et al.* [35] propuseram a execução de medidas de absorvância a dois comprimentos de onda diferentes, na mesma célula de fluxo e com utilização de um espectrofotómetro com díodos em linha (*diode-array*), uma

das medidas quantificando o analito e a interferência, enquanto que a segunda medida quantificava unicamente a interferência. O valor de absorvância do analito era obtido pela diferença entre estes valores. Por sua vez Leach *et al.* [44] propuseram a utilização de duas células de fluxo, colocadas sequencialmente e separadas por um reactor de transferência, em que o sinal era calculado pela variação da absorvância em função do tempo. Foi verificado que o gradiente de concentração mínimo correspondia ao máximo de absorvância, o que permitia a obtenção de um sinal analítico praticamente isento de interferências. Mais recentemente Maniasso *et al.* [45] propuseram o estabelecimento de dois fluxos com gradientes de concentração idênticos, embora simétricos, os quais eram feitos convergir de modo a obter-se um fluxo único com o gradiente de concentração anulado, uma vez que a soma vectorial dos gradientes convergentes era igual a zero.

#### **4.1.4.Objectivo**

A complexação de iões metálicos com produtos farmacêuticos tem sido utilizada como reacção base de muitos procedimentos analíticos. Este trabalho tem como objectivo o desenvolvimento de uma sistema de fluxo multicomutado, simples, de baixo custo e versátil, para determinação de pindolol em preparações farmacêuticas, com base na complexação deste  $\beta$ -bloqueador com o Fe(III), o qual possa também representar uma estratégia expedita para a supressão, em linha, do efeito negativo associado à diferença de índices de refração frequentemente existente entre a zona de amostra e a solução transportadora.

## **4.2. Parte Experimental**

### **4.2.1. Reagentes e soluções**

As soluções padrão de pindolol foram preparadas usando a substância produzida pela Sigma-Aldrich, ref. P0778, sem qualquer purificação prévia. Uma solução mais concentrada de pindolol, com a concentração de  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , foi preparada semanalmente por dissolução de 50 mg de fármaco em 0,2 M HCl, seguido de diluição até  $100 \text{ cm}^3$  com a mesma solução de HCl. Esta solução foi mantida no frigorífico e protegida da luz. As soluções padrão de trabalho utilizadas para elaboração das curvas de calibração, foram obtidas diariamente por diluição apropriada da solução de reserva com HCl 0,2 M.

A solução reagente de Fe(III), com a concentração de 0,5 M, foi preparada por dissolução de quantidades definidas de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  numa solução de HCl 0,2 M.

### **4.2.2. Equipamento**

Como sistema de detecção, incorporado na montagem de fluxo para avaliação da absorvância das soluções, foi utilizado um espectrofotómetro LaboMed, modelo Spectro 22RS, o qual estava equipado com uma célula de fluxo com um volume óptico de  $18 \mu\text{L}$ .

A montagem de fluxo compreendia um conjunto de 5 válvulas solenóides de 3 vias da marca NResearch, modelo 161 T031, já anteriormente caracterizadas.

As tubagens utilizadas para transporte das soluções possuíam um diâmetro interno de 0,8 mm e eram em Teflon. A propulsão das soluções foi efectuada por aspiração, com recurso a uma bomba de pistão da marca Razel, modelo A-99, a qual foi equipada com uma seringa de plástico com a capacidade de 50 mL.

As titulações potenciométricas em meio não-aquoso, utilizadas como método de referência, foram executadas num sistema de titulação automático cuja constituição foi já referida anteriormente (Capítulo 2).

#### **4.2.3. Montagem de fluxo multicomutado**

O desenvolvimento e implementação da montagem de fluxo foi subordinada a três objectivos fundamentais: uma geometria globalmente simples, facilmente controlada por computador, com elevadas sensibilidade e eficiência analítica e garantindo a supressão dos efeitos indesejáveis associados à presença de gradientes de concentração. Com base nestes pressupostos a montagem de fluxo multicomutado foi desenhada com 5 válvulas solenóides de 3 vias (Fig 4.3), tendo 3 dessas válvulas ( $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$ ) um dos canais obstruídos de forma a funcionarem como válvulas de canal único, e que portanto, em termos operacionais, se pudessem considerar como válvulas do tipo aberto/fechado (*on/off*).

Em termos de especificação de funções,  $V_1$  era a válvula responsável pela inserção da amostra, enquanto que  $V_2$  e  $V_3$  eram responsáveis pela introdução da solução de Fe(III) e HCl 0,2 M, respectivamente, e o seu accionamento combinado tinha como atribuição a produção em linha da solução reagente que funcionava de igual modo como solução transportadora. Uma confluência (C) permitia convergir os três fluxos originais, antes do reactor (L). As válvulas  $V_4$  e  $V_5$  controlavam o direccionamento do fluxo, condicionado à opção de detecção ou de lavagem e substituição da amostra.

Numa primeira fase tinha lugar a produção em linha da solução transportadora, através do accionamento alternado entre as posições 1 e 2, durante intervalos de tempo pré-definidos, das válvulas  $V_2$  e  $V_3$  responsáveis pela inserção da solução de Fe(III) e da solução de HCl 0,2 M, respectivamente (Fig 4.3). Obtinha-se deste modo uma sequência

de intercalação das duas soluções, com um padrão definido em função da temporização de  $V_2$  e  $V_3$  (Fig 4.4-A).

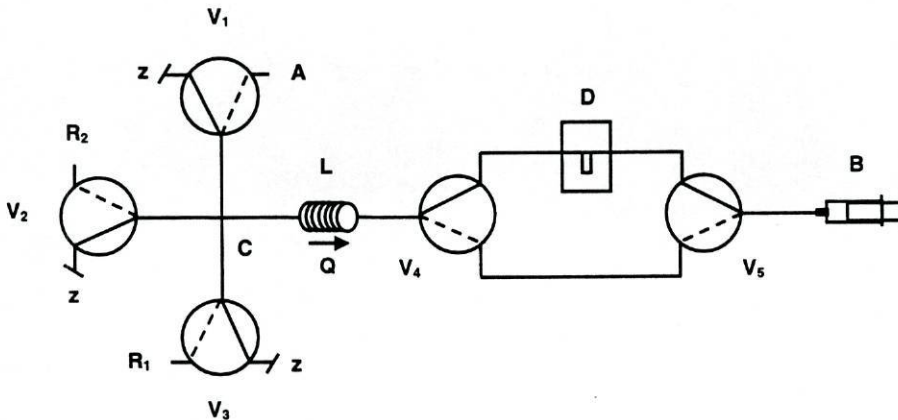


Fig 4.3 – Montagem de fluxo multicomutado para eliminação do efeito Schlieren e determinação de pindolol por reacção com o catião ferro(III): A - amostra;  $R_1$  - HCl 0,2 M;  $R_2$  - solução de ferro(III) 0,5 M;  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$  e  $V_5$  - válvulas solenóides (as linhas contínuas correspondem à posição 2 e o tracejado à posição 1); L - reator enrolado, 1 metro de comprimento; D - detector; B - bomba de pistão; C - ponto de confluência; z - canal obstruído; Q - caudal,  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

A solução transportadora assim produzida, era encaminhada através de  $V_4$ , na posição 2, em direcção ao detector, através do qual fluía, sendo aspirada por  $V_5$  colocada também na posição 2.  $V_1$  permanecia na posição 2. A amostra era inserida por accionamento alternado entre as posições 1 e 2 das válvulas  $V_1$  e  $V_2$ , com uma temporização idêntica à utilizada para produzir a solução reagente (transportadora).

Obtinha-se assim um esquema de intercalação de soluções semelhante ao produzido anteriormente, apenas com substituição da solução de HCl 0,2 M pela solução de amostra (Fig 4.4-B). Como a solução de amostra era preparada em HCl 0,2 M, o

gradiente de concentração resultante da inserção da amostra era semelhante ao da solução transportadora. A zona de amostra era depois encaminhada, através do reactor L e de  $V_4$ , em direcção ao detector, num processo similar ao descrito para a solução transportadora. Durante esta fase  $V_3$  permanecia na posição 2.

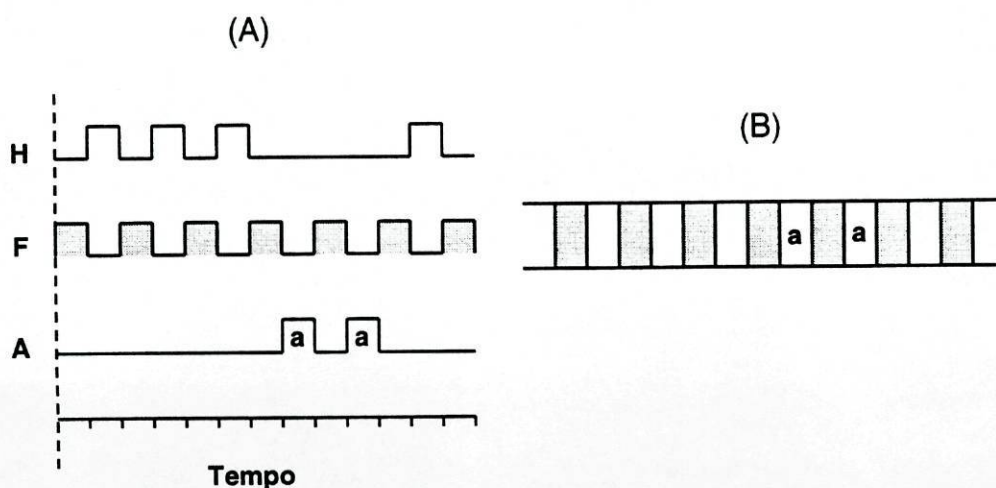


Fig 4.4 - (A) - Sequência de intercalação para o processamento em linha da solução transportadora e para inserção da amostra: A - amostra; H - HCl 0,2 M; F - solução de ferro(III) 0,5 M; as linhas superiores indicam a válvula colocada na posição 1 e as linhas inferiores referem-se à posição 2. O tempo está expresso em unidades arbitrárias. (B) - fluxo resultante: a - amostra.

Após a obtenção do máximo do sinal ocorria a substituição da amostra, acompanhada da lavagem do sistema analítico:  $V_1$ ,  $V_4$  e  $V_5$  eram colocadas na posição 1, enquanto que  $V_2$  e  $V_3$  permaneciam na posição 2. A nova amostra era inserida através de  $V_1$  e encaminhada para dreno por intermédio de  $V_4$  e  $V_5$ , ligadas por uma tubagem de reduzidas dimensões de forma a que o processo fosse rápido, sem passar pelo detector. Depois  $V_1$  era colocada na posição 2 e era retomado o esquema de preparação da

solução transportadora por intermédio de  $V_2$  e  $V_3$ , primeiro para lavagem (com  $V_4$  e  $V_5$  na posição 1) e depois para detecção, quando  $V_4$  e  $V_5$  retornavam à posição 2.

A obtenção da curva de calibração envolveu a inserção de um conjunto de soluções padrão com concentrações definidas, com recurso a uma temporização das válvulas idêntica à utilizada para as amostras.

A propulsão das soluções foi efectuada por aspiração a um caudal de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### **4.2.4. Método de referência**

As preparações farmacêuticas contendo pindolol analisadas pela metodologia desenvolvida foram as denominadas Visken, com uma dosagem de 5 mg de pindolol por comprimido, e Viskène, com uma dosagem de 5 mg de pindolol por comprimido. Para a preparação das soluções das formulações farmacêuticas foram pesados e pulverizados 20 comprimidos de cada uma das formulações analisadas, e depois foram tomadas quantidades apropriadas de pó que foram dissolvidas em HCl 0,2 M, seguido de diluição até 500 mL com a mesma solução. As soluções de amostra foram filtradas antes de se proceder à sua análise.

A determinação de pindolol na matéria-prima e em comprimidos, foi executada de acordo com a Farmacopeia Portuguesa [4] por titulação potenciométrica em solução não-aquosa. Este método foi baseado na dissolução do fármaco em metanol e titulação potenciométrica com um padrão de HCl 0,1 M.

### 4.3. Resultados e sua discussão

São em número elevado as metodologias propostas para determinação de produtos farmacêuticos baseadas na detecção espectrofotométrica dos produtos de reacção formados por complexação com catiões metálicos, especialmente com os catiões Fe(III), Pd(II) e Cu(II). Muitas destas metodologias foram já desenvolvidas com recurso a sistemas de fluxo contínuo. Os valores de concentração de sais e ácidos normalmente envolvidos nestas reacções, nomeadamente quando o catião Fe(III) é utilizado, e que são de uma forma geral razoavelmente elevados, originam elevados gradientes de concentração e conseqüentemente elevados gradientes de índice de refração, em virtude da diferença de índice de refração entre a solução de amostra e a solução reagente. Estes gradientes originam perturbações no sinal analítico (efeito *Schlieren*), perturbações estas que se manifestam ao nível da detecção, especialmente no respeitante à porção frontal e terminal da zona de amostra, com aparecimento de picos negativos e positivos. O trabalho referido neste capítulo foi desde o seu início condicionado pelo aparecimento do efeito *Schlieren*, e todos os esforços desenvolvidos visaram inicialmente a sua eliminação, e só depois a optimização da montagem de fluxo multicomutado com vista à determinação de pindolol em preparações farmacêuticas. A abordagem utilizada permitiu a resolução com sucesso do problema, criando perspectivas de aplicação noutras situações semelhantes.

#### 4.3.1. Eliminação do efeito *Schlieren*

A reacção entre o pindolol e o ferro(III), em meio ácido, inicialmente descrita por Pecanac *et al.* [11], produz um complexo corado esverdeado, com um máximo de absorvância a 635 nm. A avaliação de alguns aspectos da cinética da reacção, realizada no âmbito deste trabalho e levada a cabo através da execução de um conjunto de ensaios

discretos, permitiu verificar que a intensidade de cor é fortemente dependente da concentração de pindolol (Fig 4.5), do pH (Fig 4.6) e da concentração de Fe(III) (Fig 4.7).

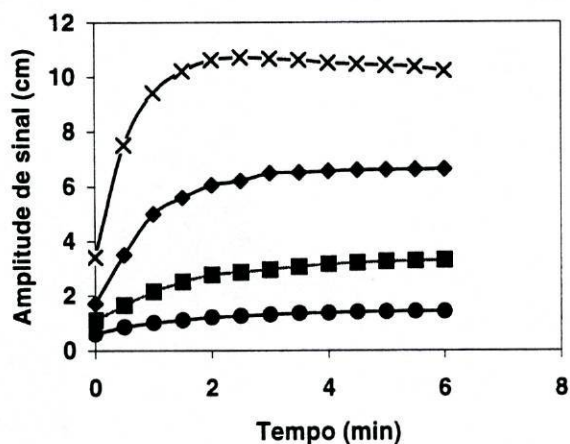


Fig 4.5 – Influência da concentração de pindolol na amplitude do sinal obtido por reação com uma solução de ferro(III) 0,5 M em HCl 0,1 M, para soluções de pindolol com a concentração de: x – 75 mg L<sup>-1</sup>; ♦ - 50 mg L<sup>-1</sup>; ■ - 25 mg L<sup>-1</sup>; ● - 10 mg L<sup>-1</sup>.

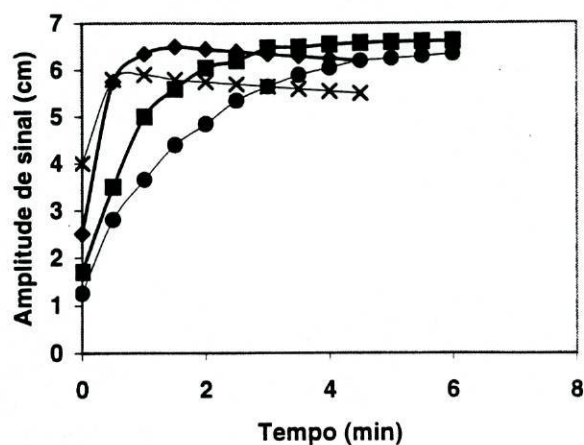


Fig 4.6 – Influência da concentração de HCl na intensidade do sinal obtido por reação de um padrão de pindolol 50 mg L<sup>-1</sup> com uma solução de ferro(III) 0,5 M, para concentrações de HCl de: x – 0,5 M; ♦ - 0,25 M; ■ - 0,1 M; ● - 0,05 M.

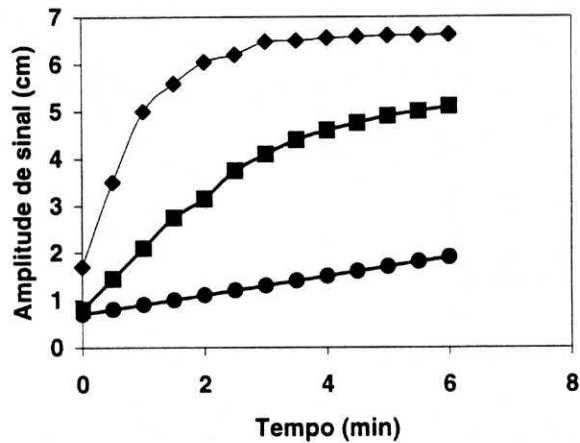


Fig 4.7 – Influência da concentração de uma solução de ferro(III) na intensidade do sinal obtido por reacção com um padrão de pindolol  $50 \text{ mg L}^{-1}$  para uma concentração de HCl de  $0,1 \text{ M}$ . Concentrações de ferro de:  $\blacklozenge$  -  $0,5 \text{ M}$ ;  $\blacksquare$  -  $0,25 \text{ M}$ ;  $\bullet$  -  $0,05 \text{ M}$ .

A implementação desta reacção com recurso a uma metodologia de fluxo obriga a considerar também um conjunto de parâmetros analíticos, como sejam o volume de amostra, o caudal e o comprimento do reactor, os quais afectam de forma acentuada a dispersão da amostra, e portanto o sinal analítico obtido.

A abordagem inicial para implementação da metodologia em fluxo consistiu na utilização da solução de ferro(III) como solução transportadora, na qual era intercalada a solução de amostra depois encaminhada para o detector. A solução de ferro(III) era também utilizada para ajustar o zero de absorvância, correspondente à linha de base. Apesar de serem ambas as soluções preparadas com ácido clorídrico  $0,1 \text{ M}$  obtinha-se na detecção (considerando os valores de absorvância) um pico positivo, logo seguido de um pico invertido. Em termos de registo gráfico obtiveram-se na realidade dois picos positivos devido às características do espectrofotómetro utilizado, que convertia valores de

absorvância abaixo do valor zero, em potenciais positivos, que como tal eram considerados pelo registador (Fig 4.8).

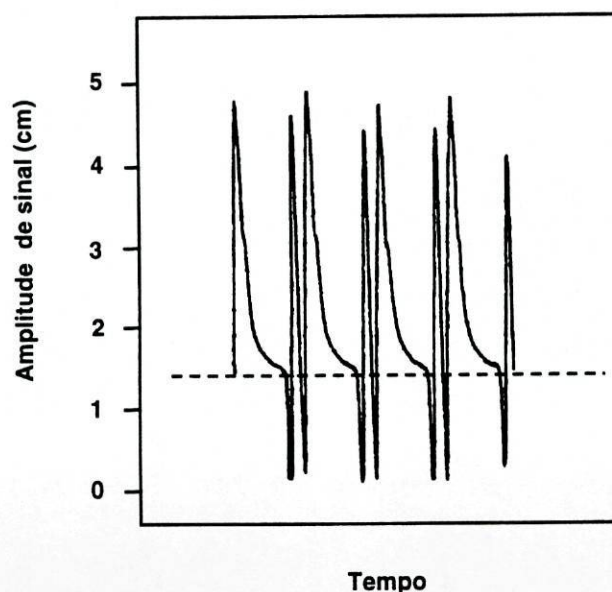


Fig 4.8 – Registo gráfico do duplo pico obtido devido ao efeito Schlieren.

O duplo pico manifestava a sua presença mesmo na ausência de pindolol, quando se inseria apenas a solução de HCl 0,1 M, ou quando se revertia o processo, usando-se a solução de HCl ou de pindolol em HCl como transportador, e depois intercalando uma alíquota da solução reagente de ferro(III). Verificou-se então que o duplo pico era devido maioritariamente à elevada concentração do catião ferro(III) (0,5 M), visto que a diminuição da concentração deste tinha como efeito a diminuição da altura dos picos obtidos. De facto, o maior índice de refração da solução de ferro(III) 0,5 M em HCl 0,1 M, quando comparado como índice de refração da solução de HCl 0,1 M ou com o da solução de pindolol em HCl 0,1 M, motivava a ocorrência de alterações na direcção de propagação do feixe de radiação incidente, provocando o aparecimento de duplos picos (o pico positivo

coincidia com o sinal analítico caso a amostra contivesse pindolol) na detecção. Este fenómeno afectava a forma e a magnitude do sinal analítico, especialmente no caso de soluções com baixa concentração em pindolol, uma vez que a inserção de HCl 0,1 M já originava um pico positivo elevado, sendo portanto impossível de discernir se a intensidade de sinal era atribuível à amostra ou ao solvente. Por outro lado, no caso das concentrações mais baixas, o elevado valor de pico do solvente provocava um desvio da zona de resposta linear.

Uma forma, aparentemente simples, de atenuar o efeito *Schlieren* residia portanto na compatibilização dos índices de refração das duas soluções, o que foi em parte alcançado, embora não na extensão desejada, com o aumento da concentração de HCl na solução de pindolol. Uma outra estratégia, também testada para atenuar o efeito *Schlieren*, foi a utilização de reactores mais longos e células de fluxo com um grande volume óptico (80 e 230  $\mu\text{L}$ ). O objectivo pretendido foi o aumento da dispersão mútua entre a amostra e o transportador, de forma a reduzir o gradiente de concentração e assim obter uma atenuação do efeito *Schlieren*. O objectivo foi parcialmente atingido, acrescido de uma melhoria na reprodutibilidade dos sinais analíticos, embora por outro lado, se tenham obtido sinais analíticos mais reduzidos e bastante mais largos, afectando a sensibilidade e o ritmo de amostragem.

Em qualquer umas das estratégias ensaiadas existia uma diminuição da intensidade dos gradientes de concentração, os quais nunca eram completamente eliminados, mesmo no caso da tentativa de compatibilização dos índices de refração das duas soluções. No entanto, a multicomutação possibilitava, em virtude das suas particulares características funcionais [29], a implementação de uma abordagem que fazia prever algum sucesso: uma vez que a inserção da amostra se processa por intercalação de alíquotas de amostra e reagente (neste caso também utilizada como solução transportadora) de forma a facilitar a homogeneização da zona de amostra, e dado que era possível utilizar o mesmo solvente na preparação da solução de pindolol e de ferro(III)

(neste caso uma solução de HCl), seria então possível preparar a solução reagente em linha, durante a análise, de forma a conferir-lhe as mesmas características, em termos de perfil de concentração e por isso de índice de refração, da zona de amostra. Assim, considerando que a inserção da amostra se processava por intercalação de alíquotas da solução de pindolol em HCl com alíquotas da solução de ferro(III) em HCl, sendo o volume destas alíquotas definido por temporização da abertura da válvula solenóide responsável pela solução respectiva, a solução transportadora era estabelecida por intercalação de alíquotas da solução de HCl com alíquotas da solução de ferro(III) em HCl utilizando o mesmo esquema de temporização utilizado para inserção da amostra. O que acontecia então, e que distinguia a fase de inserção da amostra da fase de preparação do transportador, era a substituição da solução de pindolol em HCl pela solução contendo exclusivamente HCl (com idêntica concentração no ácido). Sendo a concentração de pindolol na primeira solução extremamente baixa não tinha influência em termos de índice de refração final da solução, de modo que o índice de refração das soluções de HCl na presença e na ausência de pindolol era semelhante. Assim sendo, e em termos de índice de refração, podemos considerar que se evitava a formação de gradientes de concentração, apresentando o fluxo resultante uma uniformidade de índice de refração entre a zona de amostra e a solução transportadora, o que tinha como resultado a supressão do efeito *Schlieren*.

Esta solução tem vantagens em relação a outras soluções propostas anteriormente: é um processo simples, que sendo baseado numa nova estratégia operacional do equipamento correntemente utilizado, não implica alteração da geometria do sistema ou o recurso a outros desenvolvimentos instrumentais. Mantém a integridade da amostra, não sendo necessário, por exemplo, a compensação do índice de refração com um sal inerte. Por outro lado, e uma vez que a magnitude do efeito Schlieren é afectada pelo volume de amostra inserido [35], é possível variar indiscriminadamente este, sem estar sujeito ao efeito do índice de refração. Mais ainda, qualquer manipulação da

amostra, em termos de sequência de intercalação amostra/reagente, incluindo a sua temporização, pode ser reproduzida durante o processamento da solução transportadora mantendo uniforme o índice de refração do fluxo resultante. Finalmente, é possível aplicá-lo a qualquer reacção, envolvendo distintos analitos e distintos reagentes.

#### **4.3.2.Otimização da montagem de fluxo**

Após a resolução dos problemas associados com o efeito *Schlieren*, o objectivo do trabalho visou a optimização do sistema de fluxo multicomutado, no que diz respeito à definição das variáveis químicas e da configuração da montagem, e à sua posterior aplicação na determinação de pindolol em produtos farmacêuticos.

A realização de ensaios discretos para avaliação da cinética da reacção demonstrou que, como já foi referido, esta é acentuadamente afectada pela concentração de HCl (Fig 4.6) e pela concentração de catião Fe(III) (Fig 4.7). Permite também verificar que para uma concentração de HCl 0,1 M e de Fe(III) 0,5 M, valores considerados como eventualmente os mais adequados para a obtenção de um máximo de sinal analítico, a absorvância máxima era atingida ao fim de, aproximadamente, 2 min.

A implementação da reacção num sistema de fluxo implicava ter em consideração alguns aspectos, como sejam uma adequada mistura amostra/reagente e um tempo de reacção tal, de forma a garantir um adequado desenvolvimento da reacção garantindo igualmente um ritmo de amostragem favorável. A inserção da amostra sob a forma de um volume único, como acontece num sistema FIA convencional, iria requerer o estabelecer de um compromisso entre comprimento do reactor, caudal e volume de amostra, de modo a assegurar que através da mútua dispersão, a reacção iniciada na interface amostra/reagente fosse depois estendida a toda a zona de amostra. Este pressuposto, a dispersão controlada, constitui um dos princípios básicos do FIA. A multicomutação [29] proporciona no entanto um modelo diferente de actuação: em vez de um volume único de

dimensão variável, podem intercalar-se, sequencialmente, pequenas alíquotas de amostra e de solução reagente, favorecendo assim a homogeneização da zona de reacção, atingida de forma muito mais rápida, o que favorece o desenvolvimento da reacção. Por esta razão é possível reduzir o comprimento do reactor e, deste modo, o tempo necessário para a análise. O controlo do processo de amostragem binária através de uma rotina temporizada, assegura a reprodutibilidade da operação e permite, adicionalmente, a selecção do volume global de amostra mais apropriado (em função do número de ciclos) assim como da razão entre o volume das alíquotas de amostra e de reagente, possibilitando um controlo mais efectivo da dispersão, e consequentemente, da reacção química. Como resultado, e independentemente do volume de amostra inserido, obtém-se uma sucessão de interfaces amostra/reagente com um nível de dispersão reduzido [29], o que favorece a sensibilidade da análise sem comprometer a reprodutibilidade.

A influência da configuração da sequência de intercalação pindolol/ferro(III) no desenvolvimento da reacção foi avaliada através do ensaio de diferentes tempos de intercalação ( $t_i$ ) de forma a que o tempo total de inserção de pindolol, considerado como o produto do número de intercalações pelo tempo de intercalação, permanecesse constante. O tempo de intercalação assume uma importância adicional em virtude da estratégia de eliminação do efeito *Schlieren*, a qual obriga a que a configuração da sequência de amostragem seja depois reproduzida aquando do processamento em linha da solução transportadora, afectando portanto o perfil da linha de base. Considerando que, para um dado  $t_i$ , o volume de amostra intercalado é dependente do caudal, este foi mantido constante a um valor de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Os resultados obtidos demonstraram que, para um reactor com um comprimento de 50 cm, a utilização de  $t_i$  entre 0,25 e 1 s, os quais, para o caudal utilizado, correspondem a alíquotas de amostra com volumes entre 4,2 e 16,6  $\mu\text{L}$ , produzia sinais analíticos idênticos. Com um  $t_i$  de 2 s (33,2  $\mu\text{L}$ ) o sinal era comparável mas o perfil do pico apresentava um aspecto ondulado, o que evidenciava a necessidade de utilização de um reactor mais comprido de forma a obter uma superior homogeneização.

Em termos de linha de base, verificou-se que a maior uniformidade era conseguida com um tempo de intercalação de 1 s. Uma vez que a solução responsável pela linha de base era processada continuamente, durante intervalos de tempo comparativamente longos, um tempo de intercalação de 0,25 s obrigava a um accionamento extremamente rápido das válvulas solenóides, o que aumentava a probabilidade de ocorrência de irreprodutibilidades na sequência de intercalação, aumentando adicionalmente a frequência do aparecimento de bolhas no interior do sistema. Estas perturbações manifestavam-se ao nível da linha de base conferindo-lhe um aspecto irregular. Por outro lado resultava num aumento do desgaste da válvula com redução do seu tempo de vida útil. Com um  $t_i$  de 0,5 s as perturbações registavam uma atenuação, sendo quase esporádicas com um  $t_i$  de 1s. Em função destes resultados, e uma vez que a reprodutibilidade obtida com um  $t_i$  de 1 s era superior à obtida com intervalos mais curtos, o que era devido, fundamentalmente, à intercalação de alíquotas de maior volume e às características de funcionamento das válvulas solenóides, este foi considerado como o mais adequado para a realização dos subseqüentes ensaios.

O volume de amostra era controlado pelo número de ciclos de amostragem, ou intercalações, a um determinado  $t_i$ , estabelecendo um tempo global de inserção de amostra ou tempo de amostragem ( $t_a$ ). O estudo da sua influência ao nível do sinal analítico foi efectuado por variação do número de intercalações de uma padrão de pindolol  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  e da solução de ferro(III), a um  $t_i$  de 1 s.

Em virtude da interdependência existente entre a magnitude do sinal analítico e o tempo de residência, foram ensaiados reactores de diferentes comprimentos enquanto que o caudal foi mantido a um valor de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Os resultados obtidos demonstraram (Fig 4.9) que o sinal analítico aumentava à medida que aumentava o número de ciclos ou repetições, tendendo depois para uma estabilização.

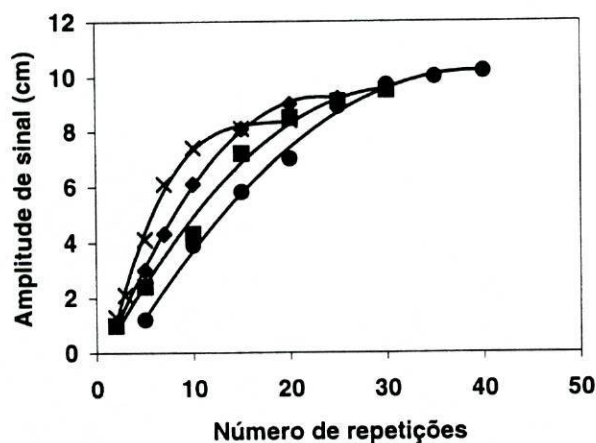


Fig 4.9 – Influência do número de ciclos de intercalação da sequência de amostragem na altura do pico obtido, para reatores com diferentes comprimentos: x – 50 cm; ◆ - 100 cm; ■ - 150 cm; ● - 200 cm.

No caso do reactor com 50 cm de comprimento o sinal subia acentuadamente até aos 7 ciclos, registando depois um aumento de menor amplitude até aos 10 ciclos, sendo a estabilização de sinal obtida com uma sequência de intercalação de 15 repetições. Comparativamente, com o reactor de 100 cm ocorria um incremento pronunciado do sinal analítico até às 15 repetições, seguido de um ligeiro aumento e depois estabilização do sinal a partir das 20 repetições. Em ambos casos, sequências de amostragem de 15 ciclos produziam idênticos valores de absorvância, apesar do maior tempo de residência do segundo reactor, o que permite concluir que o superior tempo de reacção obtido com o reactor de 100 cm seria compensado pela superior dispersão. Com reatores de 150 e 200 cm o máximo de sinal era obtido com sequências de intercalação ainda maiores, de 25 e 30 repetições respectivamente, embora não se registasse alteração apreciável do valor

máximo do sinal. Por outro lado, para sequências de amostragem idênticas o sinal analítico diminuía com o aumento do comprimento do reactor devido à superior diluição do complexo formado.

O incremento do tempo de reacção, através do aumento do tempo de residência, por diminuição do caudal para  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , não resultou numa melhoria do sinal analítico, o mesmo acontecendo quando se efectuaram ensaios com paragem de fluxo. Estes ensaios, que consistiram na paragem de fluxo durante intervalos de tempo entre 100 e 330 s, após a intercalação da amostra, não permitiram melhorar o sinal analítico ao contrário do que aconteceu quando igual volume de amostra foi introduzido de uma única vez, sem intercalação com a solução de ferro(III), demonstrando que a homogeneização amostra/reagente é conseguida de uma forma muito mais rápida através do processo de amostragem binária.

Em função destes resultados foi considerado que a utilização de um reactor de 100 cm, conjuntamente com uma sequência de intercalação de 20 ciclos a um tempo intercalação de 1 s e a um caudal de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , proporcionava um tempo de residência, uma homogeneização e uma dispersão adequada ao desenvolvimento da reacção, permitindo estabelecer um compromisso entre a sensibilidade da análise e o ritmo de amostragem.

Dois outros parâmetros que se revelaram importantes em termos de magnitude do sinal analítico, foram a concentração de Fe(III) e a concentração de HCl. O catião Fe(III) deve estar presente em excesso de modo a assegurar que a reacção de complexação é completa [11]. Os ensaios efectuados utilizando concentrações crescentes deste catião demonstraram que a absorvância aumenta até uma concentração de ferro(III) de 0,5 M, valor acima do qual se mantém quase constante (Fig 4.10).

A concentração de HCl afectava de forma pronunciada a cinética da reacção, como já foi referido anteriormente, sendo por isso um parâmetro fundamental. Verificou-se

que para concentrações de HCl entre 0,01 e 0,2 M o valor da absorvância quase que duplicava, diminuindo depois até uma concentração de 0,5 M (Fig 4.11).

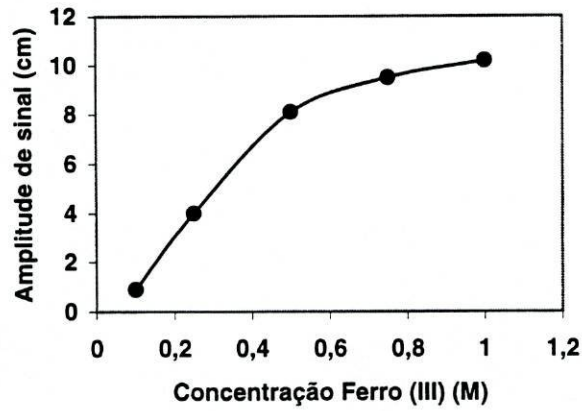


Fig 4.10 – Influência da concentração da solução de ferro (III) na amplitude do sinal analítico.

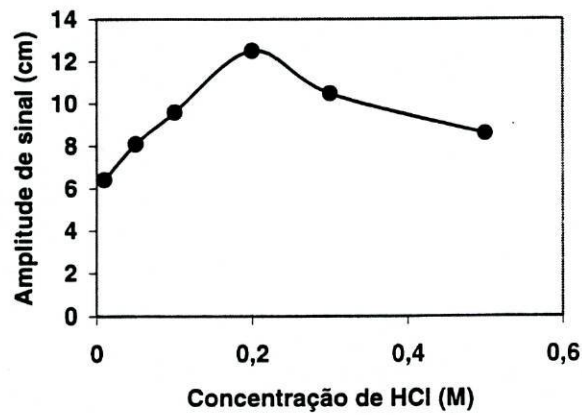


Fig 4.11 – Influência da concentração de HCl na amplitude do sinal analítico.

Após otimização do sistema de fluxo multicomutado desenvolvido, foram obtidas curvas de calibração apresentando uma relação linear entre concentração e absorvância para concentrações de pindolol entre 5 e 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig 4.12). A equação definida por regressão linear da curva de calibração foi a seguinte:  $A = 0.1026 \times C - 0.4311$ , sendo  $A$  a amplitude de sinal, em centímetros, e  $C$  a concentração de pindolol, expressa em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com um coeficiente de correlação igual a 0,9992.

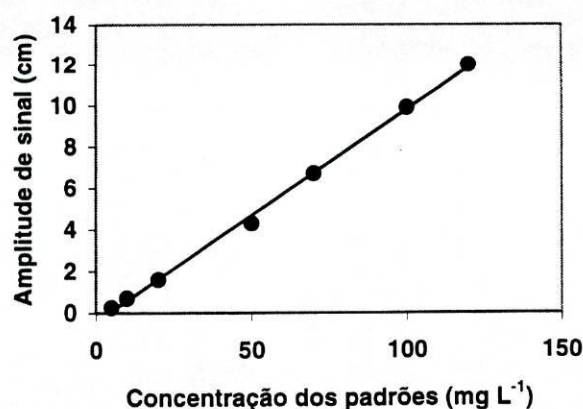


Fig 4.12 – Curva de calibração de pindolol obtida com 20 ciclos de intercalação a 1 s de amostra, 1 s de uma solução de ferro (III) 0,5 M.

#### 4.3.3. Análise de preparações farmacêuticas

Com vista à avaliação do desempenho da metodologia desenvolvida, e desta forma testar as suas potencialidades de utilização em procedimentos laboratoriais de rotina e de controlo de qualidade, o sistema de fluxo multicomutado descrito foi aplicado na análise de formulações farmacêuticas contendo pindolol disponíveis no mercado. A qualidade dos resultados obtidos foi avaliada por análise comparativa com os resultados

obtidos pela metodologia de referência [4]. Para cada um dos lotes foram preparadas soluções de amostra apresentando distintos valores de concentração de pindolol, as quais foram depois analisadas por inserção em triplicado no sistema de fluxo multicomutado.

Os resultados obtidos, tanto para a metodologia desenvolvida como para a de referência, na análise de comprimidos de pindolol comercializados sob a designação Visken (Portugal) e Viskène (Brasil) são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Resultados obtidos na determinação de pindolol em produtos farmacêuticos.

Amostra	Concentração declarada (mg/comp.)	Lote analisado	Concentração determinada (mg/comp.)		RD (%)*
			Metodologia Desenvolvida	Metodologia de Referência	
Visken	5	A	5,13±0,06	5,05	1,58
		B	5,00±0,06	5,00	0
		C	4,94±0,05	4,92	0,41
Viskène	5	D	5,14±0,06	5,08	1,18
		E	4,85±0,05	4,96	-2,21
		F	4,92±0,05	4,98	-1,20

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

Para comprimidos contendo 5 mg de pindolol, foram obtidos desvios relativos da metodologia desenvolvida em relação à metodologia de referência, expressos em percentagem, entre -2,21 e 1,58%. Os valores de absorvância obtidos por inserção

repetida (n=10) de uma amostra, apresentaram um desvio padrão relativo (RSD) inferior a 1,1%.

A Figura 4.13 apresenta o registo gráfico obtido na análise de padrões com concentrações de pindolol entre os 10 e os 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , assim como na análise de algumas amostras.

Os ritmos de amostragem obtidos foram de 30 amostras por hora.

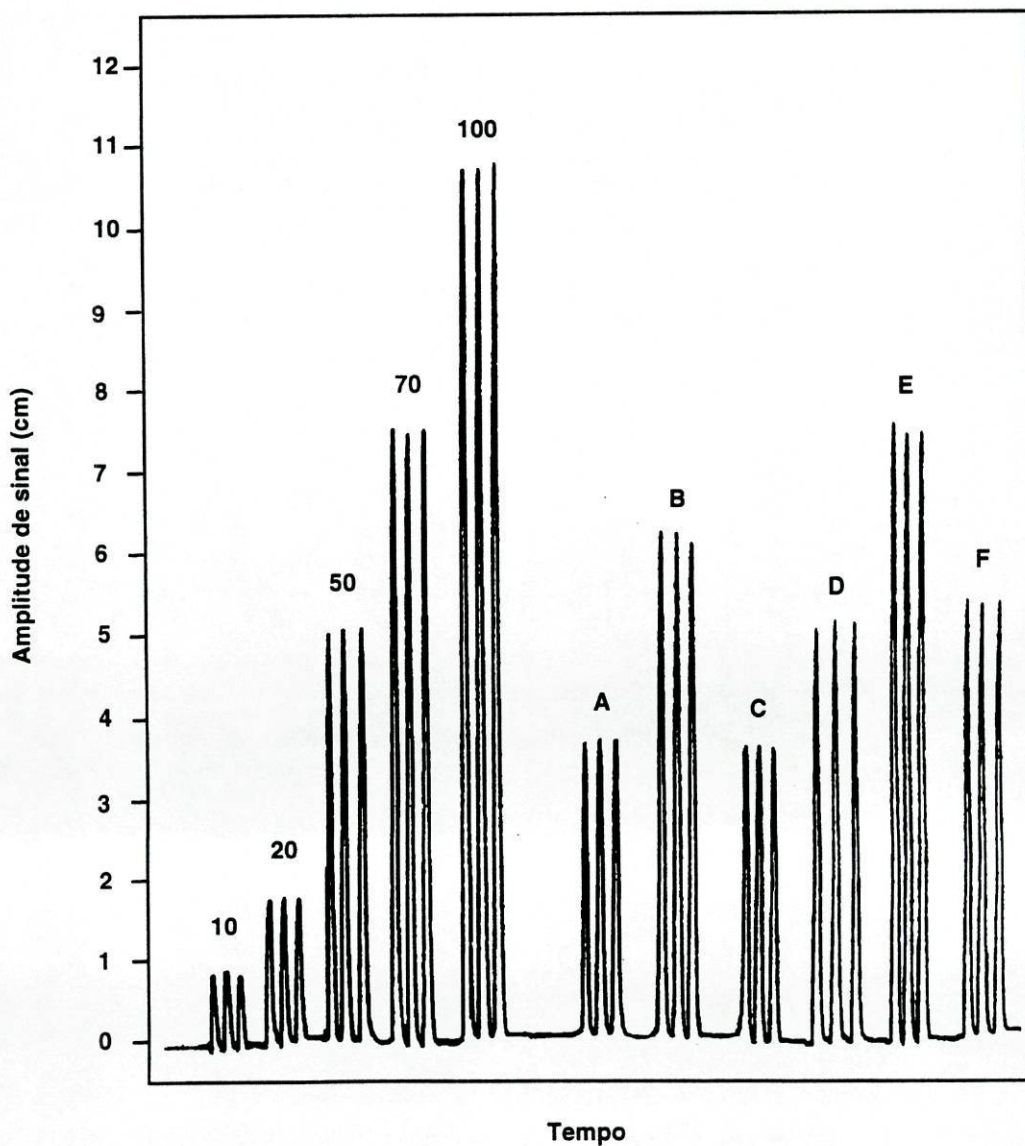


Fig 4.13 – Registro gráfico de uma curva de calibração de pindolol obtida com uma sequência de intercalação de 20 ciclos a (1 s/1 s) de amostra/ferro (III) e soluções padrão de 10, 20, 50, 70 e 100 mg L<sup>-1</sup>, e de algumas amostras A, B, C, D, E, F de preparações farmacêuticas contendo pindolol.

#### 4.4. Conclusões

A versatilidade e facilidade de operação exibidas pelo sistema de fluxo multicomutado desenvolvido, o qual possibilita nomeadamente a intercalação de pequenas alíquotas de amostra e reagente, em combinação com uma eficiente estratégia para compensação do efeito *Schlieren*, assegura um efectivo controlo da dispersão e deste modo da própria reacção química. Estes atributos proporcionam a sua aplicação em diferentes situações, como por exemplo em sistemas de fluxo de baixa dispersão, sempre que seja necessário manter a integridade da amostra, sempre que a análise envolva amostras com grande variabilidade de concentração ou quando estejam presentes elevados gradientes de concentração, sem necessidade de alterar a geometria do sistema de fluxo.

A implementação de um sistema de fluxo multicomutado baseado na utilização de uma solução transportadora processada em linha, apresentando um perfil de concentrações semelhante ao da zona de amostra, revelou ser uma estratégia vantajosa para prevenir a formação de gradientes de concentração e, assim, compensar o efeito *Schlieren*. Mais ainda, a versatilidade da estratégia proposta, permite a sua aplicação a qualquer reacção, com distintos analitos e reagentes, uma vez que qualquer sequência de intercalação da zona de amostra pode ser reproduzida aquando da preparação da solução de transporte.

Esta metodologia, aplicada na determinação de pindolol em preparações farmacêuticas, exibiu elevadas operacionalidade e versatilidade, sobretudo no que se refere à ampla possibilidade de selecção de volume de amostragem e de configuração de intercalação amostra/reagente. Por outro lado, os resultados obtidos confirmam-na como uma metodologia perfeitamente adequada para a execução de análises de rotina e de controlo de qualidade para determinação de pindolol em matéria-prima e em produtos

farmacêuticos, podendo constituir-se como uma alternativa vantajosa aos métodos convencionais, assim como para aplicação em ensaios de dissolução de formas sólidas.

#### 4.5.Referências

- [1] K. Parfitt, *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*, 13<sup>a</sup> ed., The Pharmaceutical Press, London, 1993.
- [2] W.H. Frishman, *N. Eng. J. Med.*, 308 (1983) 940.
- [3] <<http://www.bcmhs.bc.ca/phSept98.htm>>
- [4] Farmacopeia Portuguesa VI - Edição Oficial, INFARMED, Lisboa 1997, pg. 1302.
- [5] M.E. Mohamed, M.S. Tawakkol, H.Y. Aboul-Enein, *Spectrosc. Lett.*, 15 (1982) 609.
- [6] M.S. Mahrous, A.S. Issa, M.A. Abdel-Salam, N. Soliman, *Anal. Lett.*, 19 (1986) 901.
- [7] A.S. Issa, M.S. Mahrous, M. Abdel-Salam, N. Soliman, *Talanta*, 34 (1987) 670.
- [8] S.K. Banerjee, R. Mashru, *Indian J. Pharm. Sci.*, 51 (1989) 74.
- [9] N.A. Zakhari, S.M. Hassan, Y. El-Shabrawy, *Anal. Lett.*, 22 (1989) 3011.
- [10] G. Ramana-Rao, A.B. Avadhanulu, D.K. Vatsa, *Indian Drugs*, 27 (1989) 198.
- [11] D. Pecanac, D. Radulovic, L. Zivanovic, S. Agatonovic-Kustrin, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9 (1991) 889.
- [12] S.K. Banerjee, R. Mashru, *Indian J. Pharm. Sci.*, 53 (1991) 70.
- [13] M.S. Mahrous, A.S. Issa, M.S. Ahmed, *Talanta*, 39 (1991) 69.
- [14] S.V. Erram, H.P. Tipnis, *Indian Drugs*, 30 (1993) 319.
- [15] I. Panderi, M. Parissi-Poulou, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12 (1994) 99.
- [16] M.E. Mohamed, M.S. Tawakkol, H.Y. Aboul-Eneim, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66 (1983) 273.
- [17] T.P. Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, J. Carpena, *Talanta*, 45 (1998) 969.
- [18] B. Diquet, J.J. Nguyen.Huu, H. Boutron, *J. Chromatogr. B : Biomed. Appl.*, 32 (1984) 430.
- [19] M. Telting-Diaz, M.T. Kelly, C. Hua, M.R. Smyth, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9 (1991) 889.

- [20] B.J. Shields, J.J. Lima, P.F. Binkley, C.V. Leier, J.J. Mackichan, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, 51 (1986) 163.
- [21] F. Mangani, G. Luck, C. Fraudeau, E. Verette, *J. Chromatogr. A*, 762 (1997) 235.
- [22] P.M. Lacroix, D. Moir, E.G. Lovering, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73 (1990) 521.
- [23] B.R. Patel, J.J. Kirschbaum, R.B. Poet, *J. Pharm. Sci.*, 70 (1981) 336.
- [24] P.H. Hsyu, K.M. Giacomini, *J. Pharm. Sci.*, 75 (1986) 601.
- [25] H.L. Zhang, J.T. Stewart, M. Ujhelyi, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, 668 (1995) 309.
- [26] J.L. Beal, S.e. Tett, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, 715 (1998) 409.
- [27] M.Guerret, D. Lavene, J.R. Kiechel, *J. Pharm. Sci.*, 69 (1980) 1191.
- [28] F. Susanto, H. Reinauer, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 318 (1984) 425.
- [29] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, *Anal. Chim. Acta*, 293 (1994) 129.
- [30] D. Betteridge, E.L. Dagless, B. Fields, N.F. Graves, *Analyst*, 103 (1978) 897.
- [31] F.J. Krug, H.Bergamin Filho, E.A.G. Zagatto, S.S. Jorgensen, *Analyst*, 102 (1977) 503.
- [32] T. Yamane, M. Saito, *Talanta*, 39 (1992) 215.
- [33] J. Ruzicka, E.H. Hansen, "*Flow Injection Analysis*", 2<sup>a</sup> ed., John Wiley and Sons, New York, 1988.
- [34] F.R.P. Rocha, J.A. Nóbrega, *Química Nova*, 19 (1996) 636.
- [35] E.A.G. Zagatto, M.A.Z. Arruda, A.O. Jacintho, I.L. Mattos, *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 153.
- [36] A.G. Fogg, E. Cipko, L. Farabella, J.F. Tyson, *Analyst* 115 (1990) 593.
- [37] A.T. Haj-Hussein, G.D. Christian, *Analyst*, 111 (1986) 65.
- [38] J. Thomsen, K.S. Johnson, R.L. Petty, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 2378.
- [39] I.D. Mckelvie, D.M.W. Peat, G:P. Matthews, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, 351 (1997) 265.
- [40] C. Pasquini, W.A. Oliveira, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 2527.

- [41] G.D. Clark, J.M. Hungerford, G.D. Christian, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 973.
- [42] G. Ham, *Anal. Proc.*, 18 (1981) 69.
- [43] M.B. Garn, M. Gisin, H. Gross, P. King, W. Schmidt, C. Thommen, *Anal. Chim. Acta*, 207 (1988) 225.
- [44] R.A. Leach, J. Ruzicka, J.M. Harris, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1669.
- [45] N. Maniasso, E.A.G. Zagatto, R.E. Santelli, *Anal. Chim. Acta.*, 331 (1996) 17.

# **CAPÍTULO 5**

---

## ***DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CLORETO COM RECIRCULAÇÃO DA ZONA DE AMOSTRA***

Neste capítulo é descrito o desenvolvimento de um sistema de fluxo multicomutado, com uma configuração circular aberta, o qual foi aplicado na determinação do anião cloreto em soluções parenterais. O sistema desenvolvido permitia a recirculação contínua da zona de amostra, até à obtenção de um valor de diluição que possibilitasse enquadrar a concentração desta no intervalo de concentrações determináveis, e a inclusão do detector no reactor circular possibilitava a realização de multidetecções. O nível de diluição foi aumentado por intermédio de sucessivas remoções das secções frontal e terminal da zona da amostra e consequente dispersão da porção remanescente. A contínua renovação do reagente cromogénico, o qual foi usado como solução transportadora, permitiu aumentar a extensão da reacção uma vez que promovia a dispersão mútua amostra/reagente.

## 5.1.Introdução

### 5.1.1.Caracterização do anião cloreto

O anião cloreto é o principal anião extracelular [1]. A maior parte do cloreto ingerido é absorvido, sendo o excesso excretado na urina, atingindo as concentrações séricas normais níveis entre 98 e 106 mmol L<sup>-1</sup>, embora valores ligeiramente mais altos possam ser observados em doentes que exibem uma produção acrescida de HCl ao nível das células parietais do estômago. A excreção normal diária de cloreto assume valores entre 110 e 250 mmol.

Situações de hipoclorémia (baixos valores séricos de cloreto) são resultantes de perdas excessivas de Cl<sup>-</sup> as quais estão associadas com elevadas perdas gastrointestinais de HCl, cetoacidose diabética, excesso de mineralocorticóides e excreção excessiva causada por doença renal. Baixos níveis sérico poderão estar também associados com situações clínicas em que existe uma elevada concentração de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (alcalose metabólica), que é compensada através de um aumento da excreção de cloreto. Outra possível causa de hipoclorémia é a presença de baixas concentrações de Na<sup>+</sup>, em caso, por exemplo, de nefropatia crónica.

A hiperclorémia pode ocorrer em condições de acidose metabólica resultante de uma perda excessiva de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a qual pode ser causada por perda gastrointestinal, acidose renal tubular e deficiência mineralocorticóide. Em casos menos frequentes, a administração excessiva de NH<sub>4</sub>Cl ou de sais acídicos de aminoácidos (em hiperalimentação) poderá também originar hiperclorémia.

O anião cloreto é um componente comum das soluções parentéricas de grande volume, que são definidas como preparações farmacêuticas para administração intravenosa, em volumes superiores a 100 mL, preparadas sem conservantes e que são normalmente utilizadas para fornecer ao organismo água, electrólitos e/ou nutrientes [12].

As substâncias geralmente utilizadas na composição de soluções parentéricas são carboidratos (dextrose, fructose, sacarose, maltose, etc), polióis (glicerol, manitol, sorbitol e xilitol), aminoácidos e hidrolisados proteicos e sais inorgânicos. Estes últimos são usados como fornecedores de electrólitos ou ajustadores de tonicidade e incluem os cloretos de sódio, potássio, cálcio e magnésio e os fosfatos e bicarbonatos de sódio e potássio.

A composição em electrólitos, e sobretudo nos electrólitos mais importantes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$ , é um dos mais importantes parâmetros de controlo em soluções parenterais de grande volume, visto que certos processos metabólicos são, em extensão variável, afectados pela concentração absoluta destes electrólitos, os quais são factores condicionantes da osmolaridade e do estado de hidratação e pH dos líquidos intra e extracelular [1].

### **5.1.2. Métodos de análise**

São várias as metodologias analíticas propostas para determinação de cloretos em solução [2] as quais têm sido objecto de inúmeras alterações. Entre estas metodologias incluem-se um método argentométrico, sendo o ponto de equivalência determinado com o recurso ao cromato de potássio, e um método mercurimétrico sendo usado como indicador de ponto de equivalência a difenilcarbazona. A Farmacopeia Portuguesa refere como metodologia de análise de soluções de cloreto de sódio a titulação com tiocianato de amónio por retorno, após adição de um excesso de nitrato de prata, na presença de sulfato ferro(III) [3], enquanto que a Farmacopeia Britânica refere para a determinação de cloreto, a titulação com nitrato de prata sendo o ponto de equivalência determinado potenciométricamente com auxílio de um eléctrodo de  $\text{AgCl/Ag}$  [4]. Um outro método amplamente utilizado [5-7] é o método baseado na libertação do tiocianato pelo cloreto, a

partir do tiocianato de mercúrio, o qual forma com o ião ferro (III) um composto com uma elevada absorvância a 480 nm.

Foram também propostos métodos potenciométricos directos, com eléctrodos sensíveis ao anião cloreto com membrana cristalina baseada numa mistura de  $\text{AgCl}/\text{Ag}_2\text{S}$ , e por titulação potenciométrica com catião prata (I), usando como eléctrodo indicador um eléctrodo sensível a este catião com sensor de  $\text{Ag}_2\text{S}$ , as quais foram aplicados na análise de soluções parenterais [8]. Mais recentemente foram propostas metodologias de análise por injeção em fluxo usando como detectores eléctrodos tubulares sensíveis a cloreto, as quais foram utilizadas na determinação deste anião em soluções parenterais e de diálise [9].

A determinação de cloreto em preparações farmacêuticas foi também efectuada com recurso a técnicas cromatográficas, nomeadamente por cromatografia iónica [10,11].

### **5.1.3. Multidetecção**

As metodologias de análise em fluxo contínuo apresentam, como já foi referido anteriormente (Capítulo 1), um conjunto de aspectos específicos que caracterizam o seu funcionamento, como sejam a dispersão controlada da zona de amostra e a reprodutibilidade da detecção, os quais lhes conferem versatilidade e um enorme potencial para implementação de processos analíticos automáticos.

Estes aspectos podem no entanto em determinadas situações, apresentar algumas limitações. Assim, a versatilidade de controlo ao nível da dispersão é limitada pela existência de parâmetros na maior parte dos casos fixos, como sejam o volume de amostra e as dimensões do reactor. Por outro lado, o sinal analítico obtido tem normalmente um carácter único, visto que o detector se comporta como um componente estático, sendo a zona de amostra após a medida perdida para dreno, o que faz com que o resultado final dependa de uma única leitura. Mais ainda, uma vez que se assegura a

reprodutibilidade do processo de amostragem, na maior parte dos casos o grau de diluição obtido é fixo, sendo igual para todas as amostras independentemente da sua concentração.

Desta forma, e em termos puramente teóricos, o desenvolvimento de uma metodologia de fluxo que permitisse combinar a injeção de volumes variáveis de amostra, com a utilização de reactores de volume variável e a realização de multidetecções, conferiria uma maior versatilidade à manipulação da amostra ao mesmo tempo que permitiria monitorizar a sua evolução, nomeadamente no que diz respeito ao grau de dispersão, ao desenvolvimento da reacção e à execução de multideterminações.

São inúmeras as configurações de sistemas de fluxo propostas para implementação de procedimentos analíticos, mas em reduzido número as que contemplam a multidetecção e multideterminação [13]. Aliás, estes dois conceitos são de difícil delimitação, visto que a multideterminação pode ou não ser conseguida através da multidetecção, e por outro lado a multidetecção não implica necessariamente multideterminação.

A multidetecção, representando a recolha acrescida de informação por intermédio de vários sinais analíticos, em vez de um único, pode ser conseguida de diferentes formas, como sejam a utilização de configurações em circuito fechado (*closed-loop*), a utilização simultânea de vários detectores, colocados em série ou em paralelo, e a utilização de uma estratégia de inversão da direcção do fluxo [14].

Uma das formas elementares de obter dois picos por inserção de amostra é utilizar volumes de amostra suficientemente elevados de forma a criar uma zona central em que, por deficiente dispersão, não ocorre reacção, funcionando esta zona como separação das duas detecções correspondentes às zonas frontal e terminal da amostra [15]. Alternativamente, após a inserção, a amostra poderá ser dividida em duas zonas, que percorrem dois reactores diferentes originando duas zonas de reacção com reagentes também eles diferentes, convergindo depois num único reactor antes da detecção, onde

originam os dois sinais analíticos [16]. Esta configuração pode ser utilizada com reactores de distinto comprimento, possibilitando tempos de reacção diferentes para determinações cinéticas [17], ou então valores de dispersão distintos o que permite a expansão da gama de concentrações determináveis [18]. Outra proposta, implica a utilização combinada de duas válvulas de inserção de 6 portas, em que a segunda válvula é posicionada na alça (*loop*) de amostragem da primeira, permitindo a selecção de um percurso alternativo [19]. A utilização de uma válvula de 8 portas e a implementação da técnica de *sandwich*, foi também utilizada com vista à obtenção de dois sinais, correspondendo a dois valores distintos de concentração [6].

A inversão repetida da direcção do fluxo transportador, obrigando a zona de amostra a passar múltiplas vezes pelo detector, é uma forma expedita de obter multideteccções ao mesmo tempo que possibilita a variação da distância percorrida pela zona de amostra. Betteridge *et al.* [20] propuseram várias configurações de inversão de fluxo, incluindo configurações automatizadas para conseguir um melhor controlo da dispersão. Rios *et al.* [21] propuseram uma estratégia de inversão de fluxo, em que apenas uma zona representativa da zona da amostra passava repetidamente pelo detector e não toda a amostra. Townsend and Crouch [22] propuseram várias configurações utilizando duas válvulas de 6 portas, controladas por computador, para inversão e recirculação do fluxo.

As estratégias baseadas em intervenções ao nível da configuração da montagem de fluxo, nomeadamente a utilização de configurações em circuito fechado (*closed loop*) são as mais amplamente divulgadas para obtenção de múltiplos sinais analíticos. Estas montagens são normalmente baseadas na introdução da amostra numa reactor fechado, que inclui o detector e uma bomba peristáltica, o que permite a recirculação contínua da zona de amostra sem que haja renovação da solução transportadora. São por isso sistemas vocacionados para medidas cinéticas e para processos de extracção em contínuo.

Os sistemas em configuração fechada foram inicialmente desenvolvidos por Mottola e Dutt em 1975, para execução de determinações cinéticas baseadas em sinais transientes [23], e incluíam um reservatório através do qual era recirculada a solução reagente transportadora. Mais tarde Mottola e colaboradores desenvolveram sistemas enzimáticos em fluxo, em circuito fechado, com recirculação e reutilização [24], e imobilização [25] da enzima. Sistemas de fluxo de configuração semelhante foram desenvolvidos por Roehring *et al.* [26], para determinação de glicose com regeneração e recirculação de enzimas, e por Valcarcel *et al.* [27] para determinação amperométrica de dióxido de enxofre no ar, por intercalação directa de uma amostra de ar numa solução reagente transportadora, a qual era permanentemente regenerada num depósito incluído na montagem. Estes sistemas eram caracterizados por possuir um reservatório onde era armazenada a solução recirculante, mas em 1985 Valcarcel *et al.* [28] propõem uma nova configuração, em que uma válvula tinha a dupla função de introduzir a amostra no circuito e de o fechar, de forma a permitir a recirculação da zona de amostra e de todo o conteúdo do circuito fechado. Esta montagem fechada, controlada por computador, foi utilizada para detecções iterativas e determinações simultâneas em métodos cinéticos [29], em fluorimetria [30], e em métodos de diluição ou concentração [28]. Fernandez-Romero e Luque de Castro propuseram uma metodologia semelhante, com funcionamento automático, para determinação da actividade enzimática da malato desidrogenase [31]. Um método enzimático foi também desenvolvido por Almuaid e Townshend para determinação de etanol num circuito fechado através da repetida passagem por uma minicolumna contendo álcool desidrogenase imobilizada [32] enquanto que Ruzicka *et al.* [33] propuseram um sistema de fluxo em configuração fechada para extracção contínua por intercalação de amostras aquosas com pequenos volumes de solvente orgânico. Um sistema de fluxo fechado, denominado análise por injeção em fluxo com circulação de zona (ZCFIA) foi recentemente proposto por Li e Narusawa [34] e aplicado na avaliação e clarificação de alguns conceitos teóricos, nomeadamente dos factores que afectam a

dispersão, relacionados com a análise por injeção em fluxo. A aplicação de configurações fechadas na análise de produtos farmacêuticos e em espectrofotometria de absorção atômica por injeção em fluxo foi objecto de dois trabalhos de revisão [35, 36].

Outra estratégia usada para obter multideteccções consiste na utilização de vários detectores colocados quer em série, possibilitando, por exemplo, a realização de determinações cinéticas diferenciais [37], quer em paralelo, para a determinação simultânea de dois analitos [38].

Foi também desenvolvida uma metodologia visando a obtenção de multideteccções, baseada na utilização de um único detector que é recolocado em diferentes posições no interior da montagem de fluxo [39-41]. Desta forma são obtidos vários sinais, num sistema de fluxo aberto, que correspondem a deteccções faseadas da zona de amostra.

#### **5.1.4.Objectivo**

A implementação de um sistema analítico que permitisse a recirculação contínua da zona de amostra proporcionaria um conjunto de vantagens em termos metodológicos, possibilitando a execução de multiprocessamentos ao nível da mesma zona de amostra.

O trabalho desenvolvido teve como objectivo a implementação de um sistema contínuo circular de fluxo multicomutado, com uma configuração aberta, capaz de providenciar reactores teoricamente de comprimento variável, o que possibilitaria diluições de dimensão também variável que poderiam por isso ser ajustadas à concentração da amostra. Um das vezes que as soluções parenterais apresentam concentrações elevadas em anião cloreto, exibindo adicionalmente uma grande variabilidade de concentração neste anião, afirmam-se como amostras ideais para avaliar, através da determinação desta espécie, a metodologia desenvolvida. A renovação permanente do reagente e por isso da zona de reacção, possibilitando o aumento do factor de diluição, e a realização de

multidetecções com monitorização do desenvolvimento da reacção, contribuem para o aumento da eficiência e da versatilidade da metodologia proposta.

## **5.2. Parte Experimental**

### **5.2.1. Reagentes e soluções**

A solução padrão de anião cloreto, com uma concentração de 1% (m/V), foi preparada por pesagem rigorosa de NaCl, após condicionamento a 110 °C durante pelo menos 24h, seguida de solubilização em HNO<sub>3</sub> 0,014 mol L<sup>-1</sup>, e diluição até 500 cm<sup>3</sup> com a mesma solução ácida. As soluções padrão utilizadas na elaboração das curvas de calibração foram preparadas por diluição de volumes apropriados da solução padrão mais concentrada, com uma solução de HNO<sub>3</sub> 0,014 mol L<sup>-1</sup>.

A solução reagente era constituída por Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 37,1 mmol L<sup>-1</sup>, e Hg(SCN)<sub>2</sub> 1,90 mmol L<sup>-1</sup>, e era preparada semanalmente a partir de duas soluções: uma solução obtida por dissolução de 0,626 g de Hg(SCN)<sub>2</sub> em 150 mL de etanol, seguida da adição de 140 mL de HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup>, e uma segunda solução obtida por solubilização de 14,85 g de Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> em 600 mL de água desionizada, com aquecimento. Após preparação e arrefecimento à temperatura ambiente da solução de sulfato de ferro (III), as duas soluções eram misturadas e o volume final era aferido a 1000 mL.

### **5.2.2. Equipamento**

Como instrumento de medida, incorporado nas montagens para avaliação da absorvância a 480 nm, foi utilizado um espectrofotómetro LaboMed, modelo Spectro 22RS, equipado com uma célula de fluxo com um volume óptico de 18 µL.

A montagem de fluxo era constituída por válvulas solenóides de três vias (uma entrada/duas saídas) da marca NResearch, modelo 161 T031, já apresentadas anteriormente (Capítulo 2). Estas válvulas foram ligadas entre si, assim como com o detector e com o dispositivo de propulsão das soluções, através de tubagens com um diâmetro interno de 0,8 mm, fabricados em PTFE.

As soluções eram propulsionadas por aspiração por intermédio de uma bomba de pistão da marca Razel, modelo A-99, equipado com uma seringa com uma capacidade de 50 mL.

As titulações potenciométricas utilizadas como método de referência foram realizadas com o auxílio do titulador automático, cujo constituição e modo de funcionamento já referido anteriormente (Capítulo 2).

### ***5.2.3. Montagem de fluxo multicomutado***

A montagem de fluxo multicomutado foi idealizada de modo a que o seu funcionamento fosse simplificado, tanto em termos de número de válvulas a incorporar, como no que respeita à programação da sua comutação temporizada (Fig 5.1).

Assim, criou-se uma zona central composta por 4 válvulas solenóides de 3 vias (uma entrada/duas saídas) ( $V_1$ - $V_4$ ) colocadas sequencialmente, as quais estavam dispostas de modo a ocuparem os vértices do circuito, mas de forma a que o seu accionamento combinado permitisse criar um percurso analítico com uma configuração circular. A disposição das válvulas, e o modo como se interligavam, através de 4 reactores ( $L_1$ - $L_4$ ), permitia que, em vez de uma temporização individual, o controlo do sistema fosse dividido em duas fases (comutação das válvulas duas a duas), o que simplificava todo o processo. Uma quinta válvula ( $V_5$ ) estava ligada directamente (sem qualquer tubagem interposta) à válvula  $V_1$  e era responsável pela inserção da amostra. Esta válvula era

mantida permanentemente na posição 1 (Fig 5.1), com excepção da fase de amostragem, em que era colocada na posição 2.

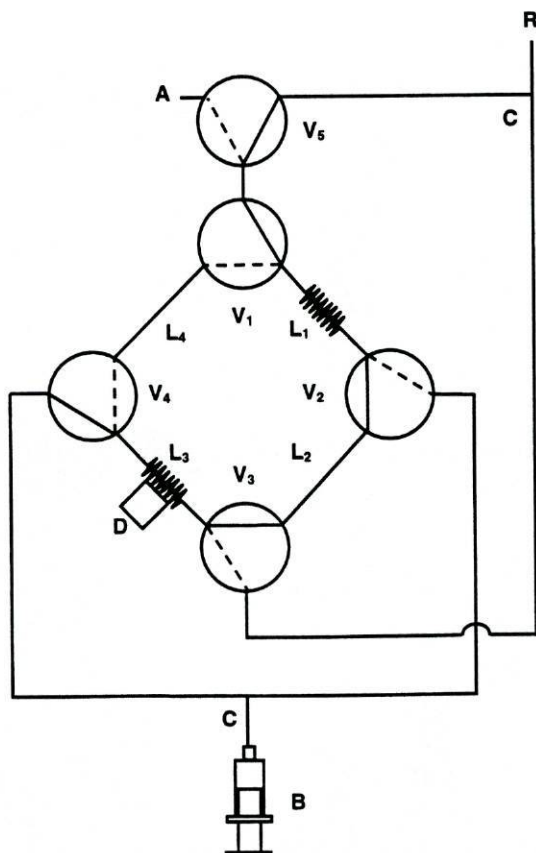


Fig 5.1 – Montagem de fluxo multicomutado com configuração circular aberta para recirculação da zona de amostra: A - amostra; R - reagente; V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub>, V<sub>4</sub> e V<sub>5</sub> - válvulas solenóides; L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub> - reactores; D - detector; B - sistema de propulsão; C - ponto de confluência.

Quanto ao funcionamento do sistema analítico (Fig 5.2), inicialmente V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub> e V<sub>5</sub> eram accionadas para a posição 1, enquanto que V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub> eram colocadas na posição 2.

Nesta configuração, a solução transportadora, que era simultaneamente a solução reagente, era inserida na montagem circular através de  $V_5$  e  $V_1$ , fluindo sucessivamente através de  $V_2$  e  $V_3$ , e da célula de fluxo do detector colocado em  $L_3$  (o que permitia estabelecer a linha de base), sendo aspirada e abandonando o sistema através de  $V_4$ .

A inserção da amostra no sistema circular (Fig 5.2A) processava-se por comutação de  $V_5$  para a posição 2, permanecendo as restantes válvulas nas mesmas posições.  $V_5$  era mantida na posição 2 durante um intervalo de tempo pré-definido, denominado tempo de amostragem ( $t_a$ ), que permitia que um volume determinado da solução de amostra penetrasse na montagem circular, por aspiração através de  $V_4$ , e ocupasse o reactor  $L_1$ .

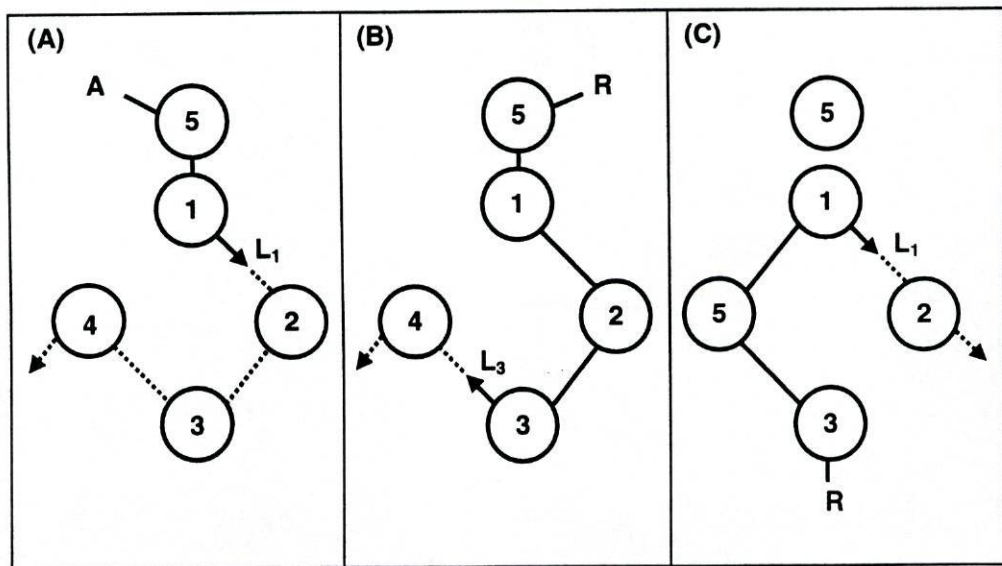


Fig 5.2 – Esquema de funcionamento da montagem de fluxo multicomutada para recirculação da zona de amostra: A - amostra; R - reagente; 1,2,3,4 e 5 - válvulas solenóides;  $L_1$  e  $L_3$  – reatores.

No término do tempo de amostragem,  $V_5$  era recolocada na posição 1 (Fig 5.2B), e ocorria a primeira fase de transporte: novamente por aspiração através de  $V_4$ , a solução reagente transportadora era introduzida na montagem, carregando a zona de amostra até ao detector em  $L_3$ , onde ocorria a primeira detecção.

Após um segundo intervalo de tempo, denominado de tempo de primeira detecção ( $t_d$ ), e que estabelecia a porção da zona de amostra que permanecia em  $L_3$  ou que era aspirada para dreno por  $V_4$ , iniciava-se a segunda fase de transporte:  $V_1$  e  $V_2$  eram comutadas para a posição 2, enquanto que  $V_3$  e  $V_4$  eram colocadas na posição 1. Nesta configuração (Fig 5.2C), a solução reagente transportadora era agora admitida no sistema por  $V_3$ , carregando a zona de amostra, em  $L_3$ , sucessivamente através de  $V_4$  e  $V_1$  até encher novamente  $L_1$ , processando-se a sua aspiração através de  $V_2$ .

Ao fim de um terceiro intervalo de tempo, denominado de tempo de transporte ( $t_t$ ), e que definia de igual modo a porção da zona de amostra que era aspirada para dreno, por  $V_2$ , ou a que permanecia em  $L_1$ , verificava-se uma nova mudança de posição das válvulas, repetindo-se a primeira fase de transporte (Fig 5.2B):  $V_1$  e  $V_2$  eram colocadas novamente na posição 1, e  $V_3$  e  $V_4$  na posição 2, sendo a zona de amostra, no interior de  $L_1$ , transportada para segunda detecção, em  $L_3$ . Depois o processo repetia-se continuamente, com recirculação da zona de amostra através da repetição das fases de transporte (Fig 5.2B e 5.2C), controladas pelo tempo transporte ( $t_t$ ), sendo obtidas tantas detecções quantas as passagens da zona de amostra pelo detector em  $L_3$ .

O comprimento do reactor global (considerado como a soma de todos os reactores individuais  $L_1$  a  $L_4$ ) era de 60 cm.  $L_3$  apresentava um comprimento de 30 cm, que era o comprimento mínimo indispensável para permitir a colocação do detector neste reactor (em virtude da posição do suporte da célula de fluxo no interior do espectrofotómetro). De modo a obter um sistema simétrico, e assim assegurar que as sucessivas zonas de amostra recirculadas apresentavam volumes semelhantes,  $L_1$  tinha também 30 cm de comprimento. Deste facto resulta que, por motivos que serão adiante referidos, os

reactores L<sub>2</sub> e L<sub>4</sub> tenham sido eliminados, sendo as válvulas ligadas directamente através de um ligador duplo.

#### **5.2.4. Método de referência**

A determinação de cloretos em soluções parenterais foi efectuada por titulação potenciométrica de acordo com a Farmacopeia Britânica [4]. Como titulante foi usada uma solução 0,1 M em AgNO<sub>3</sub>, sendo a concentração de titulante monitorizada através de um eléctrodo sensível ao catião prata(I), de membrana cristalina homogénea, construído no Laboratório de Química-Física [42], tendo como eléctrodo de referência um eléctrodo de dupla junção Orion, referência 900200, com KNO<sub>3</sub> no compartimento exterior. A solução titulante foi aferida com uma solução padrão de cloreto de sódio por titulação potenciométrica. As titulações foram executadas em meio ácido, contendo HNO<sub>3</sub>.

#### **5.3. Resultados e sua discussão**

Ao conceito de recirculação contínua da zona de amostra no interior de um sistema de fluxo, poderá ser associada à ideia de um reactor de comprimento inicialmente indeterminado, e que será na prática definido pelo número de ciclos, ou passagens, que a zona de amostra executará no sistema. Este comprimento "definido" do reactor poderá ser ajustado ao desenvolvimento da reacção que ocorre no seu interior, assim como aos fenómenos de dispersão paralelos, através da selecção automática do número de recirculações envolvidas, de modo a que o percurso percorrido pela zona de amostra, com vista à detecção, permita a optimização do sinal analítico. As vantagens daí resultantes seriam sem dúvida potencializadas nas mais diversas situações analíticas, como por exemplo nas que requerem uma diluição contínua da zona de amostra, possibilitando uma expansão automática do intervalo de concentrações normalmente determinável pelas

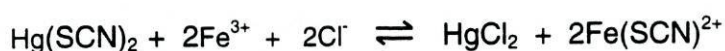
metodologias convencionais. Os sistemas de fluxo com uma configuração em circuito fechado já propostos, evidenciam algumas limitações, como sejam um contínuo achatamento e alargamento dos sinais analíticos obtidos, o que se repercute negativamente no ritmo de amostragem, e a não renovação da solução reagente. Este é, aliás, um aspecto que levanta algumas questões interessantes: uma reacção química no interior de um sistema de fluxo contínuo depende da dispersão mútua que ocorre na interface amostra/reagente. Quando a concentração da amostra é muito elevada, a reacção prossegue com o consumo do reagente ao nível da zona de reacção, produzindo sinais analíticos que, na maior parte dos casos, não são directamente relacionáveis com a concentração, devido ao carácter incompleto da reacção como resultado de uma deficiente homogeneização ou de um déficit de reagente. Como forma de ultrapassar este problema, uma solução típica consiste no ajuste da concentração da amostra por diluição. No entanto, resultados similares poderiam ser obtidos através da adição de mais reagente, o que pode ser conseguido renovando continuamente a solução reagente ao nível da zona de reacção. Nesta situação, proceder-se-ia à substituição da interface de reacção, que seria removida para dreno, por uma nova interface, através da adição de um novo fluxo reagente. Este novo fluxo reagente disponibilizaria uma quantidade acrescida de reagente, promovendo o aumento da extensão da reacção, o que numa situação limite poderia levar ao consumo total do analito. Por outro lado, possibilitaria também a renovação contínua dos gradientes de concentração e das interfaces de reacção, promovendo a difusão e a dispersão mútua amostra/reagente. Finalmente, proporcionaria um aumento global da dispersão e a remoção de zonas de amostra, tendo como resultado a obtenção de elevados valores de diluição.

Se o processo descrito for acompanhado de uma monitorização contínua da zona de reacção, o sinal analítico evidenciará um decréscimo contínuo, passando pela zona de resposta linear (o que corresponderá ao atingir do valor de diluição desejado), e podendo depois, com a continuação das recirculações, tender para a linha de base. O controlo

automático do sistema poderá ser programado de forma a interromper o processo de recirculação aquando da obtenção do valor de diluição adequado.

Os conceitos atrás apresentados foram avaliados por aplicação da montagem de fluxo circular desenvolvida, na determinação de cloretos em soluções parenterais, com base na reacção com o tiocianato de mercúrio, na presença de ferro(III).

Nesta reacção, que pode ser sintetizada pela seguinte equação



o anião cloreto desloca o catião mercúrio, libertando o anião tiocianato que forma com o Fe(III) um complexo corado exibindo uma intensa absorvância a 480 nm [43].

### **5.3.1. Desenvolvimento e optimização da montagem de fluxo**

A implementação da metodologia proposta, recorrendo à versatilidade e à flexibilidade da multicomutação, teve como base o desenvolvimento de uma rede de fluxo apoiada essencialmente em quatro válvulas solenóides de 3 vias ( $V_1$ - $V_4$ ) (Fig 5.1) ligadas por reactores, de tal forma que a montagem final apresentava uma configuração aberta circular, com duas entradas e duas saídas colocadas em posições opostas entre si. A solução reagente transportadora, entrando no sistema de recirculação através de  $V_1$ , podia sair do circuito (para dreno) em  $V_2$  ou então prosseguir no seu percurso e abandonar o sistema através de  $V_4$  (Fig 5.2B). Uma situação similar ocorria quando a solução transportadora entrava através de  $V_3$  e saía ou em  $V_4$  ou em  $V_2$  (Fig 5.2C). Uma quinta válvula ligada directamente a  $V_1$ , sem interposição de qualquer reactor, assegurava a inserção temporizada da amostra (Fig 5.2A). Como resultado desta disposição, a zona de amostra percorria o percurso analítico transportada, sucessivamente, pela solução

reagente introduzida por  $V_1$  e pela solução reagente introduzida por  $V_3$ . Uma confluência externa (Fig 5.1) disponibilizava a solução reagente para ambos os pontos de inserção, enquanto que uma outra assegurava a convergência dos fluxos de saída, aspirados para dreno. O detector podia ser colocada em qualquer posição, no interior do sistema circular, permitindo a monitorização contínua da zona de amostra, ou então no seu exterior, possibilitando apenas uma detecção singular. No trabalho desenvolvido o detector foi colocado no interior do sistema circular possibilitando a obtenção de um registo com múltiplos sinais analíticos (Fig 5.3).

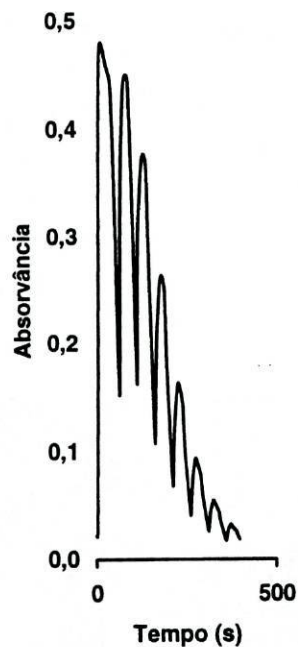


Fig 5.3 – Registo gráfico evidenciando os múltiplos picos obtidos com um solução padrão de cloreto  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ .

Um microcomputador proporcionava o controlo automático da posição da amostra, com base numa estratégia de temporização.

A avaliação da influência do tempo de amostragem na evolução do sinal analítico, permitiu verificar que o volume de amostra recirculado era independente do volume de amostra inserido no sistema, dependendo exclusivamente do volume interno dos reactores  $L_1$  (colocado entre  $V_1$  e  $V_2$ ) e  $L_3$  (colocado entre  $V_3$  e  $V_4$ ). De facto, durante a primeira fase de transporte (Fig 5.2B) a solução transportadora carregava todo o conteúdo do reactor  $L_1$ , que era depois disperso em  $L_3$ . Fenómeno oposto ocorria na segunda fase de transporte (Fig 5.2C) quando todo o conteúdo de  $L_3$  era transportado e disperso no interior de  $L_1$ . Desta forma, e numa situação extrema, o valor máximo de tempo de amostragem que podia ser utilizado, era o que correspondia à inserção de um volume de amostra idêntico ao volume interno de reactor  $L_1$ . Qualquer valor superior resultava na inserção de um volume excessivo de amostra, que, não podendo ser contido em  $L_1$ , era aspirada para dreno.

Este desempenho demonstrou uma das potencialidades do sistema implementado, que era o de poder ser utilizado como sistema de detecção única, sem recirculação, para obtenção de elevadas diluições de uma forma reprodutível. Assim, tendo em consideração que existe uma relação entre o volume de amostra inserido no sistema e o nível de dispersão, o sistema implementado permite que, em vez da inserção de volumes muito pequenos de amostra, a tempos de amostragem inferiores a 1 s (que em função das características operacionais das válvulas são de difícil reprodução), se possam utilizar tempos de amostragem maiores, que possibilitem inclusive o enchimento completo de  $L_1$ . Depois, e independentemente do volume amostrado, com recurso a um controlo temporizado é possível encaminhar a zona de amostra para dreno, através da aspiração por  $V_2$  na posição 2, e só quando a maior parte da zona de amostra já foi eliminada (o que é estabelecido em função do caudal e do tempo de transporte)  $V_2$  é comutada para a

posição 1 e a porção mais terminal da zona de amostra é enviada para detecção, com um valor de diluição elevado, além de obtido de forma reprodutível.

Nos ensaios de recirculação para determinação de cloretos verificou-se que, quando estavam envolvidas amostras com uma concentração elevada em anião cloreto, os sinais analíticos resultantes das primeiras detecções estavam desprovidos de interesse analítico, mesmo quando os volumes de amostragem eram reduzidos, devido ao facto de não corresponderem ao intervalo de concentrações determináveis. De qualquer das formas, e apesar do volume recirculado ser independente do volume amostrado, como foi atrás referido, a utilização de volumes reduzidos de amostra era o mais favorável, uma vez que o número de recirculações necessários para produzir um sinal analítico que pudesse corresponder ao intervalo de resposta linear, aumentava à medida que aumentava o volume ou tempo de amostragem. Assim, foram utilizados tempos de amostragem entre 2 e 4 s, os quais não eram nem demasiados curtos, de modo a evitar a ocorrência de irreprodutibilidades na comutação das válvulas, nem demasiado elevados, para obrigarem a um número acrescido de ciclos. Estes tempos de amostragem correspondiam, para um caudal de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , a volumes de amostragem entre, aproximadamente, 16,6 e 33,2  $\mu\text{L}$ . A utilização de uma estratégia de amostragem binária, com intercalação de pequenas alíquotas de amostra e reagente, não resultou numa melhoria evidente no desenvolvimento da reacção.

O estudo da influência do comprimento dos reactores constituintes do sistema circular, demonstrou que  $L_2$  e  $L_4$  afectavam de forma pronunciada o perfil do sinal analítico obtido. De facto, durante a primeira fase de transporte (Fig 5.2B) quando a zona de amostra era transportada de  $L_1$  até  $L_3$ , a porção terminal dispersa da zona de amostra permanecia em  $L_2$  (colocado entre as válvulas 2 e 3). Durante a segunda fase de transporte (Fig 5.2C), quando a zona de amostra era transportada de novo para  $L_1$ , o conteúdo de  $L_2$  não era afectado visto não participar no processo de recirculação. No

entanto, quando se voltava a repetir a primeira fase do transporte, a mesma porção terminal que tinha sido retida em  $L_2$ , passava agora a ser a porção frontal da nova recirculação, afectando o perfil do pico analítico ou mesmo originando um segundo pico. Uma situação em tudo similar ocorria durante a segunda fase de transporte, onde a porção terminal da zona de amostra que permanecia em  $L_4$ , era transformada, durante o ciclo seguinte, na porção frontal. Por esta razão revelou-se conveniente eliminar ou reduzir ao máximo as dimensões de  $L_2$  e  $L_4$ , o que foi conseguido estabelecendo uma ligação de reduzidas dimensões (com um conector duplo) entre  $V_1-V_4$  e entre  $V_2-V_3$ . Os comprimentos de  $L_1$  e  $L_3$  afectavam de igual modo o desenvolvimento do sinal analítico. Com o objectivo de avaliar o desempenho do sistema, uma primeira decisão tomada foi a de atribuir comprimentos iguais a ambos os reactores. Desta forma pretendia garantir-se a recirculação de volumes idênticos, tanto na primeira como na segunda fase de transporte, o que facilitava o processo de temporização das válvulas visto que era possível atribuir tempos iguais de transporte a ambas as fases. Seguidamente, decidiu atribuir-se o menor comprimento possível aos reactores, que se verificou ser de 30 cm, em virtude das limitações físicas impostas pela colocação do detector e do suporte da célula de fluxo. Esta opção foi apoiada pelo facto do comprimento dos reactores afectar o volume de amostra recirculado, o percurso para dispersão da zona de amostra e o espaço que mediava entre detecções. No entanto estes aspectos não eram apenas condicionados pelo comprimento dos reactores, sendo igualmente influenciados pelo caudal e pela temporização das válvulas. Efectivamente, a porção de amostra recirculada é definida fundamentalmente pela temporização das válvulas, pelo que o comprimento do reactor é secundário, embora seja desejável, no caso de amostras muito concentradas, que o seu valor seja mínimo. No entanto o percurso por onde é transportada a zona de amostra tem que ser suficientemente grande para garantir uma adequada e reprodutível dispersão, também condicionada pelo caudal, o que afecta grandemente a precisão da determinação, embora possa de igual modo reduzir o ritmo de amostragem. Finalmente, a frequência da

deteção é condicionada pelo comprimento dos reactores e pelo caudal, sendo vantajoso, em termos de garantir uma monitorização mais assídua da zona de amostra, a utilização de reactores mais curtos, o que favorece igualmente a frequência de amostragem.

Uma característica vantajosa do sistema circular reside na possibilidade de seleccionar e recircular qualquer sector particular da zona de amostra, o que pode ser facilmente conseguido por intermédio de uma adequada temporização do processo de recirculação. No trabalho desenvolvido, e com o objectivo de demonstrar as potencialidades do sistema, sobretudo em termos de multideteções, foi decido recircular um sector da zona de amostra com uma concentração tal que proporcionasse um registo com diversas deteções, embora a eficiência de diluição não fosse a mais adequada. Por este motivo, a temporização das válvulas teve como critério a obtenção de um sinal analítico elevado, o que afectou o ritmo de amostragem, dado que ao recircular uma zona de amostra mais concentrada aumentava concomitantemente o número de ciclos envolvidos e por isso o tempo requerido para a análise. De qualquer maneira, se necessário, uma amostra concentrada podia ser facilmente analisada com apenas duas deteções, desde que fosse garantido que, com a temporização apropriada, apenas uma pequena porção da zona de amostra inicialmente inserida era recirculada, possibilitando assim a obtenção de uma elevada diluição. Desta forma, o sistema circular funcionava como sistema selectivo de amostragem de zonas, em que a alíquota amostrada dependia do tamanho do reactor e, sobretudo, da temporização utilizada. Qualquer secção ou sector da zona de amostra, desprovido de interesse analítico, podia ser removida durante o processo de recirculação, sendo o nível de diluição obtido dependente da distância percorrida e das secções de amostra sucessivamente removidas.

A avaliação do caudal permitiu verificar que um valor de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , proporcionava uma dispersão apropriada da zona de amostra, conferindo-lhe um perfil de concentração adequado à remoção de zonas. Caudais mais elevados, embora permitissem um incremento do ritmo de amostragem, produziam dispersões menos

intensas e por isso gradientes de concentração mais acentuados, o que era especialmente negativo ao nível do sector mais terminal da zona de amostra, onde ocorria a remoção de zonas, provocando uma diminuição da reprodutibilidade do processo. De facto, quanto mais elevado for o gradiente de concentração, maior é o erro resultante de eventuais desvios na zona removida, o que se repercute negativamente em termos de reprodutibilidade.

O caudal seleccionada ( $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ) possibilitou, desta forma, que o processo de recirculação fosse executado de forma reprodutível. O ensaio de um tempo global de recirculação de 50 s (25 s para a primeira mais 25 s para a segunda fase de transporte) proporcionou tempos de residência de pico entre 49,4 e 50,4 s, o que corresponde a um desvio padrão relativo (RSD) inferior a 0,96%, para um conjunto de 50 ensaios.

A temporização das válvulas foi efectuada com base em três intervalos de tempo: tempo de amostragem ( $t_a$ ), tempo de detecção ( $t_d$ ), que correspondia ao tempo de transporte durante a primeira detecção, e tempo de transporte ( $t_t$ ), que correspondia à segunda fase de transporte e depois ao tempo de recirculação. Como se verá,  $t_d$  era bastante superior a  $t_t$  porque, após a amostragem, a amostra tinha de ser transportada através de  $L_1$  e  $L_3$ , um percurso bastante mais longo (cerca do dobro) do que o normalmente percorrido pela amostra durante as duas fases de recirculação. Seguidamente, em virtude da simetria do sistema, com comprimentos idênticos para  $L_1$  e  $L_3$ , o valor do  $t_t$  para as primeira e segunda fases de transporte do processo de recirculação contínua, era idêntico.

Como já foi referido anteriormente, a utilização de reduzidos tempos de amostragem era vantajosa, na medida em que limitava o número de recirculações que era necessário executar para analisar uma determinada amostra. Desta forma foram seleccionados tempos de amostragem entre 2 e 4 s. A validação da selecção destes  $t_a$  foi efectuada em função dos resultados obtidos com a inserção de uma solução padrão de

cloreto  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , a diferentes  $t_a$  em que verificou um aumento do o sinal analítico, na primeira detecção, com o  $t_a$  até a um valor de 4 s, apresentando depois uma tendência para a estabilização (Fig 5.4).

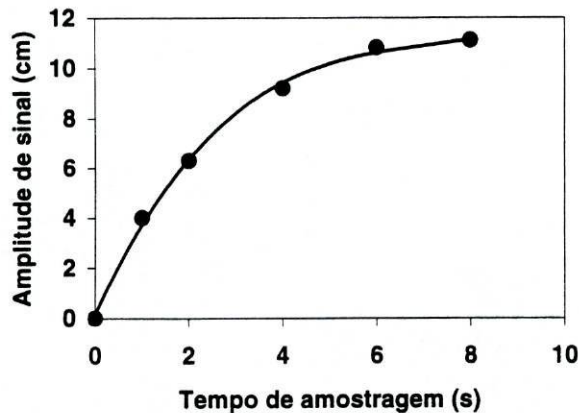


Fig 5.4 – Variação do sinal analítico em função do tempo de amostragem.

Após a avaliação do tempo de amostragem, e correspondente inserção da amostra no sistema de fluxo, efectuou-se o estudo do processo de recirculação. Este estudo iniciou-se pela avaliação da primeira passagem da zona de amostra pelo detector, originando a primeira detecção. Verificou-se que após a inserção da amostra, o máximo de sinal analítico, correspondendo ao máximo de absorvância, era obtido ao fim de, aproximadamente, 25 s e que após 60 s o sinal já não era discriminável ou já havia voltado à linha de base, o que significava que já toda a zona de amostra havia passado pelo detector. No entanto, aos 50 s (25 s após o máximo de sinal) o perfil do sinal analítico apresentava uma tendência decrescente, não muito acentuada, o que fazia prever um gradiente de concentração não muito pronunciado e por isso adequado para o início do

processo de recirculação, sendo por isso o intervalo de tempo ideal para atribuir a  $t_d$ , em função dos objectivos propostos. Este pressuposto era reforçado pelo facto de que, estando o detector colocado a meio do reactor, aos 50 s já a zona central da amostra, mais concentrada, havia passado pelo detector, o que significava que a zona frontal da amostra havia sido já encaminhada para dreno. Ao mesmo tempo, a zona de amostra que se encontrava na parte final do reactor  $L_3$  (entre o detector e  $V_4$ ) apresentaria um perfil de concentração suficientemente elevado para possibilitar multidetecções, como era pretendido. Por outro lado, e uma vez que o gradiente de concentração não era muito elevado, a ocorrência de erros na temporização e na selecção da zona de corte não teria repercussões tão negativas como as que ocorreriam se o gradiente fosse mais acentuado, podendo por isso ser atenuados os efeitos negativos ao nível da reprodutibilidade.

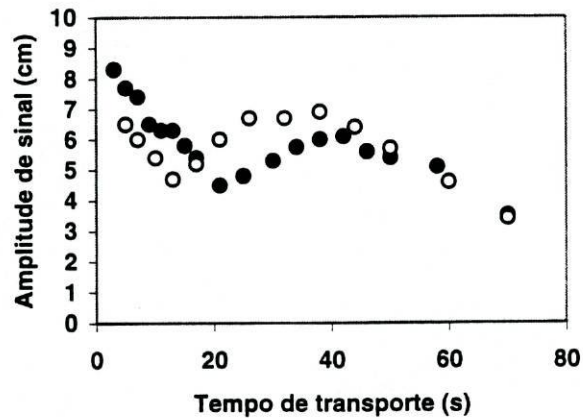


Fig 5.5 – Variação do sinal analítico correspondente à 2ª detecção, em função do tempo de transporte, para dois tempos de detecção: ● - 30 s; ○ - 40 s.

A optimização da segunda detecção teve por base a temporização da segunda fase de transporte, a qual foi avaliada por intermédio do ensaio de crescentes intervalos de

tempo ( $t_t$ ) a diferentes valores de  $t_d$ . Com um  $t_d$  de 30 s o sinal analítico diminuía com o  $t_t$  para valores entre 1 e 21 s, aumentava depois até aos 44 s, para diminuir novamente a valores de  $t_t$  superiores (Fig 5.5).

Estes resultados comprovam que com intervalos de tempo de transporte inferiores a 21 s, a quantidade de amostra inicialmente no interior de  $L_3$  que é transferida para  $L_1$  não é suficiente, sendo o sinal analítico devido quer à porção de amostra que não é totalmente escoada de  $L_3$ , quer à porção terminal da amostra que, com tempos de detecção muito curtos, permaneceu em  $L_1$ .

Resultados similares são obtidos com um  $t_d$  de 40 s (Fig 5.5), os quais apresentam um diminuição do sinal até a um  $t_t$  de 11 s, seguido de um aumento até aos 34 s, e depois uma nova diminuição. No entanto, para um  $t_d$  de 50 s, considerado como o mais adequado em experiências anteriores, o sinal analítico registava, imediatamente, um incremento sustentado até aos 25 s, valor a partir do qual diminuía (Fig 5.6). Em concordância, foi este o valor de  $t_t$  seleccionado para os ensaios posteriores.

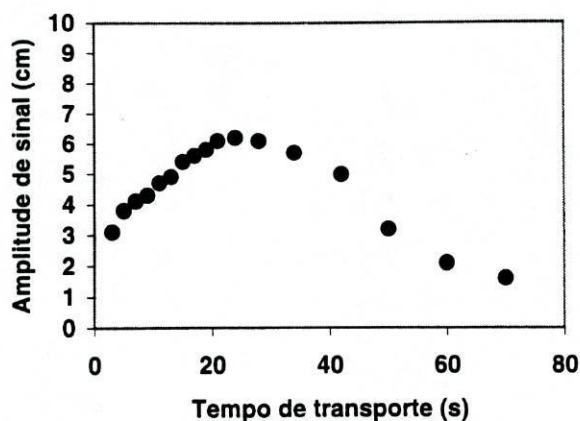


Fig 5.6 – Variação do sinal analítico correspondente à 2ª detecção, em função do tempo de transporte, para um tempo de detecção de 50 s.

Como é facilmente perceptível, o máximo de sinal analítico é obtido, para os três exemplos apresentados, quando a soma de  $t_t$  e  $t_d$  é de, aproximadamente, 75 s. Este valor corresponde a 3 vezes o intervalo de tempo necessário para a detecção máxima (25 s), o que corresponde ao número de transportes efectuados para a segunda detecção.

Uma capacidade evidenciada pelo sistema desenvolvido é a renovação contínua da interface de reacção amostra/reagente, por força da renovação da solução reagente, utilizada como solução transportadora. Durante as sucessivas fases do processo de recirculação, e em virtude do limitado volume interno dos reactores, parte da dispersa zona de reacção é removida, sendo substituída por uma nova interface a qual vai originar o desenvolvimento de uma nova zona de reacção. Esta renovação ocorre, simultaneamente, nas secções frontal e terminal da zona de amostra. De facto, por exemplo, durante a primeira fase de transporte, quando a zona de amostra é empurrada de  $L_1$  para  $L_3$ , a secção frontal da zona de amostra é rejeitada e, ao mesmo tempo, a última parte da solução transportadora entrada em  $L_1$  permanece intacta. Quando se inicia a segunda fase de transporte de  $L_3$  para  $L_1$ , a nova solução transportadora, entrada por  $V_3$ , renova a secção terminal da zona de reacção, e vai empurrar a zona de amostra de encontro à solução transportadora intacta no interior de  $L_1$ , criando uma nova interface frontal. Este processo repete-se continuamente em cada nova fase de transporte. Assim sendo, as sucessivas detecções obtidas durante o processo de recirculação poderão ser consideradas, não como a monitorização de uma mesma reacção a diferentes níveis de dispersão, mas sim como o resultado de uma inteiramente nova reacção. Por outro lado, e numa perspectiva diferente, a renovação permanente da solução reagente poderá ser considerada como um processo de adição contínua de reagente a uma mesma reacção, o que representa um interessante potencial analítico, podendo ser explorado, por exemplo, como estratégia de titulação em fluxo. Outra situação em que a adição contínua de

reagente poderá ser particularmente vantajosa diz respeito à sua utilização no caso de reagentes que apresentem baixas solubilidades, como é o caso do  $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ .

Uma vez que o controlo automático permitia que todo processo de recirculação fosse executado de uma forma reproduzível, o que garantia a reprodutibilidade da sequência de detecções, o sinal analítico fornecido por determinada detecção (primeira, segunda, etc...) podia ser interpolado numa curva de calibração, para a mesma detecção, obtida por inserção de um conjunto de distintas soluções padrão. Mais ainda, o mesmo conjunto de soluções padrão permitia que, teoricamente, numa única etapa de calibração, fossem obtidas tantas curvas de calibração quantas as detecções efectuadas, com a vantagem de a cada detecção corresponder um valor de dispersão e um nível de diluição distinto. Devido ao número específico de detecções exibido por cada solução padrão, cada detecção tinha um intervalo de concentrações determináveis específico (Tabela 5.1). As detecções iniciais, em que a amostra era pouco diluída, tinham um limite superior de concentração relativamente limitado, próximo dos  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , embora fossem as que apresentavam maior sensibilidade. Contrariamente, as últimas detecções apresentavam um grande valor de diluição, com um limite superior de concentração determinável bastante alargado, rondando os  $10000 \text{ mg L}^{-1}$ , embora o limite inferior fosse penalizado. Durante a execução da análise da amostra, os diferentes sinais analíticos originados pelas detecções consecutivas, podiam ser interpolados na curva de calibração correspondente à detecção respectiva, o que proporcionava a obtenção de distintos e comparáveis valores de concentração, a diferentes níveis de diluição, com apenas uma única inserção de amostra, o que podia ser usado como forma de comparação e avaliação da exactidão dos resultados obtidos.

O número de ciclos necessários para diluir uma solução padrão para um valor de concentração quase indetectável, dependia da concentração inicial da solução. Uma solução de cloreto  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , era analisada com apenas quatro recirculações (Fig 5.7),

enquanto que a análise de uma solução  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  requeria 8 recirculações (Fig 5.7), apresentando dois sinais analíticos iniciais com alturas comparáveis e os restantes sucessivamente decrescentes.

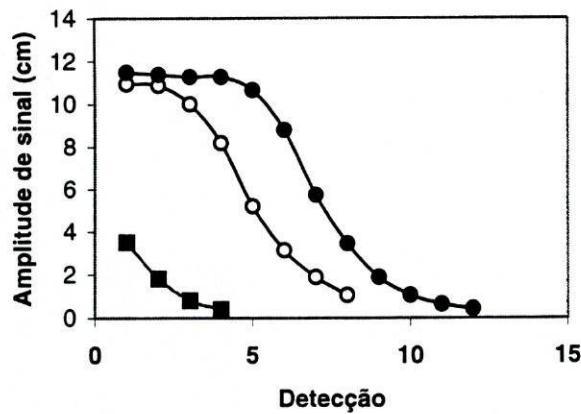


Fig 5.7 – Variação do sinal analítico em função da detecção, para distintas soluções padrão de cloreto: ● -  $10000 \text{ mg L}^{-1}$ ; ○ -  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ; ■ -  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

Uma solução  $10000 \text{ mg L}^{-1}$  necessitava, até uma concentração quase indetectável, de 12 recirculações, que exibiam em conjunto, um perfil sigmoidal (Fig 5.7): 5 sinais analíticos iniciais quase idênticos, correspondendo ao valor de absorvância mais elevado, seguidos de outros 7 sinais consecutivamente decrescentes.

Para cada detecção foram estabelecidas curvas de calibração apresentando uma relação linear entre absorvância e concentração (Fig 5.8) para valores compreendidos entre  $0\text{-}500 \text{ mg L}^{-1}$ , para a segunda detecção, e entre  $1500\text{-}10000 \text{ mg L}^{-1}$ , para a oitava detecção (Tabela 5.1).

Foram estabelecidas, por regressão linear, equações para cada curva de calibração, as quais, do tipo  $A = xC + b$  sendo  $A$  a amplitude de sinal, em cm, e  $C$  a concentração de cloretos expressa em  $\text{mg L}^{-1}$ , são apresentadas na Tabela 5.1, conjuntamente com os respectivos coeficientes de correlação, abcissa na origem ( $b$ ) e declive ( $x$ ).

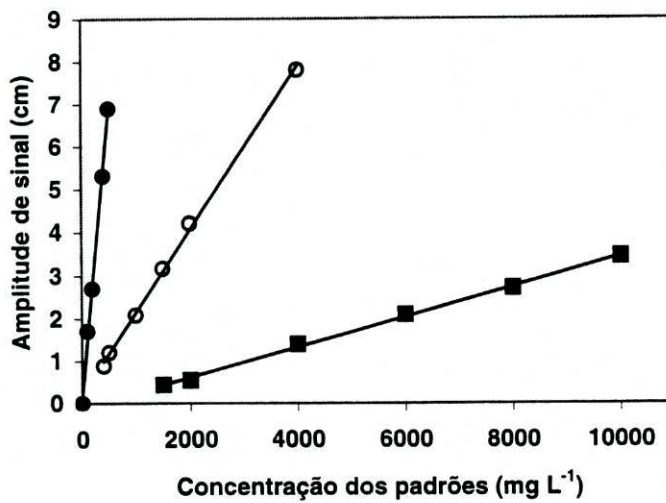


Fig 5.8 – Curvas de calibração obtidas com soluções padrão correspondentes a distintos intervalos de concentração e a diferentes detecções: ● - 2ª detecção; ○ - 5ª detecção; ■ - 8ª detecção.

### 5.3.2. Análise de preparações farmacêuticas

Com o objectivo de analisar as potencialidades e o desempenho da metodologia desenvolvida, foram efectuadas determinações de cloretos em soluções parenterais, as quais apresentavam distintas composições e distintas concentrações de cloreto.

A avaliação comparativa dos resultados obtidos com a metodologia desenvolvida (Tabela 5.2) face aos fornecidos pela metodologia de referência, apresentou desvios relativos, expressos em percentagem, entre -5,6 e 3,2%.

Tabela 5.1 – Curvas analíticas obtidas com a metodologia desenvolvida na determinação de cloreto, para distintas detecções.

Detecção	Intervalo de concentrações (mg L <sup>-1</sup> )	Declive	Abcissa na origem	Coefficiente de Regressão
2	0 - 500	0,0133	0,1163	0,996
3	0 - 500	0,0076	-0,0279	0,996
4	0 - 1000	0,0039	0,0680	0,992
5	400 - 4000	0,0019	0,2222	0,999
6	400 - 10000	0,0009	0,4948	0,996
7	1000 - 10000	0,0006	0,0888	0,995
8	1500 - 10000	0,0004	0,0904	0,998

O sistema analítico demonstrou um funcionamento estável, sem desvios na linha de base ao longo de tempo. Os valores de absorvância obtidos por inserção repetida

(n=5) de uma amostra, apresentaram um desvio padrão relativo (RSD) inferior, em valor absoluto, a 1,8%.

Tabela 5.2 – Resultados obtidos na determinação de cloreto em soluções parenterais.

Amostra	Concentração determinada (mg L <sup>-1</sup> )		RD* (%)
	Metodologia Desenvolvida	Metodologia de Referência	
Soro Fisiológico	5440±98	5460	-0,37
Soro 210	1847±33	1803	2,4
Ionosteril	3773±68	3860	-2,3
Ionosteril Lact	3834±69	3870	-0,67
Glucosteril 5%	886±16	939	-5,6
Neodextril 70	5691±102	5514	3,2

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

#### 5.4. Conclusões

Os resultados obtidos na determinação de cloreto em soluções parenterais confirmaram as potencialidades previstas para o sistema de fluxo multicomutado desenvolvido. A recirculação da zona de amostra através de um sistema de fluxo com uma configuração circular, o qual funcionava como um reactor de dimensões auto-ajustáveis em função do número de ciclos de recirculação e da evolução do sinal analítico, demonstrou ser uma estratégia efectiva para aumentar a dispersão e por conseguinte o nível de diluição da amostra. Este desempenho foi reforçado pela remoção selectiva de zonas da amostra, tanto na sua secção frontal como na terminal, o que permitiu aumentar a eficiência do processo de diluição, ao mesmo tempo que contribuiu para uma constante renovação das interfaces amostra/reagente anterior e posterior. Os resultados obtidos demonstraram que a metodologia proposta proporciona uma ampla variedade de valores de diluição, o que possibilita a compatibilização entre o grau de diluição a que uma amostra deverá ser sujeita e o intervalo de resposta linear do detector, ao mesmo tempo que se revela eficiente em situações que requerem valores elevados de diluição, sem que seja necessário qualquer reconfiguração do sistema, o que permite alargar o intervalo de concentrações determináveis. Todas estas possibilidades foram acompanhadas por um processo de multidetecção que permitiu uma monitorização contínua da zona de amostra.

O controlo do sistema de fluxo circular foi fácil e eficientemente executado através duma rotina de temporização de simples implementação e programação. No entanto, o sistema poderá eventualmente ser controlado através de mecanismos auxiliares adequados (por exemplo, mecanismos sensores a qualquer característica da zona de amostra) que possibilitem a avaliação da posição da amostra, transmitindo a informação à unidade central de controlo que decidirá a comutação das válvulas solenóides.

Por outro lado este sistema permitiu ultrapassar uma das limitações dos sistemas em circuito fechado, que era a colocação do sistema de propulsão (vulgarmente uma

bomba peristáltica) no interior do sistema de recirculação, o que tinha efeitos negativos ao nível do perfil da zona de amostra. Torna também possível operar em modo multi ou unideteção, além de evitar a acumulação de bolhas de ar no interior das tubagens, com efeitos extremamente negativos em termos de deteção, visto que estas poderão ser eliminadas aquando do processo de remoção das zonas dispersas.

A quantidade de informação disponibilizada pela multideteção confere ao sistema desenvolvido elevado potencial no sentido da adaptação de determinações cinéticas a sistemas de fluxo contínuo.

## 5.5.Referências

- [1] J.B. Henry, *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 17<sup>th</sup> ed., W.B. Saunders, Philadelphia, 1984.
- [2] A. D. Eaton, L.S. Clesceri, A. E. Greenberg, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19<sup>th</sup> ed., American Public Health Association, Washington, 1995.
- [3] Farmacopeia Portuguesa VI - Edição Oficial, INFARMED, Lisboa, 1997, pg. 596.
- [4] British Pharmacopoeia 1988, Vol. II, HMSO, London, 1988, pg. A124.
- [5] J. Ruzicka, J.W.B. Stewart, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 81 (1976) 387.
- [6] A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, M.T.M. Teixeira, *J. Flow Injection Anal.*, 9 (1992) 69.
- [7] J. Cirello-Egaminio, I.D. Brindle, *Analyst*, 120 (1995) 183.
- [8] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, I.B. Salgado, A.M.Roque-da-Silva, M.T.P.O. Teles, *Rev. Port. Farm.*, 38 (1988) 19.
- [9] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, E. Barrado, H. Vela, *IL Farmaco*, 52 (1997) 127.
- [10] J.W. Klancke, *J. Chromatogr.*, 637 (1991) 63.
- [11] W. Zhou, W. Liu, D. An, *J. Chromatogr.* 12 (1990) 48.
- [12] K.E. Avis, L. Lacham, H.A. Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*. Vol I, Marcel Dekker, New York, 1984.
- [13] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, New York, 1988.
- [14] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, F. Lázaro, A. Ríos, *Anal. Chim. Acta*, 216 (1989) 275.
- [15] A. Fernandez, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 193 (1987) 107.
- [16] J. Ruiz, A. Torres, A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel, *J. Autom. Chem.*, 8 (1986) 70.
- [17] A. Fernandez, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1146.

- [18] J. Ruzicka, J.W.B. Stewart, E.A. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 81 (1976) 387.
- [19] P.K. Dasgupta, H. Hwang, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 1009.
- [20] D. Betteridge, P.B. Oates, A.P. Wade, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1236.
- [21] A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1540.
- [22] E.B. Townsend IV, S.R. Crouch, *Trends Anal. Chem.*, 11 (1992) 90.
- [23] V.V.S. Eswara, H.A. Mottola, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 357.
- [24] C.M. Wolff, H.A. Mottola, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 94.
- [25] A. Iob, H.A. Mottola, *Anal. Chem.*, 52 (1980) 2332.
- [26] P. Roehrig, C.M. Wolff, J.P. Schwing, *Anal. Chim. Acta*, 153 (1983) 181.
- [27] A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel, H.A. Mottola, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 666.
- [28] A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 1803.
- [29] A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel, *Anal. Chim. Acta.*, 179 (1986) 463.
- [30] B.Fernandez-Band, P. Linares, M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel, *Analyst*, 116 (1991) 305.
- [31] J.M. Fernandez-Romero, M.D. Luque de Castro, *J. Autom. Chem.*, 12 (1990) 49.
- [32] A.M. Almuaided, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 214 (1988) 161.
- [33] R.H. Atallah, J. Ruzicka, G.D. Christian, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2909.
- [34] Y. Li, Y. Narusawa, *Anal. Chim. Acta*, 289 (1994) 355.
- [35] A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 3 (1985) 105
- [36] J.F. Tyson, S.R. Bysouth, E.A. Grzeszczyk, E. Debrah, *Anal. Chim. Acta*, 261 (1992) 75.
- [37] J.H. Dahl, D. Espersen, A.Jensen, *Anal. Chim. Acta*, 105 (1979) 327.
- [38] J.W.B. Stewart, J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta*, 82 (1976) 137.
- [39] E.A.G. Zagatto, H. Bergamin F<sup>o</sup>, S.M.B. Brienza, M.A.Z. Arruda, A.R.A. Nogueira, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, 261 (1992) 59.

- [40] S.M.B. Brienza, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, A.N. Araújo, *Anal. Chim. Acta*, 276 (1993) 121.
- [41] J.A.G. Neto, A.R.A. Nogueira, H. Bergamin F<sup>o</sup>, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, M.C.B.S.M. Montenegro, *Anal. Chim. Acta*, 285 (1994) 293.
- [42] I.M.P.L.V.O. Ferreira, J.L.F.C. Lima, L.S.M. Rocha, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 347 (1993) 314.
- [43] D.M. Zall, D. Fisher, M.Q. Garner, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1665.

# CAPÍTULO 6

---

## **DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE ISONIAZIDA COM APLICAÇÃO EM ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO**

A isoniazida é um agente tuberculostático efectivo contra estirpes de *Mycobacterium*. Neste capítulo é descrito o desenvolvimento de uma metodologia analítica baseada na implementação de um sistema de fluxo multicomutado, com detecção fluorimétrica, para determinação de isoniazida em produtos farmacêuticos. A metodologia desenvolvida, combinando a sensibilidade da detecção fluorimétrica com uma estratégia de diluição selectiva das amostras mais concentradas, por amostragem de zonas de amostra, permitiu a análise de uma ampla gama de concentrações sem necessidade de introduzir alterações na configuração da montagem de fluxo. O sistema analítico desenvolvido foi aplicado em ensaios automáticos de dissolução de comprimidos contendo isoniazida.

## 6.1. Introdução

### 6.1.1. Caracterização da isoniazida

A isoniazida, hidrazida do ácido nicotínico ou hidrazida do ácido 4-piridinacarboxílico (Fig 6.1), é uma substância cristalina branca ou incolor, solúvel em água e em etanol (14 g e 2 g em 100 mL a 25 °C, respectivamente), e pouco solúvel em clorofórmio e éter [1]:

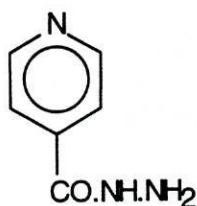


Fig 6.1 – Estrutura da isoniazida.

A isoniazida é uma substância relativamente estável em solução a pH<8, sendo no entanto bastante mais estável a pH=6 do que a pH=3. Por outro lado, a um pH próximo de 3 e em condições anaeróbias, é hidrolisada sendo convertida em ácido isonicotínico. A hidrólise alcalina em condições aeróbias origina principalmente ácido isonicotínico, isonicotinamida e hidrazida de 1,2-diisonicotinoil.

A isoniazida foi pela primeira vez sintetizada por Meyer e Mally [1] em 1912 por aquecimento de uma mistura de ácido nicotínico e hidrazida a 300 °C. A sua acção antibacteriana sobre estirpes de *Mycobacterium* foi pela primeira vez reconhecida por Chorine e Huant em 1945, sendo depois considerado um agente tuberculostático extremamente útil.

A isoniazida é rápida e quase completamente absorvida, obtendo-se um valor máximo de concentração no sangue uma a duas horas após a administração. A ligação da isoniazida às proteínas plasmáticas é limitada (< 10%), difundindo-se rapidamente através dos fluídos biológicos (incluindo o líquido cefalorraquidiano), tecidos e órgãos. O metabolismo é fundamentalmente baseado na acetilação [2], embora outras rotas metabólicas envolvam hidrólise, conjugação com a glicina, formação de hidrazona e N-metilação, resultando em metabolitos inactivos com excepção da monoacetilhidrazina, a qual apresenta elevada reactividade sendo responsável pelos efeitos hepatotóxicos observados em doentes sujeitos a uma terapia com isoniazida.

#### 6.1.1.1. Actividade

A isoniazida é uma agente bactericida altamente activo contra microorganismos do género *Mycobacterium*, especialmente *M. tuberculosis*, o qual inibe *in vitro* em concentrações entre 0,02 e 0,2 µg mL<sup>-1</sup> [3] e também contra *M. bovis* e *M. kansasii*. É um fármaco bastante específico e portanto ineficaz contra outros agentes patogénicos. O seu modo de acção é desconhecido embora se saiba que se liga firmemente aos bacilos em fase de crescimento (fase de divisão) com uma actividade rapidamente bactericida (embora com poder esterilizante inferior ao da rifampicina e da pirazinamida), mas sendo apenas considerado um bacteriostático quando aqueles microorganismos se encontram num estado de semi-latência. Quando usada isoladamente no tratamento da tuberculose verifica-se o rápido aparecimento de estirpes resistentes (que se supõe ser devido à perda do gene para produção de catalase [3]), fenómeno que é limitado ou mesmo evitado com uma terapia combinada com outros agentes antibacterianos.

### **6.1.1.2. Indicações terapêuticas**

A isoniazida é usada em conjunto com outros quimioterápicos, como a rifampicina e a pirazinamida, no tratamento da tuberculose pulmonar e extrapulmonar, e isoladamente, na profilaxia da tuberculose envolvendo grupos de alto risco. A dose usual para tratamento ou prevenção da tuberculose é de 5 mg Kg<sup>-1</sup> por dia, num máximo de 300 mg diários, durante 6 meses. A via de administração mais usada é a via oral, podendo também ser usadas as vias intramuscular e intravenosa.

### **6.1.2. Métodos de Análise**

A enorme popularidade e importância alcançada pela isoniazida como agente terapêutico no tratamento da tuberculose, teve como resultado que fosse objecto de numerosos estudos, que conduziram ao desenvolvimento de diversas metodologias analíticas para o seu doseamento, tanto em preparações farmacêuticas como em amostras biológicas. Entre estas metodologias há a destacar um número significativo de métodos colorimétricos, os quais tiram partido da estrutura química da isoniazida, nomeadamente da reactividade do grupo hidrazida. Assim, foram propostas várias metodologias colorimétricas baseadas na formação de hidrazonas coradas, por reacção da isoniazida com diferentes aldeídos, como sejam o p-dimetilaminobenzaldeído [4] e o benzaldeído [5]. Foram também propostos como reagentes cromogénicos a 1,2-naftoquinona-4-sufonato, que reage com o grupo hidrazida, em meio alcalino, formando um composto de cor laranja com uma máxima de absorvância a 480 nm [6], a 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona que forma com a isoniazida um composto azul, em meio alcalino [7], 6,7-dicloroquinolina-5,8-diona, que forma produtos de condensação verdes em meio etanólico alcalino [8], e também a 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona [9], o 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazol [10], a 9-cloroacridina [11]. Alguns trabalhos exploram a forte absorvância da

isoniazida na região dos ultravioleta para a sua determinação [12]. A absorvância entre 230 e 290 nm de misturas de isoniazida e rifampicina foi utilizada para determinação espectrofotométrica simultânea destes compostos [13].

A detecção espectrofotométrica foi também utilizada num sistema por injeção em fluxo, envolvendo uma paragem do fluxo, para determinação cinética espectrofotométrica de isoniazida por reacção com o 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno em meio micelar [14].

Embora a isoniazida não apresente originalmente fluorescência foram também propostas para a sua determinação metodologias fluorimétricas. Em 1971, Bartos [15] propôs a abertura do anel piridínico, do ácido nicotínico, com brometo de cianogénio, com formação de um derivado do aldeído glutacónico e condensação deste com o ácido p-aminobenzóico para formar uma base de Schiff fluorescente com um  $\lambda_{ex}=366$  nm e  $\lambda_{em}=480$  nm. Ioannou propôs alternativamente a reacção entre a isoniazida e o 2-hidroxi-1-naftaldeído, em meio ácido [16]. No que diz respeito à detecção fluorimétrica num sistema de fluxo, Calatayud *et al.* propuseram uma metodologia de fluxo com base na oxidação da isoniazida pelo peróxido de hidrogénio [17].

Uma metodologia automatizada de fluxo, baseada na quimiluminescência produzida durante a reacção entre a isoniazida e a N-bromosuccinimida, em meio alcalino, foi proposta por Calokerinos *et al.* [18]. O mesmo reagente foi usado por Sarwar *et al.* para a determinação volumétrica de isoniazida, usando o vermelho Bordeaux como indicador. Uma volumetria é também a metodologia de referência da Farmacopeia Portuguesa, sendo usado como titulante uma solução de bromato de potássio, e como indicador uma solução de vermelho de metilo. Uma ampla variedade de outros métodos volumétricos estão disponíveis na literatura, incluindo as titulações não-aquosas com ácido perclórico, com detecção visual [19] ou potenciométrica [20] do ponto de equivalência.

Foram também propostos métodos electroquímicos que recorrem sobretudo a métodos polarográficos [21, 22] e coulométricos [23].

Podem ainda encontrar-se descritas metodologias analíticas envolvendo técnicas gravimétricas, como a baseada na formação de um composto insolúvel entre a isoniazida e o ácido pícrico [24].

Os métodos cromatográficos são talvez os mais frequentemente usados na determinação de isoniazida em preparações farmacêuticas, e muito especialmente em amostras biológicas. Estes métodos recorrem a diferentes tipos de detectores, sendo no entanto a detecção na região da radiação ultravioleta a mais utilizada [25-27]. A detecção fluorimétrica, quer por derivatização usando como agente oxidante o peróxido de hidrogénio [28], quer por tratamento fotoquímico [29] tem sido também utilizada, assim como a cromatografia gasosa [30] e a cromatografia em camada fina [31].

### ***6.1.3. Diluição em linha em sistemas de fluxo contínuo***

A diluição da amostra, motivada por valores de concentração superiores aos que definem o intervalo em que a metodologia analítica é aplicável, é um dos tratamentos a que é necessário recorrer com mais frequência aquando da execução de um procedimento analítico. Não sendo um tipo de tratamento muito utilizado na análise de produtos farmacêuticos, visto que aquando da preparação das amostras para análise é possível salvaguardar este intervalo de concentrações através da preparação de soluções com uma concentração ajustada, é no entanto um procedimento necessário em situações em que o método instrumental é muito sensível, e em que a toma de quantidades pequenas de amostra poderá ser uma importante causa de erro. É também um tratamento quase inevitável quando se executa a monitorização de ensaios de dissolução, em que é necessário determinar uma ampla gama de concentrações, à medida que quantidade de fármaco dissolvido aumenta.

Foram propostas diversas configurações de fluxo com vista à diluição em linha da amostra, como as que recorrem à manipulação directa da dispersão [32], quer por redução

do volume de amostra inserido, quer por aumento do caudal transportador ou do comprimento do reactor. Alternativamente foi proposta a inserção de câmaras de mistura [33] ou então a divisão do fluxo, e por conseguinte da zona de amostra, em duas fracções, sendo que uma delas é encaminhada para detecção e a outra rejeitada [34]. Em oposição à divisão de fluxo, é também possível convergir a amostra com o fluxo transportador, o que irá promover a distribuição da zona de amostra por um volume superior [35], podendo ainda combinar-se as duas estratégias, confluência e divisão de fluxo, de que resulta um incremento da eficiência da diluição. Um sistema deste tipo, denominado diluição em cascata [36], recorre a sucessivas divisões e confluências de fluxo. Uma estratégia semelhante, denominada confluência de zonas, implica a convergência de dois fluxos: a amostra, por acção de um fluxo transportador, e um reagente, e permite obter paralelamente à diluição da amostra uma economia de reagente [37].

A introdução nas montagens de fluxo de unidades baseadas na utilização de uma membrana de diálise [38], a qual funciona como um limitador de transporte entre dois fluxos, o dador e o aceitador, permite não só a obtenção de elevados valores de diluição mas também a eliminação de eventuais interferentes [39].

Uma técnica de diluição versátil, e que permite obter níveis de diluição muito variados, sem necessidade de introdução de alterações na configuração da montagem de fluxo é a amostragem de zonas [40]. Esta técnica (Fig 6.2) consiste na introdução da amostra num fluxo transportador no qual é dispersa durante um intervalo de tempo definido. Ao fim deste intervalo de tempo, e dependendo do dispositivo de injeção utilizado, uma porção da zona de amostra inicial é retirada e introduzida num segundo fluxo transportador que a encaminha para detecção.

Assim, e de acordo com o intervalo de tempo utilizado (tempo de re-amostragem), é possível re-amostrar qualquer porção ou zona da amostra inicial, dependendo o grau de diluição obtido do volume e da zona de amostra re-amostrada. Baseada originalmente na utilização de um injector-comutador [40], esta metodologia foi depois implementada com

recurso a válvulas rotativas automatizadas [41], num sistema totalmente automatizado em que, através de uma linha de retorno, o sistema seleccionava o tempo de re-amostragem e, deste modo, o valor de diluição da amostra.

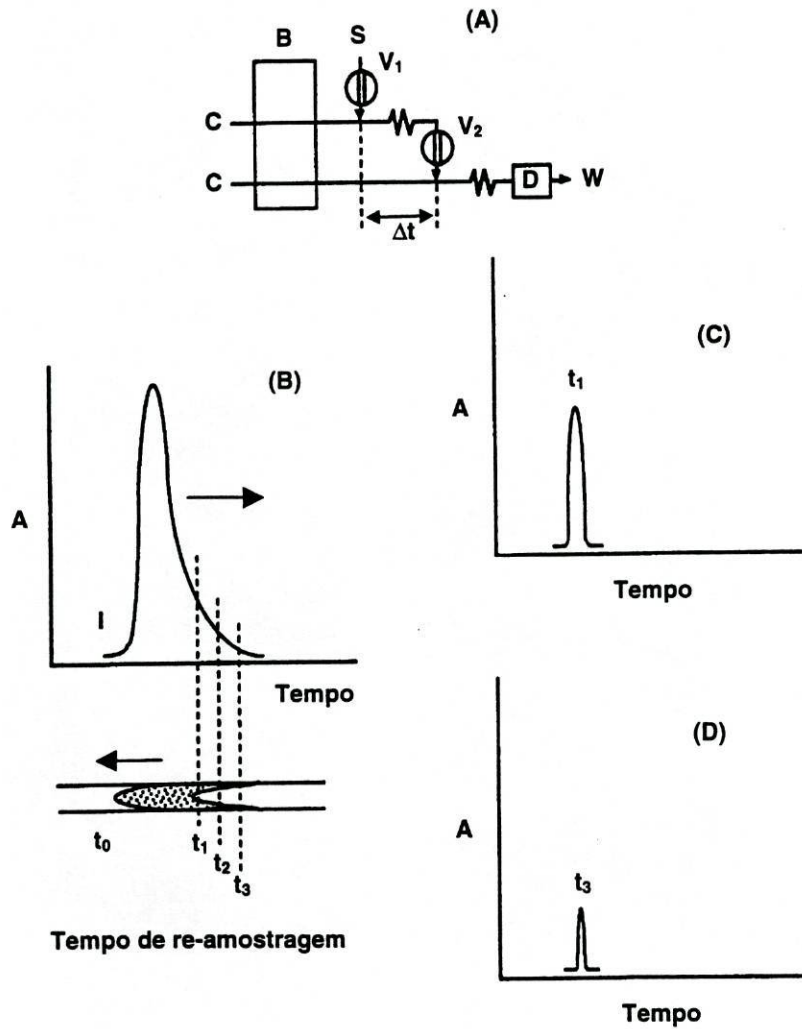


Fig 6.2 – Amostragem de zonas. (A) – montagem de fluxo: C – solução de transporte; S – amostra;  $V_1$  e  $V_2$  – válvulas rotativas; B – bomba; D – detector; W – dreno;  $\Delta t$  – tempo de re-amostragem. (B) – A utilização de tempos de re-amostragem distintos, resulta em valores de diluição, e por isso sinais analíticos, distintos (C) e (D).

Esta técnica foi igualmente implementada com válvulas solenóides, com base na multicomutação [42]. Um sistema de fluxo multicomutado similar, baseado na remoção de zonas de amostra, foi também recentemente proposto [43].

Uma outra estratégia de diluição em linha é a diluição electrónica [44]. Esta técnica é baseada na obtenção de um sinal analítico correspondente a determinada zona da amostra (normalmente pertencente á porção de amostra posterior ao sinal máximo), a um intervalo de tempo previamente definido.

#### **6.1.4. Ensaios de dissolução**

Os ensaios de dissolução de fármacos em formas orais sólidas, como comprimidos e cápsulas, tornou-se um procedimento de rotina no controlo da qualidade destes produtos farmacêuticos, sendo uma das tarefas que exige um maior dispêndio de tempo e de atenção ao nível dos laboratórios de controlo da indústria farmacêutica [45]. Este tipo de ensaios reveste-se de grande importância por diversos motivos [46]: no desenvolvimento de novos produtos, especialmente em termos de optimização da biodisponibilidade do fármaco; em ensaios de estabilidade, isto é, na detecção de alterações na libertação do fármaco após determinadas condições de armazenamento; em controlo de qualidade, na avaliação da similitude das características de diferentes lotes.

Durante a última década, com o interesse crescente dedicado às formas de libertação controlada, cujas características básicas, como início, velocidade e extensão da libertação do fármaco, estão associadas às propriedades físico-químicas da formulação e não às condições do meio, verificou-se uma procura por um processo ideal automático de dissolução, capaz de proporcionar um perfil global de dissolução durante um período longo, e que portanto apresentasse: uma elevada estabilidade, baixo consumo de reagentes, possibilidade de funcionamento em modo descontínuo e um intervalo alargado de concentrações determináveis [47].

Embora o conceito de dissolução surja naturalmente, uma vez que parece óbvio que as formas sólidas têm que se desintegrar e dissolver para o fármaco actuar, apenas no anos 60 foram propostos os primeiros testes quantitativos de dissolução, na altura baseados num agitador de pás [48], os quais seriam depois adoptados pela grande maioria das Farmacopeias.

O aumento da complexidade das formulações farmacêuticas e, correspondentemente, do número de parâmetros a determinar, motivou o desenvolvimento de novas metodologias, exibindo um grau cada vez mais elevado de automatização, com base, por exemplo, na utilização combinada de válvulas selectoras automáticas e dispositivos amostradores [49], na monitorização *in loco* com fibras ópticas sem amostragem [50, 51] ou no recurso a mini-robots [52]:

Este tipo de análise envolvendo um grande número de amostras, sobretudo se se considerar que os ensaios podem abranger 4 ou mais formas farmacêuticas em simultâneo com uma composição similar, é um campo atractivo onde a implementação de metodologias analíticas em fluxo contínuo apresenta elevadas potencialidades [45], as quais estão associadas com: i) o uso de técnicas de derivatização, permitindo aumentar a sensibilidade e a selectividade; ii) sistemas analíticos simples, de baixo custo e com reduzido consumo de reagente, onde é possível introduzir elevado grau de automatização; iii) monitorização em quase tempo real de sistemas em evolução contínua e rápida; iv) elevada estabilidade de funcionamento por longos períodos; vi) monitorização do fármaco mas também dos seus produtos de degradação, devido ao seu acoplamento em linha e às suas possibilidades de multideterminação; vii) grande flexibilidade operacional, tanto com sistemas de dissolução rápida como de dissolução lenta, o que poderá requer, por exemplo, uma etapa de pré-diluição ou pré-concentração ou um funcionamento em modo descontínuo; viii) grande diversidade de sistemas de detecção.

As primeiras aplicações de sistemas de fluxo contínuo na monitorização de ensaios de dissolução, foram efectuadas por Koupparis *et al.* com recurso à análise por

injecção em fluxo (FIA), em montagens automatizadas controladas por computador [53-55]. Estes sistemas eram baseados na recirculação contínua do meio de dissolução através do alça de amostragem de uma válvula de injecção rotatória, que, periodicamente, procedia à introdução da amostra no sistema de fluxo, sendo o sinal analítico obtido, por derivatização, comparado com os fornecidos por uma etapa prévia de calibração. Outras sistemas de fluxo foram posteriormente propostos, incluindo sistemas FIA para extracção líquido-líquido [56] e, mais recentemente, sistemas de análise por injecção sequencial (SIA) [57].

Os sistemas de fluxo multicomutado apresentam características ideais para aplicação neste tipo de ensaios, sobretudo nos que envolvem vários vasos de dissolução em simultâneo, uma vez que é possível individualizar, com uma montagem de configuração simples, a amostragem de cada um dos vasos.

#### **6.1.5. Objectivo**

Como técnica analítica a espectrofluorimetria apresenta algumas vantagens relativamente a outras metodologias de uso frequente, como a espectrofotometria, em que sobressaem uma superior selectividade e uma sensibilidade acrescida. Nesse sentido, a implementação de uma metodologia analítica baseada num sistema de fluxo multicomutado para determinação de isoniazida, combinando uma elevada sensibilidade com uma procedimento eficiente de diluição em linha, apresenta elevadas potencialidades uma vez que permite a análise de amostras num intervalo alargado de concentrações, possibilitando também a sua aplicação em ensaios de dissolução de comprimidos.

## 6.2. Parte Experimental

### 6.2.1. Reagentes e soluções

Na preparação da solução padrão de isoniazida, com uma concentração de  $10^{-3}$  M, foi utilizado o sólido obtida na Fluka, ref. 58980. Esta solução era preparada diariamente por pesagem rigorosa de 137,1 mg de isoniazida seguida da sua dissolução e diluição até  $1000\text{ cm}^3$  com água desionizada. Esta solução era mantida no frigorífico e era utilizada na preparação, por diluição com água desionizada, das soluções padrão empregues na elaboração das curvas de calibração.

A solução reagente de cério (IV), com uma concentração de  $2 \times 10^{-5}$  M, era preparada diariamente por dissolução de 8,08 mg de sulfato de cério (IV) em 600 mL de água desionizada. A esta solução eram adicionados 10 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, 200 mg de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  e 2 mL de  $\text{AgNO}_3$  0,1 M. Seguidamente esta solução era levada à ebulição durante 10 minutos, arrefecida e diluída até  $1000\text{ cm}^3$  com água desionizada. Este tratamento [58] tinha como objectivo reduzir a valores mínimos a concentração de catião cério (III). A presença deste catião em solução, quando em valores apreciáveis, conferia à solução reagente de cério (IV), usada como transportador da zona de amostra, um valor de fluorescência elevado. Desta forma, e sendo esta solução usada no estabelecimento da linha de base, o intervalo operacional do fluorímetro era reduzido e por isso a gama de concentrações detectáveis era restringida. A eliminação do catião cério (III) era obtida por oxidação a cério (IV), em meio ácido com peroxidissulfato, reacção esta catalisada pelo catião prata (I). O excesso de peroxidissulfato, cuja presença iria afectar os resultados, visto que oxidaria o cério (III) formado durante a oxidação da isoniazida, era eliminado por aquecimento à ebulição da solução durante 10 minutos.

### **6.2.2. Equipamento**

Como detector fluorimétrico incorporado nas montagens de fluxo, foi utilizado um espectrofluorímetro da marca Perkin-Elmer, modelo LS-30, equipado com uma célula de fluxo com um volume interno de 7  $\mu$ L.

A montagem de fluxo multicomutado era constituída por uma válvula pneumática de quatro vias VICI Cheminert, modelo NAV0054, produzida pela Valco Instrumental Co. Inc., e duas válvulas solenóides NResearch, modelo 161 T03, com duas entradas e um saída, já anteriormente descritas (Capítulo 2).

O transporte das soluções era efectuado por intermédio de tubagens e reactores em Teflon, com um diâmetro interno de 0,8 mm.

As soluções eram propulsionadas por aspiração, por intermédio da actuação de uma bomba de pistão Crison, modelo Micro BU 2031, equipada com uma seringa de 5 mL.

Os ensaios de dissolução foram efectuados com recurso a equipamento específico, da marca Erweka, modelo DT, equipado com pás rotativas. As soluções eram filtradas em linha, através de uma unidade de filtração constituída por um suporte em aço inoxidável, com um diâmetro de 1,3 cm, Schleicher & Schuell, modelo FM 013/0, no qual era colocado um filtro de papel Whatman nº 1, com um diâmetro de 1 cm.

As titulações de isoniazida com anião bromato, utilizadas como metodologia de referência, foram executadas com uma bureta Crison Micro BU 2031 e a um agitador Crison Micro ST 2039, já referidos anteriormente (Capítulo 2).

### **6.2.3. Montagem de fluxo multicomutado**

A montagem de fluxo (Fig 6.3) foi desenhada de modo a cumprir dois propósitos fundamentais: uma configuração simplificada e de fácil controlo, e um eficiente e versátil desempenho analítico possibilitando a análise de uma extensa gama de concentrações,

incluindo a sua aplicação a amostras muito concentradas decorrentes da execução de ensaios de dissolução.

Assim sendo foram incorporadas apenas três válvulas: uma válvula pneumática e duas válvulas solenóides. A válvula pneumática ( $V_1$ ), apresentando uma alta eficácia em termos de reprodutibilidade e frequência de permuta de posição, foi utilizada para inserção das duas soluções (solução de amostra  $A$  e solução reagente  $R$ ). A solução reagente foi utilizada como solução transportadora.

As duas válvulas solenóides, de três vias (duas entradas e uma saída) ( $V_2$  e  $V_3$ ), eram usadas para controlar a direcção do fluxo transportador durante as fases de detecção e substituição de amostra, assim como para executar o procedimento de amostragem de zonas, utilizado como estratégia de diluição durante a execução dos ensaios de dissolução.

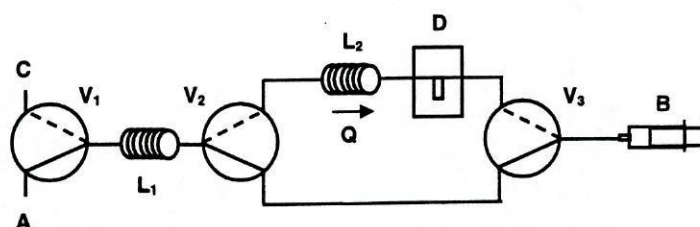


Fig 6.3 – Diagrama da montagem de fluxo multicomutado para determinação fluorimétrica de isoniazida:  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  - válvulas solenóides de três vias (duas entradas/uma saída): a linha contínua no esquema da válvula corresponde à posição 2 e a linha tracejada à posição 1;  $A$  - amostra;  $C$  - solução de cério (IV);  $L_1$  e  $L_2$  - reatores enrolados, 0,5 m de comprimento;  $D$  - detector;  $B$  - bomba de pistão;  $Q$  - caudal,  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

Em termos de modelo de funcionamento do sistema, inicialmente  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  eram colocadas na posição 1 e a solução reagente de cério(IV), usada como solução transportadora (R), era introduzida na montagem fluindo através do detector, o que permitia estabelecer a linha de base. A análise da amostra iniciava-se com a introdução desta na montagem, através de  $V_1$ , a qual era colocada na posição 2 correspondendo à posição da amostra (A), durante um tempo de amostragem ( $t_a$ ) previamente definido de acordo com o procedimento de calibração, o qual permitia estabelecer, em função do caudal, o volume de amostragem. No final de  $t_a$ , a válvula  $V_1$  era comutada novamente para a posição 1, e a solução transportadora conduzia a zona de amostra, que seria dispersa em  $L_1$  e  $L_2$ , para detecção.

Após a obtenção do sinal analítico,  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  eram colocadas na posição 2, para substituição da amostra, seguido da colocação de  $V_1$  na posição 1, para lavagem, voltando finalmente  $V_2$  e  $V_3$  para a posição 1, para restabelecimento da linha de base e nova análise.

O caudal da solução transportadora foi mantido a um valor de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

A obtenção da curva analítica envolveu a inserção e análise de um conjunto de padrões, com concentrações definidas, tendo sido utilizados os mesmos parâmetros analíticos utilizados para a amostra.

Durante a execução dos ensaios de dissolução de comprimidos de isoniazida, verificou-se que era impossível determinar directamente a concentração de isoniazida no vaso de dissolução, em virtude de esta apresentar valores elevados, muito superiores aos correspondentes ao intervalo de concentrações determináveis. Esta facto motivou a implementação de um procedimento de diluição, baseado na amostragem de zonas [42], o que implicou que a amostragem fosse feita de forma diferente. Assim (Fig 6.4), durante a fase de inserção da amostra, através de um filtro colocado em linha antecedendo  $V_1$ , as três válvulas  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  eram colocadas na posição 2, e a amostra era aspirada pelo canal lateral ( $L_3$ ), o que permitia a lavagem do filtro e a substituição da amostra precedente.

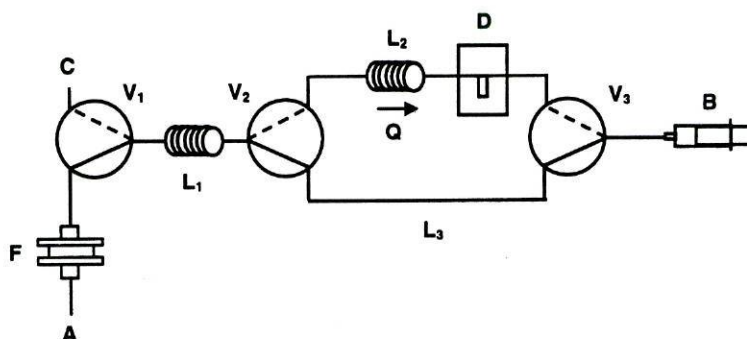


Fig 6.4 – Diagrama da montagem de fluxo multicomutado para realização de ensaios de dissolução de isoniazida:  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  - válvulas solenóides de três vias (duas entradas/uma saída): a linha contínua no esquema da válvula corresponde à posição 2 e a linha tracejada à posição 1; A - amostra; C - solução de cério (IV);  $L_1$ ,  $L_2$  - reactores enrolados, 0,5 m de comprimento,  $L_3$  - canal de lavagem, 0,05 m de comprimento; D - detector; B - bomba de pistão; Q - caudal,  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . F - filtro.

$V_1$  permanecia nesta posição durante o tempo de amostragem definido, ao fim do qual regressava à posição 1. Nesta altura a solução reagente de cério(IV) iniciava o transporte da zona de amostra, através do canal de lavagem ( $L_3$ ), para dreno, sendo este transporte efectuado durante um intervalo de tempo definido como tempo de re-amostragem. No final do tempo de re-amostragem  $V_2$  e  $V_3$  eram colocadas novamente na posição 1, e a porção mais terminal da zona de amostra (menos concentrada) ainda no interior de  $L_1$  era conduzida em direcção ao detector, permitindo a obtenção de elevados valores de diluição.

As etapas de lavagem e substituição de amostra ocorriam de acordo com o procedimento anteriormente referido.

#### **6.2.4.Método de referência**

As preparações farmacêuticas de isoniazida, analisadas pela metodologia desenvolvida, foram as disponíveis no mercado português: Hidrazida Zimaia, comprimidos doseados a 50 mg de isoniazida; Isoniazida 300, preparação farmacêutica de utilização hospitalar, doseada a 300 mg de isoniazida por comprimido. A preparação das soluções das formulações farmacêuticas a ensaiar, envolveu a pesagem e pulverização de 20 comprimidos, de cada uma das formulações, seguida da dissolução e diluição das quantidades apropriadas de pó, após pesagem rigorosa, com água desionizada. As soluções de amostra foram filtradas antes de serem analisadas.

A determinação de isoniazida na matéria-prima e em comprimidos, foi efectuada de acordo com a Farmacopeia Portuguesa [62] por titulação com bromato de potássio, sendo usado como indicador o vermelho de metilo.

Os ensaios de dissolução de comprimidos foram também efectuados de acordo com a Farmacopeia Portuguesa [63], com substituição da aparelho com cesto de rede, descrito na monografia dos comprimidos de isoniazida, por um aparelho com pá agitadora, igualmente descrito na Farmacopeia Portuguesa [64].

#### **6.3.Resultados e sua discussão**

O catião cério(IV) tem sido usado como agente oxidante na determinação de diversos compostos farmacêuticos [59, 60]. Este catião é facilmente reduzido a cério(III) o qual exhibe, em meio sulfúrico, uma fluorescência intensa e característica [61], fornecendo assim um método expedito para a determinação indirecta de diversas espécies farmacêuticas, com propriedades redutoras, que não podem ser determinadas directamente por fluorimetria. Consegue-se assim rentabilizar as elevadas sensibilidade e

selectividade associadas à fluorimetria, com evidentes vantagens em termos de desempenho analítico.

A isoniazida é um fármaco que não apresenta fluorescência nativa, mas que, ao ser usada como agente redutor, promove a redução do catião cério(IV), em meio ácido, com formação de cério(III), cuja elevada fluorescência ( $\lambda_{ex}= 255 \text{ nm}$  e  $\lambda_{em}= 355 \text{ nm}$ ) pode ser utilizada como um método fluorimétrico de elevada sensibilidade para determinação de isoniazida.

### **6.3.1.Otimização da montagem de fluxo**

A implementação de uma metodologia de fluxo multicomutado, com base na reacção de redução anteriormente referida, era simples e envolvia apenas a utilização de duas soluções, a solução de amostra e a solução reagente de cério(IV), utilizada como solução transportadora. No entanto, esta última solução levantava alguns problemas: uma vez que existia sempre uma pequena presença de Ce(III) fluorescente nas soluções de Ce(IV), era necessária proceder à sua eliminação de modo a reduzir a intensidade de fluorescência. Tal como foi referido anteriormente, valores elevados de fluorescência para esta solução, usada para estabelecer a linha de base, limitavam a detecção e restringiam o intervalo de concentrações determináveis, em virtude de reduzirem a amplitude da escala utilizável do espectrofluorímetro. A eliminação do Ce(III) foi conseguida por oxidação deste catião a Ce(IV) por tratamento com peroxidissulfato [58], sendo o excesso deste anião eliminado por ebulição da solução. No entanto, e apesar do tratamento efectuado, existia sempre uma quantidade mínima de Ce(III) em solução, que, embora a valores muito baixos, obrigava à preparação diária da solução reagente de cério(IV).

Uma variável com significativa influência na estabilidade da solução reagente de cério (IV), e na sua eventual redução a cério (III), era a concentração de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . De facto, à medida que aumentava a concentração de ácido aumentava a estabilidade da solução,

obtendo-se uma linha de base praticamente inalterável. Este aumento de estabilidade era no entanto acompanhado de uma diminuição do sinal analítico (Fig 6.5), em virtude do aumento da concentração do ácido resultar numa diminuição da cinética da reacção. Uma concentração de  $H_2SO_4$  de 2,7 M, que conferia à solução reagente uma grande estabilidade, afectava de tal modo a cinética da reacção que não permitia a obtenção de uma sinal analítico mensurável em modo contínuo, mas apenas quando o fluxo era parado durante um certo tempo, antecedendo a detecção, de modo a aumentar o tempo de reacção. Esta paragem de fluxo afectava no entanto negativamente o ritmo de amostragem.

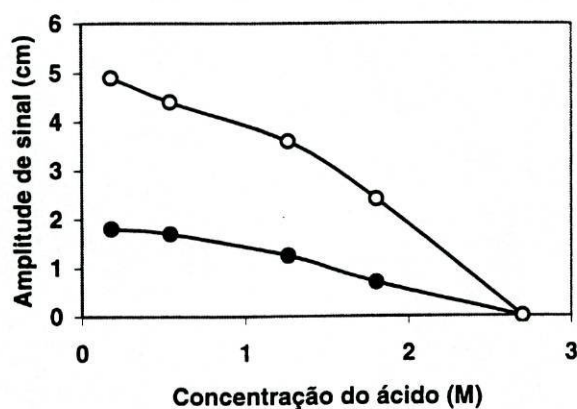


Fig 6.5 – Variação do sinal analítico em função da concentração de ácido, para dois tempos de amostragem: ● - 2 s; ○ - 6 s.

Com o objectivo de estabelecer um compromisso entre a estabilidade da solução reagente (um aspecto muito importante durante a execução dos ensaios de dissolução) e a magnitude do sinal analítico, foi considerada como adequada para a realização dos

ensaios posteriores uma concentração de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 0,54 M. Este valor de concentração permitia realizar os ensaios em modo contínuo, não sendo portanto necessário recorrer a uma paragem de fluxo.

A avaliação do tempo de amostragem ( $t_a$ ), que permitia estabelecer (para um dado caudal) o volume de amostragem, foi efectuada tendo em consideração duas premissas: limite de detecção e intervalo de concentrações determináveis. Se o ênfase for colocado no limite de detecção, então é necessário recorrer à utilização de superiores  $t_a$  de modo a reduzir a extensão da dispersão da zona de amostra e assim incrementar a sensibilidade da determinação. Pelo contrário, se se pretende privilegiar um intervalo alargado de concentrações, passível de ser determinado a um dado  $t_a$ , então a escolha deverá recair sobre intervalos de tempo mais curtos. De facto, à medida que aumenta o  $t_a$ , e em consonância o volume de amostragem, o correspondente aumento registado na magnitude do sinal analítico pode originar a redução do limite superior da zona de resposta linear da metodologia, podendo mesmo provocar a saturação do detector, impedindo a medida.

Nas experiências efectuadas observou-se que um  $t_a$  de 0,5 s, correspondente a um volume de amostra de 8,3  $\mu\text{L}$  para um caudal de 1  $\text{mL min}^{-1}$ , possibilitava a detecção, de uma forma reprodutível, de soluções padrão de isoniazida com concentrações compreendidas entre  $2,5 \times 10^{-6}$  e  $1 \times 10^{-5}$  M (Fig 6.6). Com esta última solução padrão, a utilização de  $t_a$  inferiores a 0,5 s proporcionava a obtenção de sinais analíticos que, sendo comparativamente superiores aos obtidos com um  $t_a$  de 2 s e um padrão de  $5 \times 10^{-7}$  M, apresentavam no entanto uma muito inferior reprodutibilidade. Um  $t_a$  de 1 s (16,6  $\mu\text{L}$ ) possibilitava estender o limite inferior de concentrações determináveis até aos  $5 \times 10^{-7}$  M, enquanto que valores de  $t_a$  compreendidos entre 2 e 4 s (33,3 e 67  $\mu\text{L}$ ) permitiam a análise de soluções padrão num intervalo alargado de concentrações entre  $2,5 \times 10^{-7}$  e  $1 \times 10^{-5}$  M, sendo de 4 s o valor máximo de  $t_a$  que permitia a análise da solução de  $1 \times 10^{-5}$  M sem que ocorresse saturação do detector (Fig 6.7).

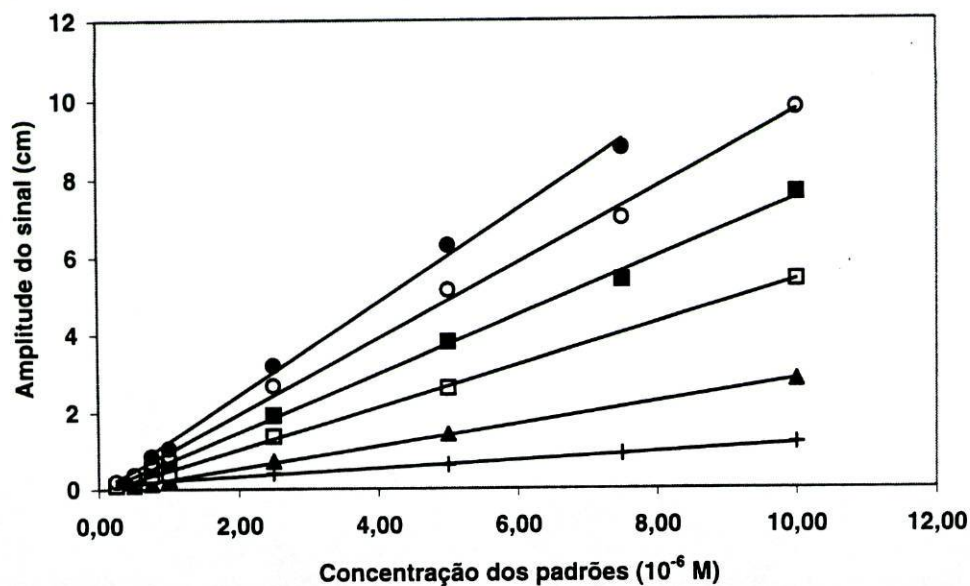


Fig 6.6 - Curvas de calibração obtidas com distintos tempos de amostragem: ● - 5 s; ○ - 4 s; ■ - 3 s; □ - 2 s; ▲ - 1 s; + - 0,5 s.

Em função destes resultados, foram estes os valores de tempo de amostragem seleccionados para as experiências posteriores. Valores de  $t_a$  mais elevados, como por exemplo 8 s (134  $\mu$ L) permitiam efectuar determinações num intervalo de concentrações entre  $2,5 \times 10^{-7}$  e  $2,5 \times 10^{-6}$  M. Para o padrão mais diluído ( $2,5 \times 10^{-7}$  M), e com os parâmetros analíticos definidos, o valor máximo de  $t_a$  utilizável seria de 10 s (166 mL). Valores mais elevados provocavam o aparecimento de um segundo pico, devido à criação de duas interfaces de reacção, que correspondiam às zonas frontal e terminal da amostra. Estas duas zonas estavam separadas por uma região central, onde não ocorria reacção, como consequência do elevado volume de amostra inserido e da sua limitada dispersão na solução reagente de transporte.

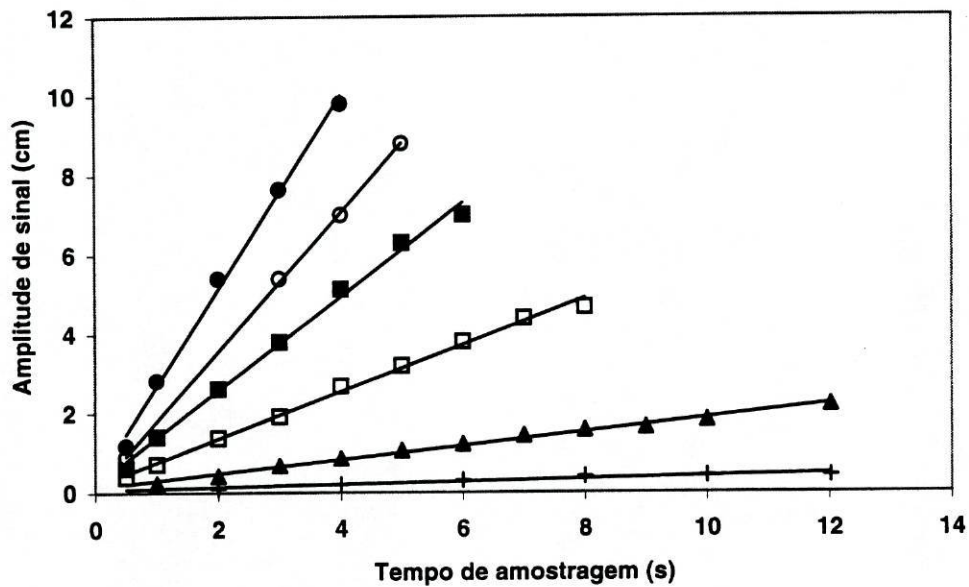


Fig 6.7 – Variação do sinal analítico em função do tempo de amostragem, para várias soluções padrão de isoniazida: ● -  $10,0 \times 10^{-6}$  M; ○ -  $7,5 \times 10^{-6}$  M; ■ -  $5,0 \times 10^{-6}$  M ; □ -  $2,5 \times 10^{-6}$  M; ▲ -  $1,0 \times 10^{-6}$  M; + -  $0,25 \times 10^{-6}$  M.

A avaliação da influência do caudal na intensidade de fluorescência foi efectuada através de ensaios em que foi estabelecido um compromisso entre o tempo de amostragem e o caudal, de modo a que, independentemente do valor deste último, o volume de amostragem se mantivesse constante. Assim, se o caudal era incrementado, decrescia o tempo de amostragem e vice-versa, garantido que qualquer variação do sinal analítico seria devida unicamente a alterações da dispersão e mistura amostra/reagente, ou do tempo de reacção.

Observou-se que a intensidade de sinal analítico aumentava ligeiramente de um caudal de  $0,5$  para  $1 \text{ mL min}^{-1}$  (presumivelmente porque a menor dispersão, conseguida com o caudal mais elevado, seria suficiente para compensar o menor tempo de reacção),

diminuindo depois com crescentes caudais, embora de forma ligeira e com tendência para a estabilização, o que poderia ser explicado por uma deficiente mistura amostra/reagente ou pelo menor tempo de reacção. Um caudal de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  foi seleccionado para a execução das determinações.

O estudo de diversos reactores com comprimentos distintos demonstrou que o sinal analítico diminuía com o aumento do comprimento (Fig 6.8), confirmando que o aumento progressivo registado no tempo de reacção, não era suficiente para contrabalançar a maior dispersão sofrida pela amostra nos reactores com maior comprimento.

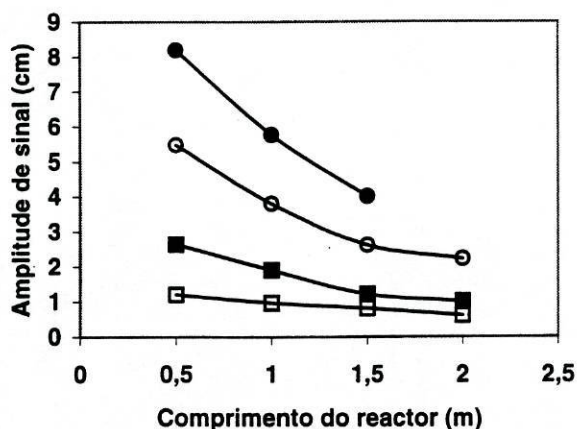


Fig 6.8 – Variação do sinal analítico em função do comprimento do reactor, para diferentes tempos de amostragem: ● -  $10,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ; ○ -  $7,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ; ■ -  $5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ; □ -  $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

A influência da concentração de cério(IV) na intensidade de fluorescência foi estudada num intervalo de concentrações compreendidas entre  $1 \times 10^{-5}$  e  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ , de forma a garantir sempre um excesso deste catião.

Para volumes de amostra até 67  $\mu\text{L}$ , correspondendo a tempos de amostragem de 4 s para um caudal de 1  $\text{mL min}^{-1}$ , não foram obtidas diferenças significativas, porque sendo a solução reagente de Ce(IV) a solução transportadora, existia sempre um excesso do catião. No entanto, para volumes de amostra mais elevados (obtidos com tempos de amostragem superiores a 5 s) a solução de  $1 \times 10^{-4}$  M produzia sinais analíticos ligeiramente mais elevados, talvez porque aumentasse a extensão da reacção, ou porque a superior concentração do catião permitisse estender a reacção até às regiões mais centrais da zona de amostra. Visto que os tempos de amostragem a utilizar na análise seriam inferiores a 4 s, considerou-se que uma solução de cério(IV)  $2 \times 10^{-5}$  M seria suficiente para garantir uma concentração adequada do catião.

Após dimensionamento e optimização do sistema de fluxo multicomutado foram obtidas curvas de calibração com recurso a tempos de amostragem de 1, 2 e 4 s, apresentando uma relação linear entre amplitude de sinal e concentração para valores até  $1,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com um limite de detecção de  $34,3 \text{ ng mL}^{-1}$  (Fig 6.9).

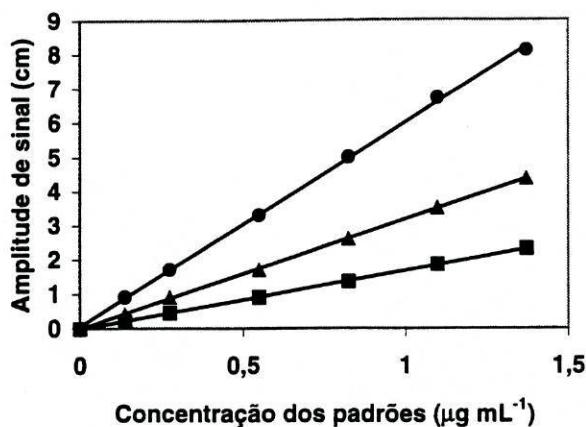


Fig 6.9 – Curvas de calibração obtida com soluções padrão de isoniazida com concentrações até  $1,37 \mu\text{g mL}^{-1}$  e tempos de amostragem de: ● - 4 s; ▲ - 2 s; ■ - 1 s.

As equações estabelecidas por regressão linear das curvas de calibração foram:

$$- t_a = 1 \text{ s: } A = 1,6879 C - 0,018; R = 0,9998$$

$$- t_a = 2 \text{ s: } A = 3,1794 C - 0,0081; R = 0,9997$$

$$- t_a = 4 \text{ s: } A = 5,9479 C + 0,059; R = 0,9994$$

sendo  $A$  a amplitude de sinal, expressa em centímetros, e  $C$  a concentração de isoniazida, expressa em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .  $R$  é o coeficiente de correlação.

A Figura 6.10 apresenta o registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração com um  $t_a$  de 4 s.

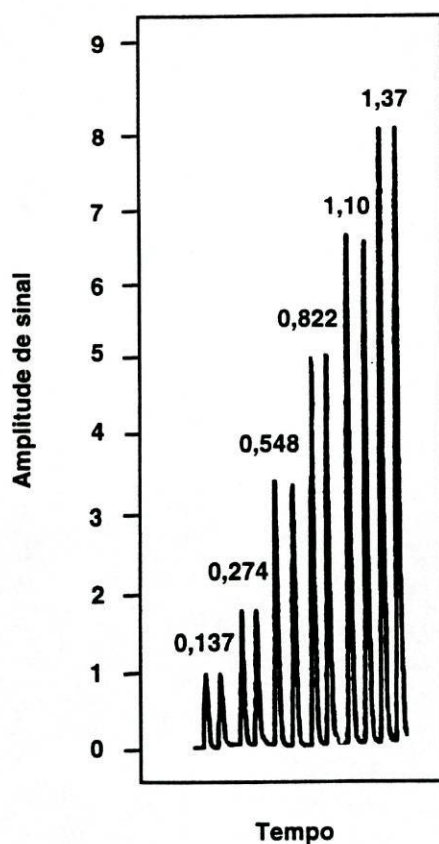


Fig 6.10 – Registo gráfico de uma curva de calibração de isoniazida referida na Figura 6.9, obtida com um tempo de amostragem de 4 s e soluções padrão com concentrações até  $1,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **6.3.2. Estudo de interferências**

Uma vez que a metodologia desenvolvida seria empregue na determinação de isoniazida em preparações farmacêuticas, e visto que estas apresentam na sua composição um conjunto extremamente alargado de compostos, os quais são usados como excipientes para os mais diversos objectivos, assumia grande importância o estudo do efeito interferente destes compostos. Além dos excipientes, foi também estudado o efeito interferente de outros fármacos que são utilizados numa terapia de combinação com a isoniazida, como sejam a pirazinamida e a rifampicina, e que como tal, surgem em algumas preparações farmacêuticas deste fármaco.

Este estudo foi efectuado por preparação de amostras contendo uma concentração fixa de isoniazida de  $5 \times 10^{-6}$  M, as quais foram dopadas com concentrações crescentes da espécie interferente, a razões molares, em relação à isoniazida, de 1, 5, 10, 50 e 100 vezes. Estas amostras sintéticas foram depois analisadas pela metodologia desenvolvida. Uma espécie foi considerada como não-interferente, se a variação do sinal analítico, por comparação com o sinal obtido na ausência do interferente, fosse, em valor absoluto, inferior a 3%.

Os resultados obtidos e apresentados na Tabela 6.1 demonstram que nas condições de ensaio utilizadas, a maior parte dos excipientes estudados não apresenta efeito interferente. No entanto, com a rifampicina, ao contrário do que aconteceu com a pirazinamida, registou-se um pronunciado efeito interferente mesmo para quantidades mínimas deste composto, o que impossibilita a utilização da metodologia proposta para a análise de produtos farmacêuticos contendo ambos os fármacos.

Tabela 6.1 – Efeito interferente de alguns compostos, normalmente utilizados como excipientes, na metodologia desenvolvida.

Interferência	Razão molar tolerada
Sacarose	100 <sup>§</sup>
Benzoato de sódio	100 <sup>§</sup>
Lactose	100 <sup>§</sup>
Galactose	100 <sup>§</sup>
Glucose	100 <sup>§</sup>
Ácido cítrico	5
Isopropanol	10
Pirazinamida	10

<sup>§</sup> Valor mais elevado testado.

### 6.3.3. Análise de preparações farmacêuticas

As potencialidades e o desempenho da metodologia proposta foram avaliados na análise de preparações farmacêuticas disponíveis no mercado contendo isoniazida. Estas preparações foram Hidrazida Zimaia (comprimidos doseados a 50 mg de isoniazida) e Isoniazida 300 (comprimidos doseados a 300 mg de isoniazida). A qualidade dos resultados obtidos foi analisada comparativamente com os fornecidos pela metodologia de referência.

Para cada uma das preparações ensaiadas foram preparadas soluções de amostra apresentando distintos valores de concentração de isoniazida, as quais foram depois analisadas por inserção em duplicado no sistema de fluxo multicomutado a um tempo de amostragem de 4 s. Comparativamente foram também efectuados ensaios com tempos de amostragem de 1 e 2 s.

Os resultados obtidos, tanto para a metodologia desenvolvida como para a de referência são apresentados na Tabela 6.2 e apresentam desvios relativos da metodologia

desenvolvida em relação à metodologia de referência, expressos em percentagem, entre -0,43 e 2,0%.

O sistema analítico revelou-se estável sem desvios na linha de base ou longo de tempo. Os valores de altura de pico obtidos por inserção repetida (n=12) de uma amostra, a um tempo de amostragem de 4 s, apresentaram um desvio padrão relativo (RSD) inferior, em valor absoluto, a 1,6%.

O ritmo de amostragem, para um tempo de amostragem de 4 s, foi cerca de 50 amostra por hora.

Tabela 6.2 – Resultados obtidos na determinação de isoniazida em produtos farmacêuticos.

Amostra	Concentração Declarada (mg/comp.)	Tempo de Amostragem (s)	Concentração Determinada (mg/comprimido)		RD (%)*
			Metodologia Desenvolvida	Metodologia de Referência	
Isoniazida	50	4	50,3	50,1	0,40
Zimaia		2	50,4	50,1	0,59
		1	51,1	50,1	2,0
Isoniazida	300	4	300,4	301,7	-0,43
300		2	305,6	301,7	1,3
		1	302,9	301,7	0,40

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

#### **6.3.4. Ensaios de dissolução de comprimidos contendo isoniazida**

A metodologia desenvolvida foi aplicada na determinação de isoniazida em ensaios de dissolução de comprimidos contendo este fármaco. Como forma de demonstrar a versatilidade da multicomutação e as suas potencialidades no manuseamento e processamento de amostras com objectivos analíticos, a implementação destes ensaios decorreu sem que fossem introduzidas alterações na configuração da montagem de fluxo utilizada anteriormente na determinação de isoniazida em comprimidos, e recorrendo às mesmas soluções reagentes. Mantiveram-se deste modo as dimensões dos reactores anteriormente referidos, assim como o caudal e as concentrações de ácido sulfúrico (0,54 M) e de catião cério(IV) ( $2 \times 10^{-5}$  M).

Uma primeira e evidente vantagem de um sistema de fluxo multicomutado em relação a outros sistemas de fluxo (FIA), é o baixo volume de amostra necessário, ou consumido, durante a análise. Este facto é particularmente vantajoso na execução de ensaios de dissolução, uma vez que permite manter quase constante o volume do meio de dissolução, sem ser necessário recircular a amostra como acontece com os sistemas FIA.

A elevada sensibilidade atingida com a rede de fluxo multicomutado com detecção fluorimétrica, sendo uma característica desejável para a determinação de isoniazida em várias matrizes, funciona no entanto como um factor de desvantagem quando se pretendem analisar amostras com concentrações elevadas neste fármaco, o que acontece, por exemplo, quando se monitorizam ensaios de dissolução de comprimidos efectuados de acordo com o procedimento recomendado pela Farmacopeia Portuguesa [63]. Em virtude da impossibilidade de aplicação directa da metodologia desenvolvida, e uma vez que foi decidido não alterar a sua configuração, foi necessário implementar um procedimento de diluição em linha de forma a adaptar a concentração das amostras ao intervalo correspondente à zona de resposta linear da metodologia. Uma vez que era impossível aumentar infinitamente o valor da dispersão através da redução do volume de amostragem

(uma variável facilmente ajustável em função do total controlo exercido sobre o tempo de amostragem), desenvolveu-se um procedimento de diluição com base na amostragem de zonas [42] e que consistia, fundamentalmente, numa estratégia de remoção de zona [43]. Um volume extremamente pequeno de amostra era inserido no sistema analítico, a um tempo de amostragem de 1 s (correspondendo a um volume de amostragem de  $16,6 \mu\text{L}$  para um caudal de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ), criando uma zona de reacção que era dispersa e encaminhada para dreno através do canal  $L_3$  (Fig 6.4), sem passar pelo detector. Apesar de um  $t_a$  de 1 s representar um volume de amostra extremamente reduzido, a detecção directa, sem diluição, de uma solução padrão de isoniazida com a concentração de  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  não se mostrou exequível. Depois da inserção da amostra, ao fim de um intervalo de tempo pré-definido (tempo de re-amostragem), a porção mais terminal da zona de amostra, altamente dispersa, era enviada em direcção ao detector. O tempo de re-amostragem era seleccionado de modo a que a maior parte da zona de amostra, inicialmente inserida, se encontrasse ou no interior de  $L_3$  ou já no dreno, garantindo assim a sua rejeição, e proporcionando a obtenção de um elevado valor de diluição de uma forma controlada e reprodutível, o que se apresentou como uma alternativa simples e precisa relativamente à inserção directa de micro-volumes de amostra a  $t_a$  inferiores a 1 s.

A avaliação do nível de diluição conseguido foi efectuada por inserção de um padrão de isoniazida  $13,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) a tempos de re-amostragem compreendidos entre 35 e 55 s (Fig 6.11), verificando-se que o factor de diluição aumentava com o aumento do tempo de re-amostragem, acompanhando o decréscimo do sinal analítico.

Verificou-se também que a intensidade de fluorescência de soluções muito concentradas, por exemplo uma solução de isoniazida  $1,37 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ), era apenas mensurável com tempos de re-amostragem superiores a 59 s.

Tendo em consideração a dosagem dos comprimidos ensaiados, e as curvas de calibração obtidas, os testes de dissolução foram efectuados a um tempo de re-

amostragem de 47 s para a Hidrazida Zimaia (50 mg de isoniazida por comprimido) (Fig 6.12) e de 56 s para a Isoniazida 300 (300 mg de isoniazida por comprimido).

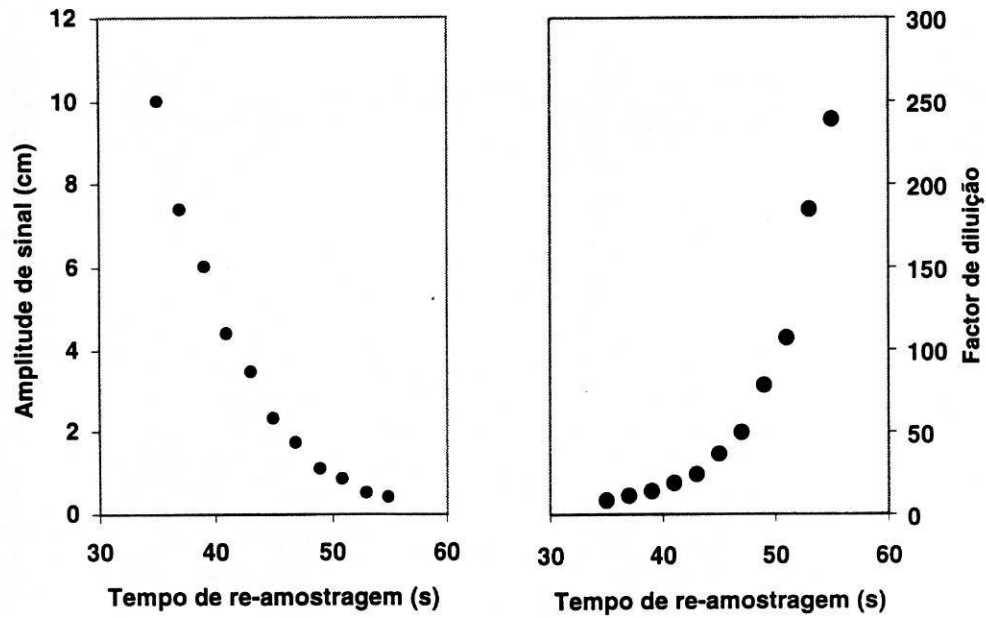


Fig 6.11 – Variação do sinal analítico e factor de diluição obtido com uma solução padrão de isoniazida, com uma concentração de  $13,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com a utilização de um tempo de amostragem de 1 s e crescentes tempos de re-amostragem.

Os resultados obtidos (Fig 6.13) enquadraram-se dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Portuguesa [62] e foram concordantes com os obtidos pelo método de referência, com desvios médios (em percentagem de fármaco total dissolvido) de 2,4 e 3,6%, para duas as formulações, respectivamente.

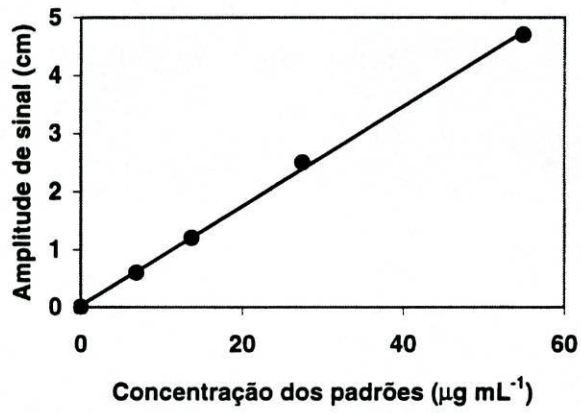


Fig 6.12 – Curva de calibração obtida com soluções padrão de isoniazida com concentrações até  $54,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ , um tempo de amostragem de 1 s e um tempo de re-amostragem de 47 s.

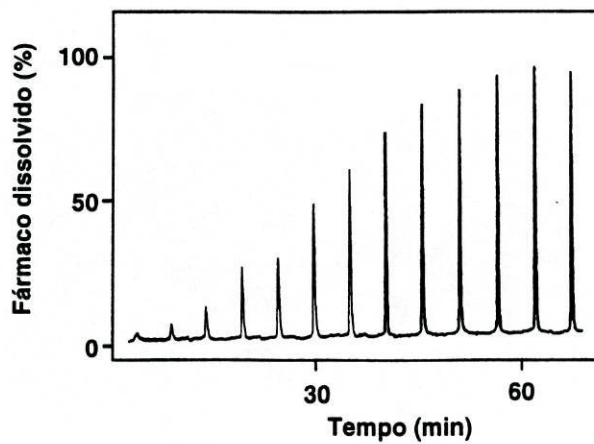


Fig 6.13 – Registo gráfico obtido num ensaios de dissolução de comprimidos doseados a 50 mg de isoniazida, com utilização de um tempo de amostragem de 1 s e um tempo de re-amostragem de 47 s.

#### 6.4. Conclusões

Os resultados obtidos confirmam que a monitorização fluorimétrica do cério(III) formado durante a oxidação da isoniazida pelo cério(IV) é uma estratégia adequada, permitindo a implementação de uma metodologia simples, expedita e facilmente automatizável, para determinação de isoniazida em preparações farmacêuticas. Esta ilação é reforçada pelo limitado efeito interferente dos compostos normalmente utilizados como excipientes. Por outro lado, a metodologia apresenta uma elevada versatilidade, possibilitando a análise de um intervalo alargado de concentrações sem necessidade de re-configurar a montagem analítica, assim como uma sensibilidade acrescida.

A inserção de volumes reduzidos de amostra, seguida da remoção das zonas de amostra mais concentradas e re-amostragem de apenas uma porção mínima da zona mais dispersa, revelou ser uma estratégia expedita para a obtenção de elevados valores de diluição em linha, confirmando a amostragem de zonas como um dos processos de diluição mais fiáveis, sobretudo em combinação com um sistema de fluxo multicomutado, em que a sua implementação é mais simples que no sistemas de fluxo convencionais.

A adaptabilidade do grau de diluição à concentração da amostra é uma característica extremamente interessante para a análise de amostras de concentrações variadas, como acontece com os ensaios de dissolução, os quais são procedimentos de rotina fundamentais e que resultam num aumento acentuado do trabalho desenvolvido ao nível dos laboratórios de controlo de qualidade, e que desta formam poderão ser executadas de forma automática.

## 6.5.Referências

- [1] G.A. Brewer, *Anal. Profiles. Drug Subst.*, 6 (1977) 183.
- [2] A.C. Moffat, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, 2<sup>a</sup> ed., The Pharmaceutical Press, London, 1986.
- [3] K. Parfitt, *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*, 13<sup>a</sup> ed., The Pharmaceutical Press, London, 1993.
- [4] V. Spinkova, *Pharm. Acta. Helv.*, 46 (1971) 643.
- [5] L.H. Welsh, *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, 40 (1957) 807.
- [6] E.L. Pratt, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 814.
- [7] A.A. Abou-Ouf, A.M. Taha, M.B. Saidhom, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 1700.
- [8] M.E. El-Kommos, A.S. Yanni, *Analyst*, 113 (1988) 1091.
- [9] N.M.A. Mahfouz, K.M. Emara, *Talanta*, 40 (1993) 1023.
- [10] H.S.I. Tan, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 993.
- [11] J.T. Stewart, D.A. Settle, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 1403.
- [12] D.S. Goldman, *Science*, 120 (1954) 315.
- [13] K.K. Mahalanabis, D. Basu, B. Roy, *Analyst*, 114 (1989) 1311.
- [14] C.A. Georgiou, M.A. Koupparis, T.P. Hadjiioannou, *Talanta*, 38 (1991) 689.
- [15] J. Bartos, *Ann. Pharm. Fr.*, 29 (1971) 71.
- [16] P.C. Ioannou, *Talanta*, 34 (1987) 857.
- [17] J.A. Garcia-Bautista, J.V. Garcia-Mateo, L. Matinez-Calatayud, *Anal. Lett.*, 31 (1998) 1209.
- [18] S.A. Halvatzis, M.M. Thimotheou-Potamia, A.C. Calokerinos, *Analyst*, 115 (1990) 1229.
- [19] E. Kahane, O. Sackur, *Ann. Pharm. Fr.*, 11 (1953) 175.
- [20] M.B. Devani, C.J. Shishoo, *J. Pharm. Sci.*, 59 (1970) 90.
- [21] J.J. Vallon, A. Badinand, C. Bichon, *Anal. Chim. Acta*, 78 (1975) 93.

- [22] S.T. Sulaiman, Y.O. Hameed, *Anal. Chim. Acta*, 206 (1988) 379.
- [23] V.J. Jennings, A. Dodson, A. Harrison, *Analyst*, 99 (1974) 145.
- [24] A.M. Leal, M.A. Alves, *Rev. Port. Farm.*, 2 (1952) 175.
- [25] J.T. Stewart, I.L. Honigberg, J.P. Btant, W.A. Murray, J.L. Webb, J.B. Smith, *J. Pharm. Sci.*, 65 (1976) 1536.
- [26] K.C. Jindal, R.S. Chaudhary, A.K. Singla, S.S. Gangwal, S. Khanna, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12 (1994) 493.
- [27] R.N. Gupta, M. Lew, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 69 (1988) 441.
- [28] H. Kubo, T. Kinoshita, K. Matsumoto, T. Nishikawa, *Chromatographia*, 30 (1990) 69.
- [29] K. Mawatari, F. Linuma, M. Watanabe, *Anal. Sci.*, 6 (1990) 515.
- [30] A. Carlin, N. Gregory, J. Simmons, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17 (1998) 885.
- [31] A.P. Argekar, S.S. Kunjir, K.S. Purandare, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14 (1996) 1645.
- [32] J.M. Calatayud, *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals: Automation in the laboratory*, Taylor and Francis, London, 1996.
- [33] K.K. Stewart, A.G. Rosenfeld, *Anal. Chem.*, 54 (1982) 2368.
- [34] G.D. Clark, J. Ruzicka, G.H. Christian, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 1773.
- [35] E.A. Zagatto, B.F. Reis, M. Martinelli, F.J. Krug, H. Bergamin, M.F. Gine, *Anal. Chim. Acta*, 198 (1987) 153.
- [36] D.A. Whitman, G.D. Christian, *Talanta*, 36 (1989) 205.
- [37] E.A. Zagatto, F.J. Krug, H. Bergamin, S.S. Jorgensen, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 104 (1979) 279.
- [38] J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, M.M.S. Roque da Silva, *At. Spectrom.*, 12 (1991) 204.
- [39] J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, M.M.S. Roque da Silva, *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 24 (1990) 167.
- [40] B.F. Reis, A.O. Jacintho, J. Mortatti, F.J. Krug, E.A.G. Zagatto, H. Bergamin, L.C.R. Pessenda, *Anal. Chim. Acta*, 123 (1981) 221.

- [41] J.M.P.J. Garrido, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, C. Delerue-Matos, J.L.M. Santos, *J. Autom. Chem.*, 18 (1996) 17.
- [42] A.A. Araújo, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 310 (1995) 447.
- [43] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, *Anal. Chim. Acta*, 377 (1998) 103.
- [44] S. Olsen, J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, 136 (1982) 101.
- [45] M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 4 (1990) 329.
- [46] E. Lamparter, C.H. Lunkenheimer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10 (1992) 727.
- [47] C.A. Georgiu, G.N. Valsami, P.E. Macheras, M.A. Koupparis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12 (1994) 635.
- [48] G. Levy, B.A. Hayes, *New Eng. J. Med.*, 262 (1960) 1053.
- [49] J.B. Callis, D.L. Illman, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.*, 59A (1987) 624.
- [50] M. Josefson, E. Johansson, A. Torstensson, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2666.
- [51] J.H. Cho, P.J. Gemperline, A. Salt, D.S. Walker, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1858.
- [52] A.N. Papas, M.Y. Alpert, S.M. Marchese, J.W. Fitzgerald, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 1408.
- [53] M.A. Koupparis, A. Baruchová, *Analyst*, 111 (1986) 313.
- [54] M.A. Koupparis, E.G. Sarantonis, *J. Pharm. Sci.*, 75 (1986) 800.
- [55] ] M.A. Koupparis, P.I. Anagnostopoulou, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 6 (1988) 35.
- [56] L. Nord, M. Sundgren, A. Torstensson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7 (1989) 421.
- [57] X.Z. Liu, Z.L. Fang, *Anal. Chim. Acta*, 358 (1998) 103.
- [58] K.H. Al-Sowdani, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 179 (1986) 469.
- [59] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, C.S. Cardona, *Talanta*, 40 (1993) 1361.
- [60] M. Sánchez, J. Sánchez-Aibar, *Analyst*, 121 (1996) 1581.
- [61] G.F. Kirkbright, T.S. West, C. Woodward, *Anal. Chim. Acta*, 36 (1966) 298.
- [62] Farmacopeia Portuguesa VI - Edição Oficial, INFARMED, Lisboa, 1997, pg. 1105.

[63] Farmacopeia Portuguesa VI - Edição Oficial, INFARMED, Lisboa, 1997, pg. 775.

[64] Farmacopeia Portuguesa VI - Edição Oficial, INFARMED, Lisboa, 1997, pg. 116.

# CAPÍTULO 7

---

## ***DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMILORIDE COM DUPLA PARAGEM DE FLUXO***

O amiloride é um diurético normalmente utilizado no tratamento da hipertensão arterial. Neste capítulo é proposta uma metodologia analítica, a qual combina a amostragem binária com a utilização de uma dupla paragem de fluxo, para determinação de amiloride em preparações farmacêuticas. A metodologia desenvolvida teve por base a reacção entre o amiloride e a hidrazona da 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH), na presença de Ce(IV), com detecção espectrofotométrica. A intercalação de pequenos segmentos de amostra e reagente, favorecendo a mistura das soluções, possibilitou um desenvolvimento mais rápido da reacção, o que, em combinação com uma estratégia de paragem de fluxo de forma a aumentar o tempo da reacção, resultou num reforço da sensibilidade da metodologia. A implementação de uma dupla paragem de fluxo permitiu a análise simultânea de duas amostra, evitando desta forma que a paragem de fluxo se repercutisse negativamente no ritmo de amostragem.

## 7.1.Introdução

### 7.1.1.Caracterização do amiloride

O amiloride (cloridrato de amiloride), cloridrato de 3,5-diamino-N-(diaminometileno)-6-cloropirazinacarboxamida (Fig 7.1), é uma substância cristalina amarela, pouco solúvel em etanol, razoavelmente solúvel em metanol e insolúvel em clorofórmio, éter e acetona. A solubilidade em solução aquosa é dependente do pH, sendo maior em pH ligeiramente ácido (5,2 mg mL<sup>-1</sup> para pH=4,8) do que em pH alcalino (0,3 mg mL<sup>-1</sup> para pH=10,0) [1]:

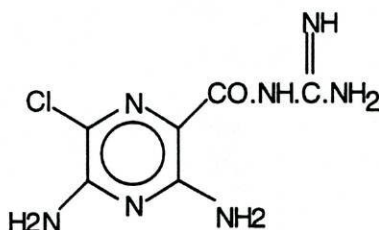


Fig 7.1 – Estrutura do amiloride

O amiloride é um composto estável em solução aquosa à temperatura ambiente, sendo degradado a temperaturas mais elevadas, segundo processos degradativos dependentes do pH [1].

Este fármaco foi sintetizado nos laboratórios da Merck, Sharp & Dohme, sendo pela primeira vez objecto de uma publicação científica em 1966 [2], enquanto que o primeiro estudo estrutura/actividade foi publicado em 1967 [3], ganhando rapidamente uma enorme popularidade como agente terapêutico.

O amiloride é incompletamente absorvido no tracto gastrointestinal (50% da dose administrada) não se ligando significativamente às proteínas plasmáticas, e os níveis

plasmáticos máximos são obtidos 3 a 4 horas após a administração. Não é metabolizado pelo fígado, processando-se a sua eliminação fundamentalmente através do rim [1].

#### *7.1.1.1. Actividade*

O amiloride é um diurético que actua principalmente ao nível do tubo contornado distal. A sua acção é considerada como poupadora de potássio, visto que à semelhança de outros diuréticos, como a espirolactona, incrementa a excreção de sódio, reduzindo a de potássio [1]. No entanto esta acção não está relacionada com os níveis de aldosterona, pois não é, ao contrário da espirolactona, um antagonista da aldosterona. O amiloride diminui a acção excretora de potássio de outros diuréticos e pode promover uma eliminação colateral de sódio.

#### *7.1.1.2. Indicações terapêuticas*

A principal utilização do amiloride é como agente poupador de potássio em pacientes sujeitos a uma terapia com diuréticos kaliuréticos (por exemplo tiazidas como a hidroclorotiazida), com vista a restaurar os valores normais de potássio e/ou prevenir o desenvolvimento de hipocalémia. Desta forma, e quase sempre combinado com a hidroclorotiazida, é usado no tratamento da hipertensão arterial (doses entre os 1,25 e os 5 mg diários), particularmente naqueles doentes onde se pode esperar uma depleção de potássio e/ou magnésio. Na insuficiência cardíaca congestiva (dose entre os 5 e os 10 mg diários) está indicado no tratamento do edema associado, por aumentar a excreção renal de sódio, cloreto e água, reduzindo a eliminação de potássio. Consegue-se assim um balanço positivo deste catião, o que constitui um factor protector em doentes sujeitos a uma terapia com digitálicos.

O amiloride é também usado como substância dopante em actividades desportivas [4], com dois objectivos principais: como forma de conseguir uma rápida diminuição do peso corporal em desportos escalonados por categorias de peso; para dissimular a presença ou dificultar a detecção de outro agente dopante, através da diminuição da sua concentração na urina por produção de um grande volume da mesma num curto espaço de tempo. Devido à utilização descontrolada e ilegal deste fármaco, o amiloride foi em 1999 incluído pelo Comité Olímpico Internacional na lista de substâncias proibidas [4].

### **7.1.2. Métodos de análise**

O amiloride pode ser determinado por titulação não-aquosa com ácido perclórico, sendo este o procedimento normalmente recomendado pelas Farmacopeias, divergindo no entanto na forma de determinação do ponto de equivalência, que pode ser visual, como acontece com a Farmacopeia dos Estados Unidos [5], ou potenciométrica, no caso da Farmacopeia Portuguesa [6].

O cloridrato de amiloride apresenta uma banda de intensa absorção na região da radiação ultravioleta, mais precisamente dos 360 nm, atribuída ao anel pirazínico substituído, a qual serviu de base para o desenvolvimento de inúmeras metodologias analíticas para a sua determinação quantitativa, quer isoladamente, quer em combinação com outros fármacos. Entre estas metodologias salientam-se aquelas baseadas na espectrofotometria derivativa, utilizada na determinação conjunta de amiloride e hidroclorotiazida [7-10]. Sastry *et al.* desenvolveram alguns métodos espectrofotométricos para determinação de amiloride, baseados em reacções com o cloridrato de N,N-dimetil-p-fenilenodiamina [11], cloramina T [11] e 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona [12], e um método fluorimétrico directo, após solubilização do fármaco em 2-etoxietanol, com  $\lambda_{ex}=424,5$  nm e  $\lambda_{em}=439,5$  nm [13]. Outros métodos fluorimétricos incluem a determinação

directa, em ácido acético [14], e duas metodologias propostas por Murillo-Pulgarin *et al.* envolvendo duas variantes de fluorescência síncrona [15, 16].

A fluorescência foi também utilizada como técnica de detecção em alguns métodos de cromatografia líquida aplicados na análise de amostras biológicas, como plasma [17] e urina [18], embora na maior parte dos trabalhos apresentados seja empregue a detecção ultravioleta [10, 19-21], como acontece com a determinação de amiloride em comprimidos, de acordo com a Farmacopeia dos Estados Unidos [22]. A cromatografia em camada fina (TLC) foi aplicada por Zivanovic *et al.* [23] com quantificação densitométrica a 254 nm, a HPTLC por Agekar *et al.* sendo a quantificação baseada na área do pico obtido por varrimento densitométrico a 275 nm [24].

Outras técnicas propostas para determinação indirecta de amiloride são a espectrofotometria de absorção atómica (AAS) e a espectrofotometria de emissão atómica em plasma por corrente contínua (DCP-AES). Os métodos utilizados envolvem a formação de complexos insolúveis com tiocianatos de zinco e cádmio, sendo os excessos de Zn ou Cd, que não reagiram, determinados pelas técnicas referidas [25], ou então com tiocianatos de cobalto ou manganês com determinação do Co [26] ou Mn [27] em excesso.

No que diz respeito à determinação de amiloride usando sistemas de fluxo, a sua utilização é muito reduzida, havendo a destacar a implementação de um sistema de fluxo com detecção quimiluminométrica após reacção do amiloride com a N-bromosuccinimida [28].

### **7.1.3. A paragem de fluxo como estratégia analítica**

O recurso a uma estratégia de paragem de fluxo tem dois objectivos fundamentais [29]: i) aumentar a sensibilidade da determinação por aumento do tempo de reacção, o que tem como resultado um aumento da extensão da reacção; ii) monitorizar o

desenvolvimento da reacção, funcionando como método cinético para obtenção de um resultado analítico.

De acordo com Ruzicka e Hansen [30], garantindo que o movimento de um fluxo transportador é controlado de forma precisa, é possível transportar uma zona de amostra durante o tempo necessário para garantir uma mistura adequada com um reagente, promover a sua paragem de forma a permitir que a reacção se desenvolva, e retomar o transporte para detecção. No caso, por exemplo, de uma determinação espectrofotométrica, obter-se-á um aumento da sensibilidade se a zona de amostra for parada durante um certo tempo, para garantir um desenvolvimento de cor adequado, e depois transportada para avaliação da absorvância. Se a montagem analítica apresentar dois reactores em paralelo, como acontece com a montagem proposta por Ruzicka e Hansen [29] poderão analisar-se duas amostras em simultâneo, o que duplicará a frequência de amostragem. Esta montagem foi utilizada na determinação de fosfato em água, a concentrações entre 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e mesmo controlada manualmente, forneceu resultados reprodutíveis.

Os mesmos autores propuseram também sistemas de fluxo semelhantes, que denominaram de FIA paralelo (*parallel FIA*) [29], os quais eram baseados em dois ou mais reactores, montados em paralelo e partilhando os mesmos pontos de inserção da amostra e de detecção, nos quais as amostras eram “armazenadas” durante intervalos de tempo definidos com vista a prolongar o tempo de reacção. Estes sistemas requeriam uma adequada temporização de todas as fases do processo analítico de forma a garantir um máximo de ritmo de amostragem, com uma elevada reprodutibilidade, e evitando a ocorrência de contaminações entre amostras. Tempos de residência extremamente elevados, perspectivados em termos de horas ou mesmo dias [29], eram obtidos com o FIA paralelo multicanal, em que várias zonas de amostra eram paradas paralelamente, durante o intervalo de tempo desejado, num tambor rotativo contendo vários reactores. O funcionamento deste sistema era faseado: primeiro tinha lugar a fase de amostragem, em

que as amostras eram introduzidas sequencialmente em reactores adjacentes, depois a fase de paragem, em que ocorria o desenvolvimento da reacção, e finalmente a fase de detecção em que se procedia a execução da medida por transporte de todas as amostras sequencialmente até ao detector. De forma a garantir reactores idênticos, estes eram obtidos por perfuração num mesmo cilindro de Teflon, que funcionava como tambor rotativo. Dado o limitado volume interno de cada reactor (80  $\mu$ L), durante a fase de carregamento das amostras ensaiadas (corantes) eram eliminados os extremos das porções frontal e terminal da zona da amostra, num processo semelhante à amostragem de zonas, permanecendo apenas no interior do reactor a porção mais central. O tambor de Teflon, possuindo oito canais, era depois de carregado, retirado da montagem e armazenado durante 6 horas, sendo depois reinstalado para detecção. Este sistema foi objecto de grandes reservas, em virtude, nomeadamente, da sua complexidade e da sua aplicabilidade a situações envolvendo reacção e não apenas dispersão de um corante, como tinha acontecido na situação proposta.

A resposta a esta eventual limitação seria dada por Rocks *et al.* que em 1986 [31] publicaram um trabalho usando um sistema com quatro canais paralelos para determinação da actividade da fosfatase ácida no soro. Sendo baseada numa reacção lenta, a montagem desenvolvida envolvia a actuação de uma válvula equipada com um motor passo-a-passo, controlado por computador, que permitia distribuir as amostras por cada um dos canais onde eram armazenadas durante 5 minutos, possibilitando apesar disso frequências de amostragem de 48 amostras por hora.

Uma alternativa a estes sistemas foi proposta por Krug *et al.* [32]. Denominada retenção de zona (*zone trapping*), esta metodologia funcionava como uma variante da técnica de amostragem de zonas [33] e envolvia a selecção da zona central da amostra, a qual era removida do percurso analítico, sendo retida durante um certo intervalo de tempo ao fim do qual voltava a ser re-introduzida no sistema. Durante a fase de retenção a amostra era sujeita a uma reacção química lenta num banho termostaticado a 38 °C. Este

sistema não utilizava válvulas, mas sim um injector-comutador, e foi aplicada na determinação de amónio em águas, a valores de concentração de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  com um ritmo de amostragem de 90-100 amostras por hora, para um tempo de retenção de 26 s.

A execução de métodos cinéticos directos ou diferenciais é outro dos objectivos associados à utilização de uma estratégia de paragem de fluxo, e sem dúvida a mais divulgada. Nesta estratégia, a amostra é transportada de modo a conseguir-se o grau de mistura desejado, com o reagente, e depois é retida no interior da célula de fluxo do instrumento de medida, onde é monitorizado o desenvolvimento da reacção [29]. 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. Desta forma é possível monitorizar qualquer secção da zona de amostra, com diferentes graus de dispersão, e garantir a reprodutibilidade da secção a monitorizar. Assim sendo, o controlo automático através de um mecanismo temporizador ou por recurso a um microcomputador é a estratégia privilegiada, o que explica o cada vez maior sucesso dos métodos cinéticos em sistemas de fluxo e o grande número de trabalhos publicados nesta área.

#### **7.1.4. Objectivo**

A implementação de um sistema de fluxo possibilitando a execução de paragens de fluxo, revela-se uma estratégia expedita para o desenvolvimento de metodologias analíticas envolvendo reacções moderadamente lentas, contribuindo para um reforço da sensibilidade obtida. As possibilidades de automatização e a versatilidade disponibilizadas pela multicomutação permitem um efectivo controlo de todo o processo analítico, desde a rápida e eficiente homogeneização amostra/reagente, passando pelo controlo preciso da temporização da paragem, até à manipulação simultânea de forma simplificada de duas amostras.

## 7.2. Parte Experimental

### 7.2.1. Reagentes e soluções

Uma solução padrão com a concentração de  $400 \text{ mg L}^{-1}$ , foi preparada semanalmente por dissolução de 40 mg de cloridrato de amiloride (Sigma-Aldrich, ref. A7410) em água desionizada, seguido de diluição até  $100 \text{ cm}^3$ . Esta solução padrão foi conservada no frigorífico. As soluções padrão usadas na elaboração das curvas de calibração, foram obtidas por diluição com água desionizada.

A solução reagente de cério(IV), com a concentração de  $3,16 \times 10^{-3} \text{ M}$ , foi preparada por dissolução de 0,2 g de sulfato de cério(IV) e amónio numa solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com a concentração de 0,36 M, seguido de diluição até  $100 \text{ cm}^3$  com a mesma solução de ácido sulfúrico.

A solução reagente da hidrazona da 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) (Sigma-Aldrich, ref. M8006), com a concentração de  $1,85 \times 10^{-3} \text{ M}$  foi preparada por dissolução e diluição até  $100 \text{ cm}^3$ , com água desionizada, de 0,04 g de MBTH.

### 7.2.2. Equipamento

A montagem de fluxo multicomutado foi concebida tendo como detector, para medição da absorvância das soluções a 545 nm, um espectrofotómetro da marca Jenway, modelo 6100, equipado com uma célula de fluxo com um volume óptico de  $18 \mu\text{L}$ .

A montagem de fluxo consistia num conjunto de 5 válvulas solenóides, sendo três de canal único (válvulas de abertura/fecho, normalmente fechadas) NResearch, modelo 161 T011, e duas de três vias (duas entradas e uma saída) NResearch, modelo 161 T031. A ligação entre as válvulas e o sistema de aspiração, para transporte das soluções, era efectuada por tubagens e reactores fabricados em Teflon, com um diâmetro interno de 0,8

mm. Os ligadores, terminais e pontos de confluência, usados na montagem de fluxo, eram idênticos aos referidos nos trabalhos anteriores.

A propulsão das soluções, por aspiração, foi efectuada com o auxílio de uma bomba de pistão Crison Micro BU 2031, equipada com uma seringa em vidro com uma capacidade de 5 mL.

As titulações em meio não-aquoso com ácido perclórico utilizadas como metodologia de referência para determinação de amiloride em comprimidos, foram executadas com o titulador automático cujos componentes foram referido anteriormente (Capítulo 2).

### **7.2.3. Montagem de fluxo multicomutado**

A montagem de fluxo multicomutado foi concebida de forma a proporcionar duas zonas de reacção independentes, que poderiam ter ou não características semelhantes, nomeadamente em termos de comprimento e volume interno. A inserção de cada um reagentes foi atribuída a uma válvula diferente, existindo portanto um ponto de confluência de todas as soluções.

Assim sendo, o diagrama da montagem (Fig 7.2) incluía 5 válvulas solenóides: 3 destas válvulas ( $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$ ) eram válvulas de canal único (normalmente fechadas) enquanto que as outras duas eram válvulas de três vias (duas entradas/uma saída).  $V_1$  era responsável pela introdução da amostra no sistema analítico, enquanto que  $V_2$  e  $V_3$  tinham a seu cargo a inserção da solução reagente de cério(IV), usada como solução transportadora, e a solução reagente de MBTH, respectivamente.  $V_4$  e  $V_5$  estavam colocadas após o ponto de confluência (C), precedendo o detector, e tinham como função direccionar o fluxo, tanto através de  $L_1$  como de  $L_2$ . Em virtude dos objectivos que presidiram a este trabalho, e que serão discutidos mais adiante, aos reactores  $L_1$  e  $L_2$  foram atribuídas idênticas características.

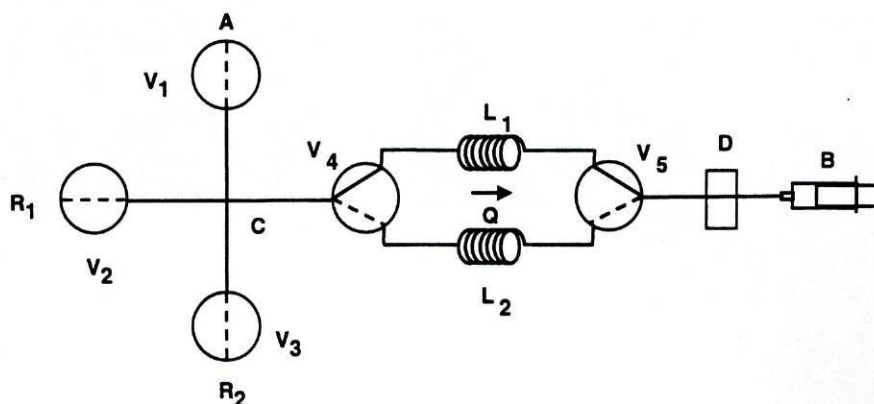


Fig 7.2 – Diagrama da montagem de fluxo multicomutado, com dupla paragem de fluxo, para determinação de cloridrato de amiloride:  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  – válvulas solenóides de canal único (normalmente fechadas);  $V_4$  e  $V_5$  - válvulas solenóides de três vias (duas entradas/uma saída): a linha contínua no esquema da válvula corresponde à posição 1 e a linha tracejada à posição 2; A - amostra;  $R_1$  – solução de cério (IV);  $R_2$  – solução de MBTH;  $L_1$  e  $L_2$  – reactores enrolados, 0,5 m de comprimento; D - detector; B – bomba de pistão; C - ponto de confluência; Q – caudal,  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

Numa primeira fase, a válvula  $V_2$  era colocada na posição de aberta e a solução reagente de cério(IV) era aspirada através de  $L_1$  (com  $V_4$  e  $V_5$  colocadas na posição 1) em direcção ao detector. A inserção da amostra era efectuada por amostragem binária, através da intercalação de pequenas alíquotas da amostra com pequenas alíquotas da solução reagente de MBTH. Esta intercalação era realizada por accionamento alternado de  $V_1$  (amostra) e  $V_3$  (MBTH) entre as posições de aberta/fechada, permanecendo cada válvula em cada uma destas posições durante um tempo pré-definido. O tempo de permanência de  $V_1$  na posição de aberta, em conjunto com o número de ciclos da sequência de intercalação, estabelecia o tempo total de amostragem (valor também pré-definido), o qual por sua vez em conjunto com o caudal, estabelecia o volume total de

amostragem. Após a introdução da amostra,  $V_2$  (que tinha permanecido na posição de fechada) era aberta enquanto que  $V_1$  e  $V_3$  eram fechadas,  $V_4$  e  $V_5$  eram colocadas na posição 1 e a zona de amostra era transportada através de  $L_1$ , por intermédio da solução reagente de cério(IV). O transporte da amostra no interior de  $L_1$  decorria durante um intervalo de tempo previamente definido, o qual era suficientemente longo para acondicionar toda a zona de amostra em  $L_1$  (após  $V_4$ ), mas não excessivo para evitar que a porção frontal da zona de amostra ultrapassasse  $V_5$ . Após o escoamento do tempo de transporte,  $V_4$  e  $V_5$  eram colocadas na posição 2, a zona de amostra era detida no interior de  $L_1$ , e a solução transportadora fluía então através de  $L_2$ . Nesta fase ocorria a inserção de uma nova amostra, através da reprodução da sequência de intercalação previamente utilizada, a qual eram então conduzida e detida no interior de  $L_2$ .

Após o desenvolvimento da reacção, durante o intervalo de paragem de fluxo seleccionado,  $V_4$  e  $V_5$  eram colocadas de novo na posição 1, era novamente retomado o fluxo através de  $L_1$  e a zona de amostra no seu interior era dirigida para o detector. A segunda amostra, no interior de  $L_2$ , era sujeita a um procedimento similar, por colocação de  $V_4$  e  $V_5$  novamente na posição 2.

A curva analítica de calibração era obtida por inserção de um conjunto de padrões utilizando as mesmas variáveis usadas para a amostra, nomeadamente no que diz respeito ao tempo de amostragem, tempo de transporte e tempo de paragem de fluxo.

As soluções foram propulsionadas por aspiração, a um caudal de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### **7.2.4. Método de referência**

Em virtude de em Portugal não serem comercializadas preparações farmacêuticas contendo exclusivamente cloridrato de amiloride, as preparações farmacêuticas analisadas pela metodologia desenvolvida continham também hidroclorotiazida (um diurético tiazídico com actividade anti-hipertensora): Chibrético, Moduretic e Diurene 50, preparações

farmacêuticas na forma de comprimidos doseados a 5,0 mg de cloridrato de amiloride e 50 mg de hidroclorotiazida, por comprimido, e Diurene 25, comprimidos doseados a 2,5 mg de cloridrato de amiloride e 25,0 mg de hidroclorotiazida. As soluções das formulações farmacêuticas usadas como amostra, foram preparadas por pesagem e pulverização de 20 comprimidos de cada uma das formulações analisadas, sendo depois tomadas quantidades adequadas de pó, as quais foram dissolvidas e diluídas até 50 cm<sup>3</sup>, com água desionizada. As soluções de amostra foram filtradas previamente à análise.

A determinação de cloridrato de amiloride no fármaco sólido foi efectuada de acordo com a Farmacopeia dos Estados Unidos [5] por titulação não-aquosa em ácido acético glacial, tendo sido utilizado como titulante o ácido perclórico e como indicador o cristal violeta.

A determinação de cloridrato de amiloride em comprimidos foi efectuada de acordo com o método recomendado pela Farmacopeia dos Estados Unidos [22]. Este método consistiu na determinação por HPLC numa coluna C<sub>18</sub> com detecção espectrofotométrica a 286 nm, e é idêntico ao recomendado para os comprimidos que contêm conjuntamente cloridrato de amiloride e hidroclorotiazida [34], o que estava de acordo com a composição dos comprimidos ensaiados, que incluía ambos os fármacos.

### **7.3.Resultados e sua discussão**

A execução de uma reacção química no interior de um sistema de fluxo, tendo como resultado a obtenção de um sinal analítico, é condicionada por dois requisitos fundamentais: a ocorrência de uma mistura entre solução de amostra e soluções reagentes, e o assegurar de um tempo de residência ou de reacção, suficientemente elevado para permitir a obtenção do produto de reacção desejado em quantidades detectáveis, a que corresponderia um sinal analítico mensurável. Em processos analíticos envolvendo reacções químicas de desenvolvimento lento, requerendo portanto tempos

superiores de reacção para a obtenção de sinais com a magnitude apropriada, o tempo de residência poderá ser aumentado quer através do recurso a reactores mais comprimidos, quer através da utilização de caudais inferiores ou mesmo por paragem do fluxo durante um intervalo de tempo definido, ao fim do qual seria retomado com vista à execução da medida. Tendo em consideração que a dispersão da zona de amostra é praticamente inexistente em situações de paragem de fluxo [29], o recurso a esta estratégia, com o objectivo de aumentar a sensibilidade de uma determinada reacção química, obrigaria a que a mistura entre a amostra e o reagente tivesse já ocorrido, numa extensão apropriada, aquando da paragem do fluxo. Só assim seria possível garantir que um acréscimo de tempo de reacção resultaria num factor de promoção do desenvolvimento da dita reacção. Por outro lado, e uma vez que a dispersão aumenta com o aumento do reactor e portanto com o percurso percorrido pela zona de amostra, a obtenção de uma mistura eficiente, considerada em termos de homogeneização amostra/reagente, o mais rápido possível, ou dito de outra forma, na mais curta distância possível, resultaria numa diminuição da dispersão e por isso num reforço da sensibilidade.

### ***7.3.1. Optimização da montagem de fluxo***

O desenvolvimento de uma metodologia de fluxo para determinação de amiloride por reacção com o MBTH na presença de cério(IV), teve por base a implementação de uma montagem multicomutada de canal único. Esta montagem, de grande simplicidade, permitiu pôr em evidência uma vantagem da multicomutação em relação aos sistemas FIA convencionais: a possibilidade de misturar mais do que um reagente num mesmo canal, evitando a utilização de multicanais e vários pontos de confluência, o que possibilitava a redução da dispersão, simplificando o processo de propulsão das soluções e o desenho da montagem, ao mesmo tempo que permitia uma redução no consumo de reagentes.

Numa primeira fase a amostra era misturada com o MBTH, dando origem a uma primeira zona de reacção, a qual era em seguida misturada com a solução de Ce(IV) criando uma segunda zona de reacção que era então encaminhada para o detector. Uma vez que a solução de cério(IV) foi a escolhida para solução transportadora, a forma como se processaria a mistura ao nível da segunda zona de reacção estaria dependente do grau de homogeneização e portanto da eficiência da mistura MBTH/amostra que ocorria na primeira fase. Com vista a assegurar um rápido desenvolvimento da reacção esta primeira mistura deveria ser extensa e obtida quase instantaneamente. A inserção de um segmento único de amostra entre dois troços de MBTH comprometeria o desenvolvimento da reacção visto que a coalescência entre as duas soluções estaria muito limitada, o mesmo acontecendo portanto ao número de moléculas de MBTH em contacto com moléculas de amiloride. No entanto, se alíquotas extremamente pequenas da solução de amostra fossem intercalados com alíquotas extremamente pequenas da solução reagente, obter-se-ia uma sequência contínua de interfaces de baixa dispersão entre as duas soluções, as quais favoreceriam a obtenção de um elevado grau de homogeneização, promovendo o desenvolvimento da reacção. O controlo do processo de intercalação, permitindo a selecção do número de ciclos de intercalação, do volume mais adequado para as alíquotas, assim como da relação entre o volume de amiloride e o volume de MBTH, proporciona uma quase imediata homogeneização da zona de reacção, a qual se dispersa depois de forma mais conveniente na solução reagente de cério(IV) durante a segunda etapa da reacção. Por este motivo, foi possível reduzir acentuadamente o comprimento do reactor, e portanto do percurso percorrido pela amostra antes da paragem do fluxo, o que resultou numa atenuação da diluição com um concomitante incremento da sensibilidade, sem que com isso fosse comprometida a reprodutibilidade da determinação.

A avaliação da influência da configuração de intercalação amiloride/MBTH no desenvolvimento da reacção, foi efectuada por intermédio do ensaio de diferentes combinações entre número de ciclos de intercalação/tempo de intercalação ( $t_i$ ), agrupados

de forma a manter constante o tempo global de amostragem (considerado como o produto do número de ciclos pelo tempo de intercalação). Assim sendo, um tempo global de amostragem de 8 segundos foi ensaiado com diferentes sequências de intercalação entre uma solução de amiloride  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  e uma solução de MBTH  $1,85 \times 10^{-3} \text{ M}$ , sendo o tempo de intercalação idêntico para ambas as soluções. Estas sequências consistiram numa sequência de 8 ciclos consecutivos a um  $t_i$  de 1 s, uma outra de 4 ciclos a um  $t_i$  de 2 s, uma terceira de 2 ciclos a um  $t_i$  de 4 s, e finalmente um único ciclo a um  $t_i$  de 8 s. Dado que para um dado tempo de amostragem o volume amostrado é dependente do caudal da solução, este foi mantido constante a um valor de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Em função do valor destas variáveis resultou que, independentemente da configuração da sequência de intercalação utilizada, para um tempo de amostragem de 8 s o volume de amostra introduzido no sistema analítico era de  $67 \mu\text{L}$ . Os resultados obtidos (Fig 7.3) permitiram verificar que o sinal analítico aumentava com o tempo de amostragem, quase duplicando quando a sequência de intercalação variava de um único ciclo a um  $t_i$  de 8 s para 8 ciclos a um  $t_i$  de 1 s, confirmando que a utilização de tempos de intercalação mais baixos, o que representava volumes de intercalação mais pequenos, favorecia a homogeneização da zona de reacção e por conseguinte o desenvolvimento da reacção.

Uma primeira aproximação, com o objectivo de aumentar o tempo de reacção, consistiu na utilização de reactores de maior comprimento. Verificou-se no entanto que para baixos volumes de amostragem, o benefício conseguido com o incremento do tempo de residência era contrabalançado pela superior dispersão da zona de amostra (Fig 7.3). Este facto apelava à utilização de maiores volumes de amostra, os quais requeriam por isso superiores tempos de amostragem e, como tal, um número acrescido de ciclos de intercalação.

A influência do volume de amostra, em termos de sinal analítico, foi avaliada por intermédio da execução de repetidas intercalações, a um número crescente de ciclos de intercalação, de alíquotas de uma solução de amiloride  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  e de alíquotas de uma

solução de MBTH  $1,85 \times 10^{-3}$  M, sendo depois a zona de amostra transportada para detecção através de uma solução de cério(IV)  $3,16 \times 10^{-3}$  M. O tempo de intercalação utilizada foi de 1 s. Em função da marcada dependência do sinal analítico face ao tempo de reacção, foram avaliados reactores de diferentes comprimentos, enquanto o caudal foi fixado a um valor de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , proporcionando o ensaio de distintos tempos de residência.

Os resultados obtidos (Fig 7.3) demonstraram que, para um reactor com um comprimento de 50 cm, o sinal analítico aumentava com o número de repetições (e deste modo com o volume de amostra) até que a sequência de intercalação era constituída por 8 ciclos, valor acima do qual surgia uma tendência para a estabilização do sinal.

Este número de ciclos correspondia a um tempo total de amostragem de 8 s e a um volume global de amostra de  $67 \mu\text{L}$ . A zona de reacção, se forem considerados como aditivos os volumes das soluções de amiloride e de MBTH, apresentaria então um valor de  $134 \mu\text{L}$ . Como que confirmando a ocorrência de uma superior diluição, para um reactor com um comprimento de 100 cm, o máximo de sinal foi obtido com um tempo de amostragem de 10 s (correspondendo a  $83 \mu\text{L}$ ), enquanto que para reactores de 200 e 400 cm, seria obtido com tempos de amostragem de 16 s ( $134 \mu\text{L}$ ) e 24 s ( $200 \mu\text{L}$ ), respectivamente. Em qualquer dos casos, o acréscimo de tempo de reacção obtido com o reactor de 400 cm proporcionou, em comparação com o reactor de 50 cm, a quadruplicação do sinal. Em contrapartida, verificou-se um acréscimo de idêntica ordem no tempo necessário para a execução da análise, com o concomitante impacto negativo em termos de ritmo de amostragem.

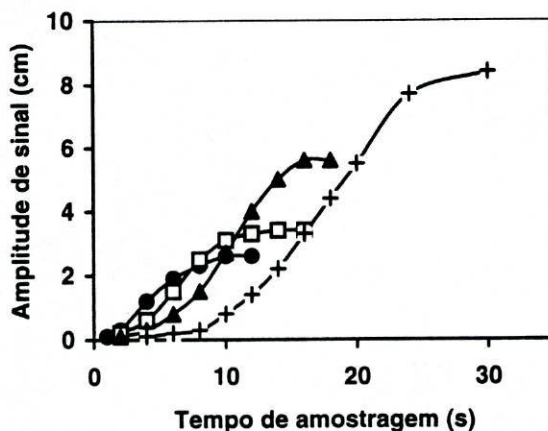


Fig 7.3 – Influência do tempo de amostragem na amplitude do sinal analítico, para reactores com distintos comprimentos: ● - 50-cm; □ - 100-cm; ▲ - 200-cm; + - 400-cm.

Em função destes resultados foi seleccionada e experimentada uma outra estratégia, a qual consistia no aumento do sinal analítico por paragem do fluxo durante um determinado intervalo de tempo, antecedendo a detecção. Aparentemente, esta variante apresentaria evidentes vantagens, onde se incluía uma versatilidade reforçada pela possibilidade de selecção de diferentes tempos de paragem, permitindo disponibilizar uma gama alargada de tempos de reacção. Por outro lado, seria possível reduzir acentuadamente o comprimento do reactor, visto que a homogeneização amostra/reagente estava assegurada *a priori* pela amostragem binária, o que permitia a redução do consumo de amostra e reagentes, especialmente no que concerne à solução transportadora.

Os resultados obtidos confirmaram as potencialidades da paragem de fluxo. De facto, foi verificado que a inserção a um tempo de amostragem de 8 s, de uma solução de amilorida  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , produzia sinais analíticos exibindo crescente magnitude à medida

que a zona de amostra era sujeita a crescentes períodos de paragem (Fig 7.4). Assim, com este tempo de amostragem, em conjunto com um intervalo de paragem de 120 s e a utilização de um reactor com 50 cm de comprimento obtinha-se um sinal semelhante ao obtido em modo contínuo, portanto sem paragem de fluxo, com a inserção de um volume de amostra duplo (16 s de tempo de amostragem) em conjunto com um reactor de 200 cm. Apesar de comparáveis em termos de sinal e tempo de reacção, o modo com paragem de fluxo exibiu evidentes vantagens em termos de economia de reagentes e de amostra.

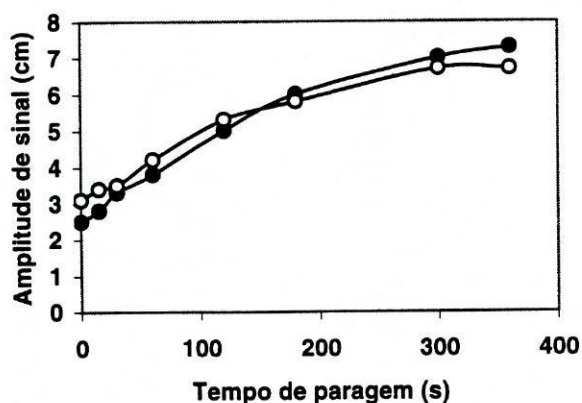


Fig 7.4 – Intensificação do sinal analítico obtido por recurso a crescentes tempos de paragem de fluxo, para reactores com distintos comprimentos: ● - 50 cm; ○ - 100 cm.

Para intervalos de paragem inferiores a 150 s os sinais analíticos fornecidos pela montagem com um reactor de 50 cm eram inferiores aos obtidos com um reactor de 100 cm, revelando que a coalescência da amostra com os reagentes, antecedendo a paragem do fluxo, era menos extensa no caso do reactor mais curto, em concordância com a menor distância percorrida pela zona de amostra.

Contudo, acima dos 150 s o reactor de 50 cm apresentava um desempenho superior, devido ao facto de o acréscimo no tempo de paragem favorecer o desenvolvimento da reacção, permitindo desta forma contrabalançar a maior diluição da zona de amostra que estava inerente à utilização do reactor mais comprido. Em função da similaridade de resultados e do menor tempo requerido para a execução da análise, o reactor de 50 cm foi o seleccionado para os ensaios posteriores, em detrimento do reactor de 100 cm, assim como um tempo de amostragem de 120 s. Esta escolha pretendeu estabelecer um compromisso entre sensibilidade e ritmo de amostragem. A confluência, utilizada como ponto de convergência de todas as soluções (Fig 7.2), foi colocada o mais próximo possível da válvula  $V_4$  de modo a prevenir a contaminação entre amostras e a possibilitar que a lavagem do canal de transporte fosse efectuada o mais rápido possível antes da introdução de uma nova amostra.

A avaliação da dependência da magnitude do sinal analítico face à concentração de MBTH foi efectuada através dos ensaios de soluções deste composto com concentrações compreendidas entre 0,01% e 0,08% (m/V) ( $4,64 \times 10^{-4}$  e  $3,71 \times 10^{-3}$  M). Os resultados obtidos (Fig 7.5) permitiram verificar que o sinal aumentava de forma pronunciada até uma concentração de MBTH de 0,04% ( $1,85 \times 10^{-3}$  M), valor acima do qual apresentava uma tendência de estabilização.

Foi também efectuada uma experiência comparativa, usando os mesmo parâmetros analíticos mas em modo contínuo, ou seja, sem paragem de fluxo. Os resultados obtidos nestas circunstâncias (Fig 7.6) apresentam características semelhantes aos anteriores, com um aumento da absorvância em função do aumento da concentração de MBTH, embora de forma não tão pronunciada como no caso da paragem de fluxo, e sem que apresente uma tendência tão acentuada para a estabilização do sinal.

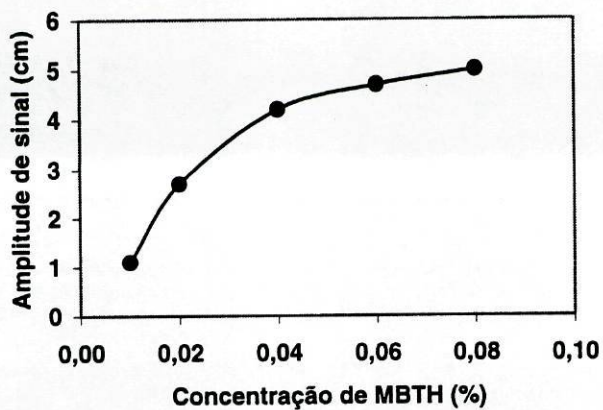


Fig 7.5 – Influência da concentração de MBTH na magnitude do sinal analítico, com paragem de fluxo.

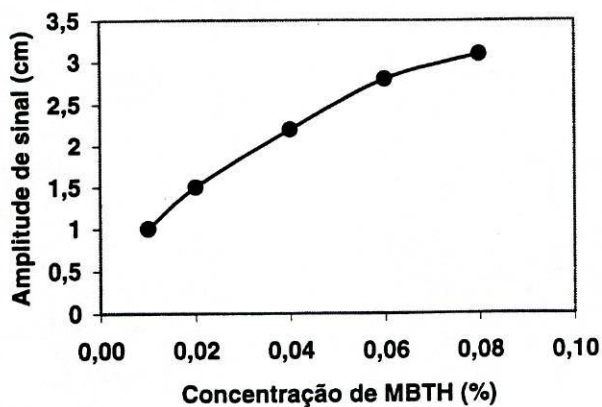


Fig 7.6 – Influência da concentração de MBTH na magnitude do sinal analítico, em modo contínuo.

Por outro lado, o valor da absorvância máxima para o modo com paragem de fluxo era quase duplo do obtido no modo contínuo, confirmando que a extensão da reacção é superior, como seria de esperar em virtude do maior tempo de reacção. Esta ilação é reforçada pela análise do perfil das duas curvas: no primeiro caso o máximo de sinal é obtido com uma concentração de MBTH inferior ao segundo, e após esse valor o sinal tende a estabilizar; no caso do modo contínuo existe um crescimento sustentado e a tendência de estabilização surge a uma concentração mais elevada. Assim, é de prever que no modo com paragem de fluxo a reacção atinja o ponto de equilíbrio, o que provavelmente não ocorrerá na situação em contínuo. Neste caso, e pela análise dos resultados, é previsível que mesmo que aumentasse o tempo de reacção, por aumento do tamanho do reactor, dificilmente seriam obtidos resultados da mesma magnitude dos obtidos no modo com paragem, até pelo efeito limitante do aumento da dispersão.

Experiências de natureza idêntica foram efectuadas para avaliar, em termos de sinal, o efeito da concentração de cério(IV). Foram ensaiadas soluções deste catião num intervalo de concentrações entre 0,05 e 0,5% (m/V) ( $7,90 \times 10^{-4}$  e  $7,90 \times 10^{-3}$  M). Observou-se que a absorvância aumentava com a concentração de cério(IV) até aos 0,2% ( $3,16 \times 10^{-3}$  M), apresentando depois uma decréscimo (Fig 7.7).

O ensaio em modo contínuo apresentou um comportamento semelhante (Fig 7.8), com um aumento da absorvância (comparativamente menor) até uma concentração de Ce(IV) de  $7,4 \times 10^{-3}$  M, seguido de uma diminuição ligeira. Também à semelhança do que aconteceu no caso do MBTH, o máximo de absorvância foi obtido, com paragem, a concentrações de cério(IV) inferiores, o que permite antever uma maior extensão da reacção. Este facto, inter-relacionado com um mais longo tempo de reacção, poderia justificar, por um lado, o facto de o sinal máximo ser obtido com menores concentrações de cério(IV), e por outro lado, o decréscimo mais acentuado da absorvância após o valor máximo, o que poderia ser explicado pela eventual ocorrência de reacções colaterais devido ao excesso de catião cério(IV).

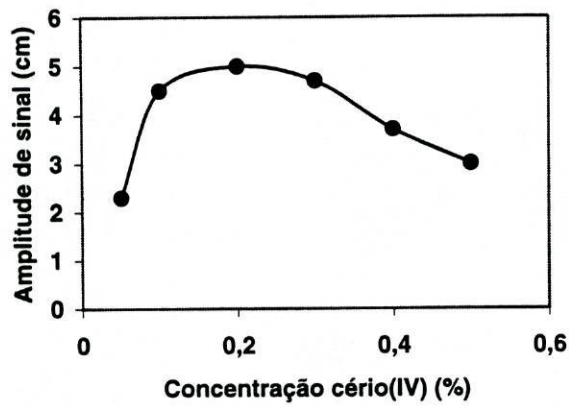


Fig 7.7 – Influência da concentração de cério(IV) na magnitude do sinal analítico, com paragem de fluxo.

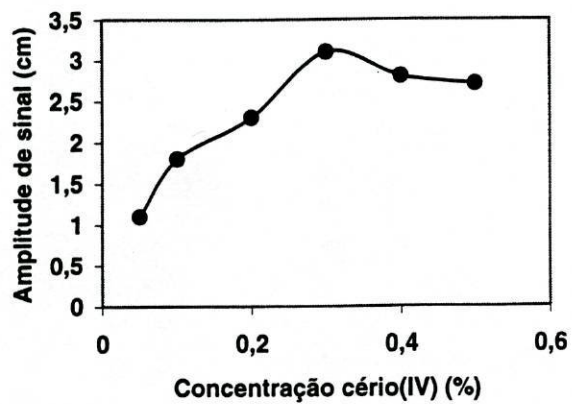


Fig 7.8 – Influência da concentração de cério(IV) na magnitude do sinal analítico, em modo contínuo.

A fase da reacção em que intervém o catião Ce(IV) ocorre em meio ácido, e foi verificado que a cinética da reacção é dependente da concentração do ácido. Foram efectuados ensaios com concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entre 0,09 e 1,22 M. Observou-se que para concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entre 0,09 e 0,36 a absorvância aumentava ligeiramente, decrescendo depois, também de forma ligeira, até uma concentração de 0,72 M, valor a partir do qual decrescia acentuadamente.

Quando as soluções de amiloride e MBTH eram preparadas em água desionizada, sendo a solução de cério(IV) preparada em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36 M, a diferença entre o índice de refacção da zona de amostra e da solução transportadora, devido fundamentalmente à presença do ácido sulfúrico, provocava perturbações na detecção, originando o aparecimento de picos positivos e negativos (efeito *Schlieren*), à semelhança do referido no Capítulo 4. Os picos positivos surgiam mesmo quando a solução de amiloride era substituída por água desionizada, afectando de forma marcada a realização da análise, mas foram compensados, quase desaparecendo, quando a solução de MBTH passou a ser preparada em ácido sulfúrico 0,36 M, o que permitiu compatibilizar os índices de refacção e eliminar os indesejáveis gradientes.

Após dimensionamento e optimização do sistema de fluxo multicomutado desenvolvido, foram elaboradas curvas de calibração as quais apresentaram uma relação linear entre concentração e altura de sinal para concentrações de amiloride até 120 µg mL<sup>-1</sup> (Fig 7.9).

Os parâmetros utilizados na obtenção destas curvas de calibração foram: uma sequência de intercalação de 8 s, a um tempo de intercalação de 1 s para a solução de amostra e 1 s para a solução de MBTH, um caudal de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, um reactor de 50 cm e um intervalo de paragem de fluxo de 120 s. Com estas variáveis a curva de calibração apresentou a seguinte equação, definida por regressão linear:  $A = 0,1239 \times C + 0,4744$ , sendo  $A$  a amplitude de sinal, expressa em centímetros, e  $C$  a concentração de amiloride, expressa em µg mL<sup>-1</sup>, com um coeficiente de correlação igual a 0,9992.

A Figura 7.10 apresenta o registo gráfico obtido na elaboração da referida curva de calibração.

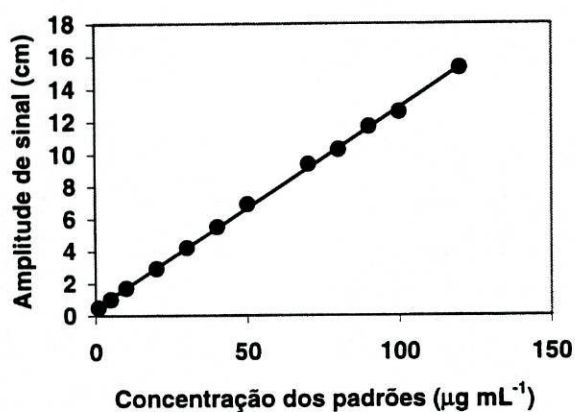


Fig 7.9 – Curva de calibração obtida com soluções padrão de amiloride com concentrações até  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 7.3.2. Estudo de interferências

Considerando que a metodologia desenvolvida seria aplicada na determinação de amiloride em preparações farmacêuticas, foi estudada a extensão do efeito interferente de alguns compostos frequentemente utilizados como excipientes, os quais por vezes em concentrações superiores às do fármaco em estudo, podem participar da reacção utilizada, levando à obtenção de resultados distintos dos que seriam obtidos na sua ausência, afectando por isso a qualidade da determinação.

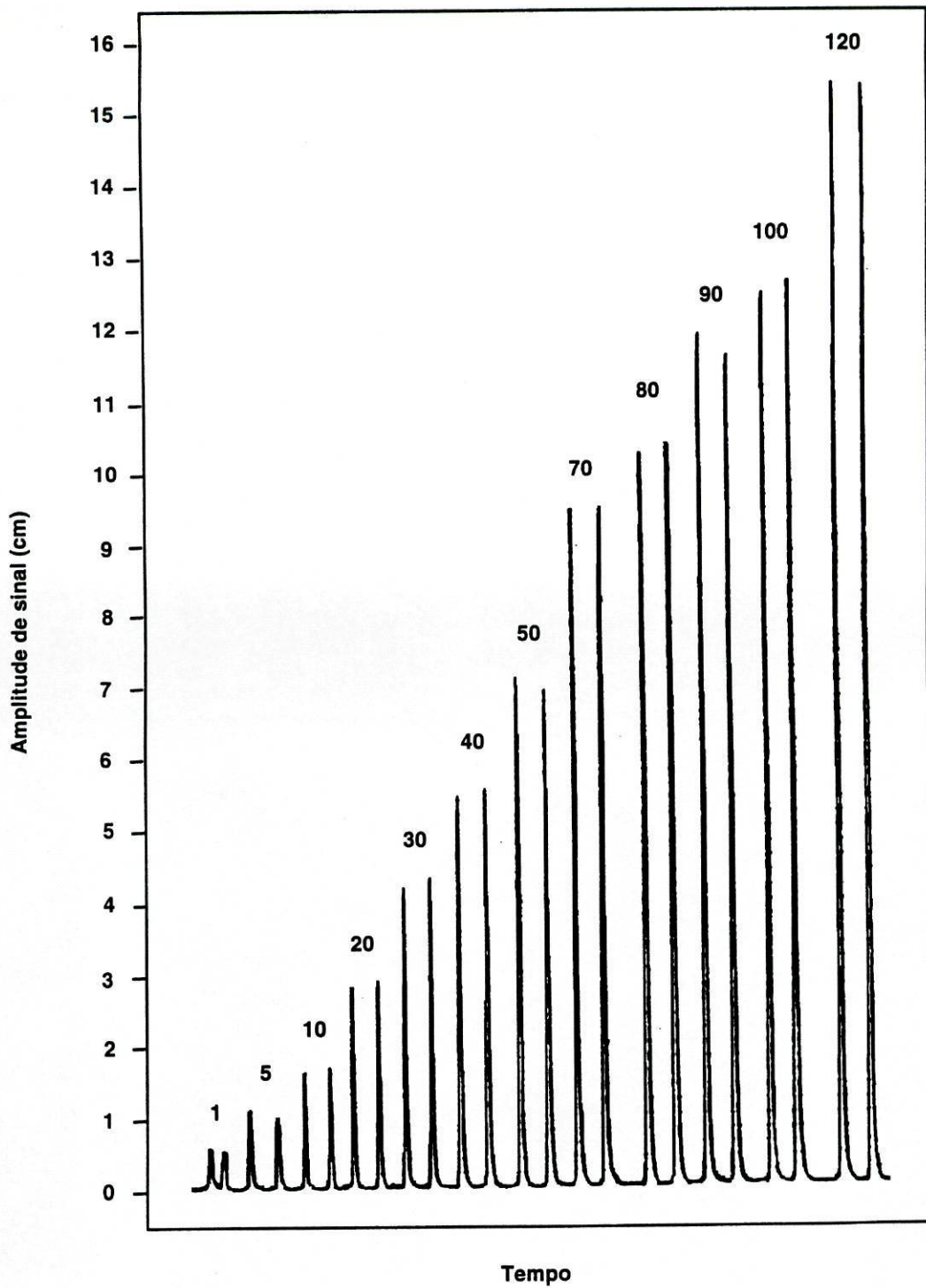


Fig 7.10 – Registo gráfico de uma curva de calibração de amiloride obtida com uma sequência de intercalação de 8 ciclos a (1 s/1 s) de amostra/MBTH e soluções padrão até 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Amostras preparadas com uma concentração fixa de amiloride de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ( $3,64 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) foram depois acrescentadas de quantidades crescentes dos excipientes em estudo, os quais foram seleccionadas em função da sua utilização mais corrente ao nível da indústria farmacêutica e também por serem os mais referenciados na literatura. Estas amostras foram depois analisadas pela metodologia desenvolvida.

Uma espécie era considerada como não-interferente se a variação relativa do sinal analítico entre a amostra contendo a espécie e a amostra na qual ela estava ausente fosse, em valor absoluto, inferior ou igual a 3%.

Os resultados obtidos neste estudo (Tabela 7.1) demonstraram que nas condições de ensaio utilizadas, e que foram as resultantes da optimização desenvolvida, a maior parte dos excipientes ensaiados não apresenta efeito interferente, o mesmo acontecendo com a hidroclorotiazida, fármaco que está sempre presente nas preparações contendo amiloride, e sempre em concentrações bastante superiores.

*Tabela 7.1 – Efeito interferente de alguns compostos, normalmente utilizados como excipientes, na metodologia desenvolvida.*

Interferência	Razão molar Tolerada
Sacarose	100 <sup>§</sup>
Benzoato de sódio	100 <sup>§</sup>
Lactose	100 <sup>§</sup>
Galactose	100 <sup>§</sup>
Glucose	100 <sup>§</sup>
Ácido cítrico	50
Isopropanol	100 <sup>§</sup>
EDTA	10
Etanol	100 <sup>§</sup>
Hidroclorotiazida	Sat. †

<sup>§</sup> Valor mais elevado testado.

† Solução saturada.

O EDTA e o ácido cítrico apresentam efeito interferente, embora este efeito apenas se manifeste a concentrações elevadas, normalmente bastante superiores às encontradas nas formulações disponíveis comercialmente.

### ***7.3.3. Análise de preparações farmacêuticas***

O desempenho e as potencialidades da metodologia desenvolvida foram testadas na determinação de amiloride em preparações farmacêuticas, sendo a qualidade dos resultados obtidos avaliada por comparação com os fornecidos pela metodologia de referência [22].

Foram preparadas soluções representativas de cada uma das preparações farmacêuticas analisadas, com concentrações que se encontrassem incluídas no intervalo de concentrações correspondente à zona de resposta linear da metodologia, as quais foram analisadas por inserção, em duplicado, no sistema de fluxo.

Os resultados obtidos, tanto no que diz respeito à metodologia de referência como à metodologia proposta, são apresentados na Tabela 7.2. Verificou-se uma concordância nos resultados obtidos por ambas as metodologias, com desvios relativos, expressos em percentagem, da metodologia proposta, num intervalo de valores entre -1,19 e 2,43%. O sistema de fluxo apresentou uma boa reprodutibilidade, sendo o desvio padrão relativo (RSD), obtido por inserção repetida (n=10) de uma mesma amostra, inferior a 2,2%.

O ritmo de amostragem obtido foi de 30 amostras por hora. Este ritmo de amostragem pode contudo ser ainda melhorado, bastando para isso refinar a temporização do sistema de forma a permitir, ao mesmo tempo e no mesmo reactor, a inserção de uma nova amostra em simultâneo com o transporte da amostra precedente (já no interior do reactor) para detecção.

O sistema analítico revelou uma boa estabilidade sem desvios ao nível da linha de base.

Tabela 7.2 – Resultados obtidos na determinação de amiloride em produtos farmacêuticos.

Amostra	Concentração declarada (mg/comp.)	Concentração determinada (mg/comp.)		RD* (%)
		Metodologia Desenvolvida	Metodologia de referência	
Chibrético	5.0	4.96±0.11	4.89	1.43
Moduretic	5.0	5.01±0.11	5.05	-0.79
Diurene 50	5.0	4.99±0.11	5.05	-1.19
Diurene 25	2.5	2.53±0.06	2.47	2.43

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

#### 7.4. Conclusões

A metodologia automática desenvolvida revelou ser um procedimento vantajoso para determinação de cloridrato de amiloride em preparações farmacêuticas, apresentando um limitado efeito interferente por parte de alguns compostos vulgarmente usados como excipientes.

O sistema de canal único proposto, combinando uma vertente de rápida homogeneização com um padrão de baixa dispersão, um baixo consumo de reagentes e um procedimento de dupla paragem de fluxo facilmente automatizável, torna-se uma alternativa vantajosa para aplicação em situações que requerem um reforço da sensibilidade da determinação, como acontece por exemplo sempre que estejam envolvidas reacções químicas de cinética lenta, sem que com isso se comprometa o ritmo de amostragem. A sua elevada versatilidade torna-a também extremamente útil para a

execução de determinações cinéticas diferenciais, para a resolução de formulações com multicomponentes, para processamentos paralelos, mais lentos, da amostra, como por exemplo, quando se requer uma etapa de aquecimento.

Numa perspectiva mais ampla de aplicação, a metodologia proposta pode ser também usada com vantagem como um sistema de paragem de fluxo convencional [29], para a execução de determinações baseadas em métodos cinéticos, através da inclusão do detector em qualquer um dos dois reactores  $L_1$  e  $L_2$ . Desta forma, a zona de amostra poderia ser parada e monitorizada no detector, enquanto que o outro reactor seria usado para lavagem e substituição da amostra não afectando o ritmo de amostragem.

## 7.5.Referências

- [1] D.J. Mazzo, *Anal. Profiles. Drug Subst.*, 15 (1986) 1.
- [2] M.S. Glitzer, S.L. Steelman, *Nature*, 212 (1966) 191.
- [3] E.J. Cragoe Jr., O.W. Woltersdorf Jr., J.B. Bicking, S.F. Kwong, J.H. Jones, *J. Med. Chem.* 10 (1967) 66.
- [4] J.A.M. Pulgarín, A.A. Molina, P.F. López, *Analyst* 122 (1997) 247.
- [5] U.S. Pharmacopeia, 23<sup>a</sup> ed., U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville MD, 1995, pg. 78.
- [6] Farmacopeia Portuguesa VI - Edição Oficial, INFARMED, Lisboa 1997, pg. 607.
- [7] C.V.N. Prasad, C. Parihar, K. Sunil, P. Parimoo, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17 (1998) 877.
- [8] N. Erk, F. Onur, *Anal. Lett.*, 39 (1997) 1503.
- [9] E. Martin, O. Hernández, J.J. Arias, *Anal. Lett.*, 28 (1995) 1449.
- [10] M. Kartal, N. Erk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 19 (1999) 477.
- [11] C.S.P. Sastry, M.V. Suryanarayana, A.S.R.P. Tipirneni, *Talanta*, 36 (1989) 491.
- [12] C.S.P. Sastry, T.N.V. Prasad, B.S. Sastry, E.V. Rao, *Analyst*, 113 (1988) 255.
- [13] C.S.P. Sastry, M.V. Suryanarayana, A.S.R. Prasad-Tipirneni, T. Satyanarayana, *Indian Drugs*, 26 (1989) 651.
- [14] S.P. Kurani, D.K. Desai, A.G. Seshadrinathan, *Indian Drugs*, 23 (1986) 230.
- [15] J.A. Murillo-Pulgarin, A. Alanon-Molina, P. Fernandez-Lopez, *Anal. Chim. Acta*, 370 (1998) 9.
- [16] J.A. Murillo-Pulgarin, A.A. Molina, P.F. Lopez, *Analyst*, 122 (1997) 247.
- [17] E. Bechgaard, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 82 (1989) 219.
- [18] R.J.Y. Shi, L.Z. Benet, E.T. Lin, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 50 (1986) 399.
- [19] E. Bonet-Domingo, J.R. Torres-Lapasió, M.J. Medina-Hernandez, M.C. García-Alvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 287 (1994) 201.

- [20] L.J. Zivanovic, M. Vasiljevic, A. Agatonovic-Kustrin, M. Maksimovic, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14 (1996) 1245.
- [21] E. Bonet-Domingo, M.J. Medina-Hernandez, M.C. García-Alvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11 (1993) 711.
- [22] U.S. Pharmacopeia, 23<sup>a</sup> ed., U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville MD, 1995, pg. 78.
- [23] L. Zivanovic, S. Agatonovic, D. Radulovic, *Pharmazie*, 44 (1989) 864.
- [24] A.P. Argekar, S.V. Raj, S.U. Kapadia, *Indian Drugs*, 32 (1995) 166.
- [25] Y.M. Issa, S.K. Mohamed, *Quim. Anal.*, 16 (1997) 95.
- [26] Y.M. Issa, H. Ibrahim, A.F. Soukry, S.K. Mohamed, *Mikrochim. Acta*, 118 (1995) 257.
- [27] A.F. Shoukry, Y.M. Issa, H. Ibrahim, S.K. Mohamed, *Analyst*, 120 (1995) 1211.
- [28] S.A. Halvatzis, A.M. Mihalatos, L.P. Palilis, A.C. Calokerinos, *Anal. Chim. Acta*, 290 (1994) 172,
- [29] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, 2<sup>a</sup> ed., John Wiley and Sons, New York, 1988.
- [30] J.Ruzicka, E.H.Hansen, *Anal. Chim. Acta*, 99 (1978) 37.
- [31] B.F. Rocks, R.A. Sherwood, M.M. Hosseinmardi, C. Riley, *Anal. Chim. Acta*, 179 (1986) 225.
- [32] F.J. Krug, B.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.R. Ferreira, A.O. Jacintho, *Anal. Chim. Acta*, 151 (1983) 39.
- [33] B.F. Reis, A.O. Jacintho, J. Mortatti, F.J. Krug, E.A.G. Zagatto, H. Bergamin, L.C.R. Pessenda, *Anal. Chim. Acta*, 123 (1981) 221.
- [34] ] U.S. Pharmacopeia, 23<sup>rd</sup> ed., U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville MD, 1995, pg. 79.

# **CAPÍTULO 8**

---

## ***CONCLUSÕES FINAIS***

Neste capítulo é feita uma avaliação geral do trabalho desenvolvido, em função dos objectivos iniciais e dos resultados obtidos, e são apresentadas as conclusões finais.

Ocupando as metodologias automáticas um papel cada vez mais importante na execução de tarefas analíticas, ao mesmo tempo que as técnicas de fluxo se assumem como ferramentas preponderantes para o seu desenvolvimento e implementação, pretendeu-se com este trabalho desenvolver metodologias analíticas automáticas baseadas em sistemas de fluxo multicomutado as quais confirmassem as enormes potencialidades atribuídas á multicomutação.

Sendo a multicomutação uma técnica relativamente recente, por isso com um número de aplicações e referências bibliográficas ainda bastante limitado em que existe uma predominância da análise de espécies inorgânicas para controlo ambiental, outro dos objectivos deste trabalho foi estender a aplicação de sistemas de fluxo multicomutado à análise de produtos de interesse farmacêutico, área onde poderão afirmar-se como alternativas vantajosas aos procedimentos já utilizados.

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação permitiu reforçar a ideia de grande versatilidade associada aos sistemas de fluxo multicomutado, nomeadamente através da implementação de sistemas analíticos em que as soluções de amostra e reagentes podem ser orientadas em diferentes direcções, através de percursos bem definidos, o que lhes confere amplas possibilidades de manipulação da zona de amostra, em especial no que diz respeito à adição dos reagentes e à execução da medida do sinal analítico.

Sistemas com estas características podem ser aplicados na análise de diferentes espécies e de 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. Esta funcionalidade acrescida dos sistemas de fluxo multicomutado, que pode ser estendida à SIA, constitui uma vantagem importante relativamente aos sistemas FIA, os quais, de uma forma geral, são concebidos para aplicações específicas.

Os sistemas de fluxo multicomutado proporcionam igualmente um controlo efectivo e versátil sobre o processo de inserção da amostra, dado que a utilização de uma amostragem com base de tempo, à semelhança do que acontece com a SIA, permite a inserção reprodutível de alíquotas de amostra com volumes variáveis, possibilitando a manipulação da dispersão em função do volume amostrado. Desta forma é possível a obtenção de diferentes valores de diluição, os quais podem ser adaptados à concentração da amostra sem necessidade de introduzir alterações na configuração da montagem de fluxo. Permitem também ampliar a gama de concentrações determinável, o que se revela vantajoso sempre que a análise envolva amostras com grande variabilidade de concentração.

Foi também verificado que a 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. Desta forma obtém-se um aumento do tempo de reacção, e em consonância da sua extensão, possibilitando a utilização de reactores de menores dimensões, o que resulta numa redução do valor da dispersão.

A versatilidade de direccionamento de fluxo permitida pela multicomutação possibilitou a implementação de sistemas analíticos automáticos em que é possível recorrer a uma estratégia de paragem de fluxo, de forma simples e sem repercussão no ritmo de amostragem, de modo a aumentar o tempo de reacção, incrementando a sensibilidade da determinação.

A implementação de um sistema de fluxo multicomutado com uma configuração circular demonstrou ser uma estratégia vantajosa para a recirculação da zona de amostra, funcionando como se de um reactor de comprimento variável se tratasse, o qual era auto-ajustável, no que diz respeito ao número de ciclos, em função da concentração da amostra e da evolução do sinal analítico. Esta estratégia demonstrou ser efectiva no aumento da dispersão e deste modo do nível de diluição da amostra, ao mesmo tempo que

proporciona uma ampla variedade de valores de diluição e a compatibilização entre a concentração da amostra e o intervalo de concentrações passíveis de determinação, através da adequação do grau de diluição a que a amostra deverá ser submetida.

Ao mesmo tempo, a remoção selectiva de zonas da amostra, nas suas secções frontal e terminal, contribui para aumentar a eficiência do processo de diluição, proporcionando simultaneamente uma renovação constante das duas interfaces amostra/reagente, o que permitiu aumentar a extensão da reacção. Esta remoção de zonas de amostra, que consiste fundamentalmente num processo de amostragem de zonas, confirmou ser um estratégia expedita para a obtenção de elevados valores de diluição no interior do sistema, possibilitando a sua aplicação em situações que envolvem a análise de amostras numa ampla gama de concentrações, como acontece, por exemplo, durante a realização de ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas.

A posição do detector no sistema de fluxo multicomutado circular permite a realização de multideteções da mesma zona de amostra, o que proporciona um manancial acrescido de informação e confere ao sistema um elevado potencial para implementação de determinações analíticas baseadas, por exemplo, em métodos cinéticos.

A estratégia desenvolvida para compensação do efeito Schlieren, com base na utilização de uma solução transportadora produzida em linha, com um perfil de concentrações semelhante ao da zona de amostra, evitando assim a formação de gradientes de concentração, demonstrou ser uma solução vantajosa, simples e versátil. Esta estratégia permite manter a integridade da amostra e é passível de aplicação a qualquer reacção, uma vez que qualquer sequência de intercalação da zona de amostra pode ser reproduzida aquando da preparação da solução de transporte.

A execução de reacções fotoquímicas no sistema de fluxo demonstrou possuir um elevado potencial analítico, uma vez que a luz, que pode ser considerada como que um reagente ideal, pela sua facilidade de utilização, conveniência, flexibilidade e baixo custo,

permite promover ou intensificar algumas características da espécie em análise, nomeadamente as suas propriedades cromóforas ou fluoróforas, favorecendo a sua detecção. A sua implementação num sistema de fluxo multicomutado resultou numa metodologia simples, facilmente automatizável e com elevada eficiência analítica. Estas características, aliadas às elevadas sensibilidade e selectividade da detecção fluorimétrica, perspectivam que esta estratégia combinada possa ser utilizada com vantagem em situações semelhantes, com especial realce na análise de produtos farmacêuticos.

A metodologia desenvolvida para determinação de isoniazida em produtos farmacêuticos, com base na monitorização fluorimétrica do cério(III) formado durante a oxidação da isoniazida pelo cério(IV), demonstrou ser uma metodologia simples e expedita, que poderá ser aplicada com vantagem na análise de outros produtos farmacêuticos com propriedades redutoras e que não apresentem fluorescência nativa. Poder-se-á assim tirar proveito do potencial analítico da detecção fluorimétrica, nomeadamente no que diz respeito à sua sensibilidade.

As metodologias desenvolvidas para determinação de produtos de interesse farmacêutico demonstraram ser alternativas vantajosas comparativamente com as metodologias normalmente propostas e recomendadas pelas diferentes Farmacopeias, as quais são geralmente laboriosas e demoradas, como no caso da determinação de ácido fólico, a qual requer a utilização de inúmeros reagentes e várias manipulações, o que resulta num tempo de análise por amostra de cerca de 40 min. Outras envolvem a utilização de reagentes de difícil manuseamento, como é por exemplo o caso das anidrovolumetrias, ou então equipamento dispendioso, como no caso das metodologias de referência que recorrem ao HPLC. Pelo contrário as metodologias propostas, sendo de simples operação, demonstraram ser relativamente rápidas, selectivas e sensíveis e confirmaram que a multicomutação é uma técnica de fluxo que pode ser utilizada com vantagem na implementação de metodologias analíticas automáticas, simples, de baixo custo, versáteis e eficientes.